مقایسه اثر آنتی باکتریال دهانشویه نانوسیلور و کلرهگزیدین بر روی استرپتوکوک سانگوئیس– مطالعه آزمایشگاهی

زهرا پارسا[۱]، دکتر پریسا عارف[۲]، دکتر ناهید عسکری زاده[#۳]، دکتر ایرج اشرافی[۴]

۱-دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی ، تهران ،ایران

۲-استادیار گروه آموزشی دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی ، تهران ،ایران

۳-دانشیار گروه آموزشی دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی ، تهران ،ایران

۴-دکترای باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه تهران

وصول مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۲ اصلاح نهایی: ۹۸/۱۲/۵ پذیرش مقاله: ۹۹/۳/۵

Comparison of Antibacterial Effect of Nanosilver and Chlorhexidine Mouthwash on Streptococcus Sanguis (in vitro)

Zahra Parsa [1], Parisa Aref [2], Nahid Askarizadeh [3#], Iraj Ashraafi [4]

1-Dentistry student, Faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2-Assistant Professor of Pediatric Dentistry Faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3-Associate Professor of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4-Doctor of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran University.

Received:Dec2020 ; Accepted: May 2020

Abstract

Background and Aim: *Streptococcus sanguis* is known one of the initiating agents of microbial plaque formation. In addition to the physical control of the microbial plaque, the use of mouthwashes as a chemical method to kill microorganisms is effective. Although chlorhexidine is the gold standard for the elimination of oral microorganisms, the unpleasant side effects of its long-term use warrant a more appropriate alternative. The purpose of this study was to compare the antibacterial effect of nanosilver and chlorhexidine mouthwash on *Streptococcus sanguis* in pediatric department, faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University in 2018-19.

Materials and methods: This experimental study was performed on Streptococcus sanguis (in vitro). Experiments were performed on two groups of case (nanosilver mouthwash) and control (chlorhexidine mouthwash) in three parts Initially, antimicrobial potency was measured by Disk diffusion method assay by measuring inhibitory zone diameter. Then, micro and macrodialysis methods were used to measure MIC (minimum inhibitory concentration) and finally to measure MBC (minimum bactericidal concentration) used the Blood agar dilution method.

Results: Statistical analysis showed that the nanosilver mouthwash has no inhibitory zone. Also its MIC and MBC were higher than chlorhexine and this difference was statistically significant ($P < 0.001$)

Conclusion: According to the results of the in vitro study nanosilver mouthwash has minor bacteriostatic and bactericidal effect compared to chlorhexidine.

Key words: Chlorhexidine, Nanosilver, MIC, MBC, *Streptococcus sanguis*

***Corresponding Author:** nahidaskarizadeh@yahoo.com

J Res Dent Sci.2020;17(2): 97-106

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر ناهید عسکری زاده تلفن: ۲۲۵۶۴۵۷۱ داخلی ۱۳۳ پست الکترونیک: nahidaskarizadeh@yahoo.com

خلاصه:

سابقه و هدف: باکتری استرپتوکوک سانگوئیس بعنوان یکی از عوامل آغازکننده تشکیل پلاک میکروبی شناخته میشود.این باکتری شرایط را برای چسبیدن دیگر باکتریهای پوسیدگی زا به پلاک دندانی مهیا میکند. در کنار کنترل فیزیکی پلاک میکروبی استفاده از دهانشویه ها بعنوان روش شیمیایی برای ازبین بردن میکروارگانیسم ها موثر است. گرچه کلرهگزیدین بعنوان استاندارد طلایی جهت ازبین بردن میکروارگانیسم های دهانی مطرح است اما عوارض ناخوشایند حاصل از استفاده طولانی مدت آن جایگزین مناسب تری را میطلبد.این تحقیق با هدف مقایسه اثر آنتی باکتریال دهانشویه نانوسیلور و کلرهگزیدین بر روی استرپتوکوک سانگوئیس در بخش کودکان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۸ انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش از نوع experimental و در شرایط in vitro روی *استرپتوکوک سانگوئیس* انجام شد.آزمایش روی دو گروه مورد(دهانشویه نانوسیلور) و شاهد(دهانشویه کلرهگزیدین) در سه قسمت انجام شد. ابتدا با استفاده از روش Disk diffusionبررسی قدرت آنتی میکروبیال از طریق اندازه گیری قطر هاله مهاری انجام شد.سپس جهت اندازه گیریMIC (حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری) از دو روش میکرو و ماکرودیلوشن استفاده شد و در پایان برای اندازه گیریMBC(حداقل غلظت کشنده باکتری) از روشBlood agar dilution استفاده کردیم.

یافته ها: آزمون آماری نشان داد دهانشویه نانوسیلور فاقد هاله عدم رشد و MIC و MBC آن در مقایسه با کلرهگزیدین بیشتر بوده و این اختلاف از نظر آماری معنی دار است. ($P<۰/۰۰۱$)

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه در روش آزمایشگاهی دهانشویه نانوسیلور در مقایسه با کلرهگزیدین دارای خاصیت باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی ناچیز است.

کلید واژه ها:کلرهگزیدین،نانوسیلور،MIC،MBC، استرپتوکوک سانگوئیس

مقدمه:

باکتری استرپتوکوک سانگوئیس به عنوان یکی از عوامل آغاز کننده تشکیل پلاک میکروبی شناخته می شود. این میکرروارگانیسم زودتر از دیگر باکتری های پوسیدگی زا در محل حاضر می شود. سانگوئیس به واسطه ی داشتن پروتئین هایPil B و PilCروی فیمبریا های خود و اتصال آنها به آلفا آمیلاز بزاقی ، بر روی سطح دندان می چسبند. این ترکیب باعث می شود اتصال دیگر باکتری ها و تشکیل بیوفیلم بر روی سطح دندان تسهیل شود.[۱] این باکتری حتی در غیاب هیدروکربن ها تخمیر شده می تواند با استفاده از هیدرولیز آرژنین فعال باقی بماند.[۲] برداشت مکانیکی پلاک روش اصلی حفظ بهداشت دهان و دندان محسوب می شود اما انجام آن بطورکامل حتی توسط افراد دقیق هم امکان پذیر نمی باشد، بنابراین توصیه می شود کنترل شیمیایی پلاک به روش مکانیکی افزوده شود.[۳ و ۴] در میان روش های شیمیایی استفاده از دهانشویه ها نسبت به سایر روش ها رایج تر است.[۵] در این بین کلرهگزیدین ماده ایست که مطالعات فراوانی روی آن انجام گرفته است.[۳] و به دلیل دوام اثر نسبتا طولانی و نداشتن سمیت بعنوان استاندارد طلایی کنترل پلاک مطرح است.[۶] کلرهگزیدین یک محلول آنتی سپتیک وسیع الطیف است که در برابر باکتری های گرم مثبت و منفی، بی هوازی ها، قارچ ها و مخمر ها و برخی ویروس ها نظیر هپاتیت و ویروس مولد ایدز موثر است.[۷] اما کلرهگزیدین دارای عوارض گوناگونی از جمله ایجاد رنگیزه های دندانی، تغییر حس چشایی، سوزش و خشکی دهان، متفلس شدن لثه ، تغییر رنگ ترمیم ها و اثرات سیستمیک منفی در صورت بلع است.[۸] کلرهگزیدین

موجب پدیدآمدن رنگ قهوه‌ای بر روی دندان‌ها و پرکردگی‌های همرنگ دندان، مخاط دهان و زبان می‌شود.[۹]

عوامل ضد میکروبی به دو دسته آلی و غیر آلی تقسیم می شوند. با توجه به نواقص دسته اول (آلی)، عوامل غیر آلی مانند نانوذرات فلزی مورد توجه محققین قرار گرفت. این نانوذرات بسیار فعال بوده و در مقابل باکتری های گرم مثبت و منفی اثرات مهاری و باکتریوسیدی قابل توجهی دارند.[۱۰] در میان تمام نانو مواد طبیعی و مصنوعی ضد میکروبی نانوذرات نقره بیشترین کاربرد را دارند.[۱۱] نقره یک عامل ضد میکروبی ایمن در مقایسه با سایر عوامل ضدمیکروبی -که احتمال تاثیر منفی بر بدن انسان دارند- مورد استفاده می باشد. از این رو میتوان با افزودن این نانوذرات به دهانشویه ها خطر پوسیدگی را در بیماران کاهش داد.[۱۲] خواص باکتریوسیدی نانوذرات نقره مربوط به اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالای آن است که به آنها اجازه می دهد از نزدیک با غشای میکروبی واکنش بدهند.[۱۳] محلول نانونقره تا کنون بیش از ۶۵۰ گونه نوع میکروارگانیسم از قبیل باکتری و ویروس را از بین برده است.[۱۴] نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم ها اثر میگذارد. مکانیسم های متفاوتی برای اثرگذاری نقره بر میکروارگانیسم ها در تحقیقات بیان شده است. این تعدد مکانیسم ها باعث شده میکروارگانیسم ها تا به امروز نتوانند نسبت به نقره سازگاری و مقاومت پیداکنند. یون های نقره طی واکنش جانشینی باندهای –SH را در ساختمان اسید آمینه میکروارگانیسم به باندهای –Sag تبدیل می کند و موجب مرگ میکروارگانیسم می شود.[۱۵] به دلیل افزایش مقاومت میکروارگانیسم ها به یون های فلزی و آنتی بیوتیک ها و ایجاد سویه های مقاوم امروزه نیاز بیشتری نسبت به تولید مواد جدید و جایگزین احساس می شود.[۱۶] برخی از مطالعات گذشته نشان داده است که دهانشویه نانوسیلور بر روی باکتری سانگوئیس موثر بوده است.[۱۷، ۱۸] اما برخی دیگر از بررسی ها همچنان کلرهگزیدین را در مقایسه با نانوسیلور به عنوان بهترین دهانشویه ضد میکروبی معرفی می کنند.[۱۹، ۲۰] برای نخستین بار در این تحقیق استفاده از یک دهانشویه ی نانوسیلور ایرانی(سیلوسپت) مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین با توجه به خلاء اطلاعاتی موجود در این زمینه و اهمیت این موضوع بر آن شدیم تا به مقایسه اثر آنتی میکروبیال یک دهانشویه نانو سیلور ایرانی (سیلوسپت) بر روی باکتری استرپتوکوک سانگوئیس در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دندان پزشکی تهران در سال ۱۳۹۸ بپردازیم.

مواد و روش‌ها:

تهیه سویه های میکروبی:

تحقیق به روش تجربی آزمایشگاهی و در آزمایشگاه مولکولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد. نمونه کشت زنده باکتریاسترپتوکوک سانگوئیس گونه ایرانی (PTCC1449)، از مرکز منطقه ای کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه شد.

دهانشویه ها:

دهانشویه نانوسیلور سیلوسپت با برند chitotech ساخت ایران با غلظت نانو ذرات ۱۰ppm و سایز نانو ذرات ۳۰-۵۰ nm با طعم ساده با حلال آب ، بدون مواد افزودنی و دهانشویه کلرهگزین ۰,۲٪ ساخت لابراتوار دنیای بهداشت در این تحقیق استفاده شد.

اندازه گیری هاله مهاری:

در قسمت اول مطالعه، از تکنیک دیسک گذاری (Disk diffusion test) درون آگار که توسط انجمن استاندارد کلینیکی و لابراتواری (CLSI) توصیه شده است ، جهت بررسی پتانسیل آنتی باکتریال نانو سیلور استفاده شد. از کشت تازه استرپتوکوک ها کدورتی معادل 0.5 Mc Farland تهیه شد. سپس باکتری را از محیط سرم در محیط کشت MHA (Muller Hinton Agar) به همراه ۵ درصد خون به روش چمنی کشت دادیم و سپس یک دیسک حاوی 20 µl

کلرهگزیدین ۰/۲٪(گروه شاهد) و یک disk حاوی 20 µl دهانشویه نانو سیلور (گروه مورد) تهیه کرده و به همراه یک Blank disk (دیسک خنثی) به عنوان کنترل منفی ، بر روی محیط کشت اختصاصی باکتری قرار دادیم و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه کردیم بعد از ۲۴ ساعت هاله عدم رشد باکتری (Inhibitory zone) با کولیس استاندارد اندازه گیری شد و تغییرات کمتر از ۱mm صفر در نظر گرفته شد برای اطمینان از پاسخ ، تحقیق تحت شرایط حفاظت شده آسپتیک انجام و ۳ بار تکرار گردید.

اندازه گیری MIC:

در قسمت دوم مطالعه جهت ارزیابی MIC از هر دو تکنیک Microdilution broth و Macrodilution broth که توسط انجمن استانداردهای کلینیکی و لابراتواری (CLSI) توصیه شده است در محیط آب گوشت BHI (Brain Heart Infusion) استفاده گشت و سپس جهت ارزیابی حداقل غلظت کشنده باکتریایی MBC از هر یک از لوله های رقیق شده در آزمایش Macrodilution broth اقدام به کشت در محیط اختصاصی باکتری Mitis Salivarius گردید. برای این منظور غلظتی معادل 0.5 Mc Farland تهیه شد و جهت ارزیابی MIC و MBC از این غلظت استفاده گردید. سپس جهت بررسی MIC به روش Microdilution broth یک 96 well Plate تهیه کرده و ۱۰۰ میلی لیتر از محلول آبگوشت BHI به تمام چاهک ها اضافه گردید به چاهک اول میزان ۱۰۰ میلی لیتر از دهانشویه خالص ریخته شد پس از خوب مخلوط کردن آن ۱۰۰ میلی لیتر از آن محلول به لوله دوم ریخته شد و به همین ترتیب تا لوله دهم ادامه داده شد سپس ۱۰۰ میلی لیتر از مایع لوله دهم دور ریخته شد سپس به تمام چاهک ها ۱۰۰ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی حاوی باکتری S.Sanguis با کدورت ۰/۵ Mc Farland تهیه شده اضافه گردید. همین مراتب برای کلرهگزیدین ۰/۲٪ (گروه های شاهد) نیز انجام داده شد کنترل Positive : یک لوله حاوی آبگوشت BHI و سوش باکتری که بایدکدر شود. به طور همزمان جهت بررسی MIC به روش Macrodilution broth عین مراحل بالا اما با حجم بالاتر از یک سی سی در mini tube آزمایش تکرار شد و نیز کنترل مثبت و منفی در هر دو آزمایش منظور گردید کنترل Negative : یک لوله حاوی آبگوشت BHI خالی که باید شفاف باقی بماند. سپس Micro plate جهت رشد به انکوباتور در شرایط بی هوازی منتقل شد و نتایج پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه مورد ارزیابی قرار گرفت و بررسی های چشمی تعیین کدورت جهت تعیین MIC به عمل آمد در هر سری از آزمایش بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون یک سری از لوله ها با دید چشمی شفاف باقی ماندند که نشان از عدم رشد باکتری در آن غلظت ها می باشد اولین لوله ای که شفاف باقی ماند به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

اندازه گیری MBC:

جهت یافتن MBC از هر یک از لوله های Macro tube صرف نظر از کدر یا شفاف بودنش به محیط کشت جامد اختصاصی Mitis Salivaris به صورت چمنی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه در شرایط بی هوازی اولین Petridish که هیچ گونه باکتری در آن رشد نکرده باشد به عنوان غلظت MBC (حداقل غلظت باکتریوسید دهانشویه نانوسیلور) در نظر گرفته شد [۲۱، ۲۲].

در این تحقیق از نرم افزار SPSS Ver:20 برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد و همچنین روشهای آماری به کار رفته آزمون Mann-U-Whitney بود.

یافته ها:

قطر هاله مهاری در جدول۱ ارائه شده است.بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین قطر هاله عدم رشد در گروه کلرهگزیدین مشاهده گردید و در گروه نانوسیلور هیچگونه هاله مهاری تشکیل نشد.

جدول۱- قطر هاله عدم رشد در گروه های مختلف

قطر هاله عدم رشد(mm)	*St.Sanguis*		
دهانشویه نانوسیلور	۰	۰	۰
دهانشویه کلرهگزیدین	۱۵	۱۵	۱۶

($P<0.001$) داده ها از نظر آماری معنی دار هستند.

مقادیر MIC و MBC در جدول۲ و جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۲-MIC: حداقل غلظت بازدارنده رشد

حداقل غلظت بازدارنده رشد در هر دهانشویه (درصد)	*St.sanguis*		
دهانشویه نانوسیلور	٪۵۰	٪۵۰	٪۵۰
دهانشویه کلرهگزیدین	٪۷۸	٪۷۸	٪۷۸

($p<0.001$) داده ها از نظر آماری معنی دار هستند.

جدول ۳- MBC: حداقل غلظت کشندگی باکتری

حداقل غلظت کشنده در هر دهانشویه(درصد)	*St.sanguis*		
دهانشویه نانوسیلور	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
دهانشویه کلرهگزیدین	٪۷۸	٪۷۸	٪۷۸

($p<0.001$) داده ها از نظر آماری معنی دار هستند.

بحث:

در این مطالعه به شکل تجربی و در محیط آزمایشگاهی به بررسی اثر آنتی باکتریال غلظت های مختلف دهانشویه نانوسسیلور نسبت به کلرهگزیدین بر روی باکتری *استرپتوکوک سانگوئیس* از طریق دو روش تعیین قطر هاله عدم رشد به روش disk plate و سپس تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش broth dilution پرداختیم.

نتایج کلی ارزیابی هاله مهاری نشان می دهد که دهانشویه نانوسیلور (سیلوسپت) در برابر باکتری *استرپتوکوک سانگوئیس* فعالیت مهاری ندارد. MIC و MBC دهانشویه نانوسیلور به ترتیب برابر ۵۰٪ و ۱۰۰٪ حجم نمونه اولیه بوده و این دهانشویه اثر کشندگی ناچیزی بر روی باکتری فوق داشت. در این تحقیق اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره با دهانشویه کلرهگزیدین ۰,۲٪ مقایسه شد و میزان MIC و MBC آن ۰,۷۸٪ غلظت اولیه بود که نشان می دهد نانوذرات در مقابل کلرهگزیدین در غلظت های بالاتری باعث مهار *استرپتوکوک سانگوئیس* می شوند. به عبارتی دهانشویه کلرهگزیدین مورد بررسی ما اثر آنتی باکتریال قوی تری نسبت به سیلوسپت داشت.

یون نقره با دوز نسبتا کم از نظر بیولوژیکی برای سلول های یوکاریوتی بی خطر است.[۲۳] مطالعه ای در سال ۲۰۰۴ توسط Sondi و Salopek-Sondi درباره اثرات آنتی باکتریال سه نوع از نانوذرات انجام گرفت. آنها مکانیسم اصلی خاصیت آنتی باکتریال نانوذرات نقره را چسبیدن و رسوخ کردن به دیواره سلول باکتری دانستند. این عمل بر حیات و تکثیر باکتری اثر میگذارد. [۲۴] همچنین درحضور نانوذارت نقره DNA باکتری به فاز فشردگی می رود و قدرت رونویسی را از دست می دهد و در بیان پروتئینی اختلال ایجاد می شود که نتیجه همه این موارد مرگ باکتری است.[۲۵] اخیرا روش های بیوسنتزی به عنوان روشی ساده و قابل قبول و جایگزین سنتز فیزیکی و شیمیایی که پیچیده و گرانند محسوب می شود. این روش ها که دوست دار محیط زیست اند اصطلاحا روش زیستی نامیده می شوند.[۲۶] علیرغم استفاده گسترده از نانوذرات نقره هنوز اثرات بیولوژیک این ذرات بر سلول ها و اندامها کاملا مشخص نشده است. تحقیقات بر روی حیوانات نشان داده است که در اثر بلع، استنشاق یا تزریق ذرات نانونقره، این مواد در پوست و ریه رسوب کرده و از انجا به اندامهای دیگر نظیر کبد، طحال، کلیه ها، ماهیچه ها، مغز ، تخمدانها و بیضه ها رفته و اثرات

سمی داشته است.[۲۷] اغلب مطالعات اثرات استنشاق نانوذرات نقره و جذب پوستی و یا اثر سیتوتوکسیک آن را بررسی کرده اند و مصرف خوراکی آن کمتر ارزیابی شده است. در مطالعه ای روی موش صحرایی اثر زمان و دوز خوراکی این ذارت بررسی شد که نتایج کاهش تعداد گلبول های سفید و به دنبال آن کاهش سطح ایمنی بدن را نشان داد.[۲۸] ثابت شده که سمیت نانوذرات به عواملی همچون اندازه، شکل، ترکیب شیمیایی، حلالیت، مساحت سطح و بار سطحی بستگی دارد. ذرات ریز تر سطح فعال وسیع تر و توکسیسیته بیشتری دارند.[۲۹] ذرات ۵-۱۲ نانومتر باعث کشندگی جنین ماهی می شود. [۳۰] در این بین ثابت شده که ذرات با سایز ۶۰-۴۰nm قادرند بیوفیلم را کاهش دهند و به نظر می رسد در استفاده دهانی ویژگی های مطلوبی داشته باشند.[۲۳] بنابراین برای بررسی دقیق تر سمیت نانوذرات نقره و اثرات احتمالی آن بر بدن انسان مطالعات گسترده تر و طولانی مدت تری نیاز است.

در مطالعه ای توسط دکتر Nikita Panpalia و همکارانش در هند با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره و کلرهگزیدین گلوکونات در مقابل باکتری های پاتوژنیک دهانی انجام گرفت. میکروارگانیسم ها شامل *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس اورالیس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *کاندیدا آلبیکنز* بود. برای گروه مورد پودر نانوسیلور با سایز ذرات 30-50nm و در گروه شاهد دهانشویه کلرهگزیدین ۲٪ استفاده شده است. محلول نانونقره با اضافه کردن 1mg نانونقره به 10ml نرمال سالین (غلظت محلول100ppm) تهیه شد. MIC هر دو گروه بررسی و به این ترتیب گزارش شده است. MIC محلول نانونقره برای میکروارگانیسم های بالا به ترتیب ۶۰ ، ۴۵ ، ۱۵ ، ۹۰ و ۲/۸۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود و برای کلرهگزیدین به ترتیب میکروگرم بر میلی لیتر بود و برای کلرهگزیدین به ترتیب ۳۰۰ ، ۱۵۰ ، ۴۵۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. MIC و MBC نانونقره به طور معناداری کمتر از کلرهگزیدین بود در نتیجه محلول نانوسیلور خاصیت باکتریسیدال و باکتریواستاتیک خود را با یک پنجم غلظت دهانشویه کلرهگزیدین نشان داد. (در این تحقیق سایز نانوذرات دقیقا مشابه مطالعه ما بود اما از آنجا که غلظت محلول نانوسیلور مطالعه ما یک دهم غلظت محلول نانونقره این مطالعه بود می توان دلیل نارکارآمدی محلول ما را غلظت پایین آن دانست.

در مطالعه ای توسط دکتر صادقی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در دانشگاه شاهد با هدف مقایسه اثر ضدمیکروبی محلول نانوذرات نقره و کلرهگزیدین روی *استرپتوکوک سانگوئیس* و *اکتینومیسس ویسکوزیس* انجام گرفت. محلول نانو از شرکت pharma chem آلمان با سایز ذرات ۱۰nm و غلظت 0.1mg/ml معادل 100ppm استفاده شد. کلرهگزیدین شرکت دنیای بهداشت با غلظت ۰/۱۲٪ بکار گرفته شد. MIC و MBC مشابه آزمایش ما اندازه گیری شد و محلول نانونقره برای *سانگوئیس* به ترتیب 16 و 64 میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد. این متغیر ها برای کلرهگزیدین به ترتیب ۲۵۶ و ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر بود. در این بررسی تمامی عوامل مداخله گر از جمله محیط کشت، درجه حرارت، رطوبت، pH و ... به دقت یکسان سازی شده بود. نتایج نشان داد که این نانوذرات اثر ضد میکروبی خوبی در برابر هر دو میکروارگانیسم بررسی شده دارند.[۱۷] غلظت پایین تر کلرهگزیدین در این مطالعه نسبت به مطالعه ما قابل توجه می باشد. همچنین در مطالعه ما عواملی چون pH محلول ها در نظر گرفته نشد. غلظت محلول نانوسیلور مطالعه ما 10ppm یعنی یک دهم غلظت مطالعه دکتر صادقی بود.

در مطالعه ای که توسط دکتر Lu و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با هدف بررسی رابطه اندازه نانوذرات با خاصیت ضدباکتریال آن انجام گرفت. سایز نانو ذرات ۵،۱۵ ۵۵ نانو متر و باکتری های مورد مطالعه از گروه بی هوازی های پاتوژنیک مثل *استرپتوکوک سانگوئیس* بود. در این مطالعه برای تعیین میزان MIC از روش شمارش کلنی ها استفاده شده است. نتایج این بررسی نشان داد که ذرات نانوسیلور5nm داری خاصیت آنتی باکتریال قوی تری نسبت به دو ذره دیگر است. همچنین در

مورد باکتری *سانگوئیس* ذرات با اندازه ۵۵ نانو متر که به اندازه ذرات ما در تحقیق نزدیک است در غلظت 100ppm دارای خواص باکتریواستاتیکی می باشد. که از این نظر با غلظت استفاده شده ی مطالعه ما تفاوت داشته و یافته های مارا تائید می کند[۳۲]

تحقیقی در سال ۲۰۱۲ توسط دکتر معین تقوی و همکارانش با هدف مقایسه خاصیت آنتی باکتریال ۳ دهانشویه کلرهگزیدین، پرسیکا و Miswak Extract بر روی *استرپتوکوکوس سانگوئیس استرپتوکوکوس سالیواریس، لاکتوباسیل ولگاریس* و *کاندیدیا آلبیکنز* انجام گرفت. میکروارگانیسم ها در محیط کشت اختصاصی خود کشت داده شدند. از هر سه دهانشویه سه غلظت (۰/۱ و ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵٪) آماده و به پلیت های حاوی باکتری منتقل شد. سپس هاله عدم رشد باکتری ها بعد از ۲۴ ساعت اندازه گیری و گزارش شد. نتیجه این بود که دهانشویه کلرهگزیدین نسبت به دو دهانشویه دیگر روی *استرپتوکوک سانگوئیس، سالیواریس* و *لاکتوباسیل* موثرتر ظاهر شد و هیچ کدام از باکتری ها *کاندیدیا آلبیکنز* را از بین نبردند.[۳۳] بنابراین طبق این تحقیق کلرهگزیدین همچنان در مقام گلد استاندارد تاثیر بیشتری دارد.

مطالعه ای در سال ۱۳۹۱ دکتر اصفهانیان و همکارانش در دانشکده دندانپزشکی خوراسگان با هدف مقایسه اثر کلرهگزیدین و محلول نانو بر روی پلاک دندانی پرداخته شد. در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از پلاک بالای لثه ای و پایین لثه ای 15 بیمار نمونه گیری شد. و در آزمایشگاه محیط کشت حاوی کلرهگزیدین کمترین کلنی رشد یافته را در مقایسه با نانوسیلور نشان داد. به عبارتی کلر هگزیدین همچنان به عنوان Gold standard اثر آنتی باکتریال قوی تری نسبت به نانوسیلور دارد. در این بررسی کلرهگزیدین در محیط هوازی و بی هوازی تفاوت معناداری بین کلنی های رشد یافته نشان نداد که این یافته نشان دهنده اثر ضدباکتریایی مطلق آن است.[۳۴]

تحقیقی توسط دکتر لیسار و همکاران در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه شاهد با هدف مقایسه خواص آنتی باکتریال محلول نانوسیلور و روغن سیاهدانه در برابر آموکسی سیلین بر روی *استرپتوکوک سانگوئیس* و *موتانس* انجام گرفت. محلول نانوی این مطالعه 3500ppm بوده. در این بررسی از دو روش میکرودایالوشن و دیسک دفیوژن برای بررسی هاله عدم رشد استفاده شده است. بیشترین مقدار هاله عدم رشد برای باکتری *سانگوئیس* مربوط به آموکسی سیلین (19.75mm) بود و محلول نانوسیلور (۱۵/۵mm) در رتبه دوم قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که غلظت محلول نانوسیلور با خاصیت ضدمیکروبی آن رابطه مستقیم دارد و با کاهش غلظت محلول نانوسیلور هاله عدم رشد کمتر می شود. به طوریکه در مورد *سانگوئیس* وقتی غلظت به یک دهم محلول اولیه رسید هاله عدم رشد ۳۸ درصد کاهش یافت. این بررسی نشان می دهد هاله مهاری محلول نانوسیلور در غلظت های کمتر از ۲۱ppm برای موتانس تشکیل نمی شود که این موضوع یافته های ما را در این بررسی تائید می کند. در این مطالعه غلظت محلول نانو ۳۵۰ برابر مطالعه ما می باشد که خود دلیلی بر عدم موفقیت محلول ما در برابر باکتری *سانگوئیس* است.[۳۵]

در مطالعه ای که در ۱۳۹۶ در دانشگاه علوم پزشکی یزد دانشکده بهداشت توسط دکتر سلمانی و همکارانش انجام گرفت فعالیت ضدباکتری نانوذرات نقره روی باکتری های g مثبت و g منفی در محیط آزمایشگاه بررسی شد. دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئرژینوزا و دو باکتری گرم منفی Ecoli و باسیلوس سرئوس بررسی شدند. سپس با استفاده از روش رقیق سازی MIC و MBC تعیین گردید. اندازه ذرات نانو در این بررسی 100nm و غلظت محلول 2ppm بود. همچنین متغیر زمان مرگ باکتری با استفاده از غلظت های یک و دو برابر MIC نیز مشخص شد.

در این بررسی کمترین MIC مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) و بیشترین MIC مربوط به Ecoli بود. این اختلاف احتمالا مربوط به تفاوت در دیواره سلولی این دو گروه می باشد به عبارتی باکتری های گرم منفی به دلیل وجود لیپو پلی ساکارید (LPS) در دیواره سلولی خود در برابر محلول نانو نقره سد مقاومی دارند که این سد در باکتری های گرم مثبت وجود ندارد و در نتیجه حساسیت بیشتری به محلول نانونقره نشان می دهند و زودتر ازبین می روند. همانطور که در تحقیق دکتر سلمانی کمترین زمان مرگ مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با زمان ۴ ساعت بود. این مطالعه نشان داد که میزان مهارکنندگی ذرات نانو نقره به نوع باکتری بستگی دارد و باکتری های گرم مثبت در غلظت های کمتری از محلول نانونقره نسبت به باکتری های گرم منفی از بین می روند. باکتری *استرپتوکوک سانگوئیس* در دسته باکتری های گرم مثبت قرار دارد. [۳۶] اگر قرار باشد با کاهش سایز نانو ذرات و افزایش غلظت محلول نانونقره خاصیت آنتی باکتریال بیشتری داشته باشیم نتایج این تحقیق با یافته های ما درباره سایز و غلظت نانوذرات نقره همخوانی ندارد.

مطالعه ای invivo توسط دکتر خاکی و همکارانش در سال ۲۰۱۸ در بخش مراقبت های ویژه (ICU) مرکز آموزش پزشکی امین با هدف بررسی اثر دو دهانشویه نانوسیل و کلرهگزیدین در جلوگیری از عفونت ریوی در بیماران بستری در ICU (رده سنی ۱۸-۷۰ سال) انجام گرفت. در این بررسی در گروه مورد به بیماران دهانشویه نانوسیل ۳ بار در روز و در گروه شاهد دهانشویه ۰,۱۲٪ کلرهگزیدین ۳ بار در روز با روش های یکسان به مدت ۵ روز توصیه شد. شاخص عفونت ریوی در روز اول و روز پنجم با ایندکس modified عفونت ریوی (MCPIS) اندازه گیری و ثبت شد. نتیجه به این صورت بود که دهانشویه نانوسیل بهتر از دهانشویه کلرهگزیدین در پیشگیری از عفونت ریوی عمل کرد.[۳۷] این مطالعه از جهت اینکه اثر دهانشویه نانوسیلور را بر انسان بررسی کرده بود ارزشمند و قابل توجه است. کلرهگزیدین در محیط دهان رقیق می شود و با گذشت زمان از بین می رود اما یون های نقره در محیط دهان پایدارترند. همچنین دهانشویه ها در محیط دهان مدت زمان کوتاهتری در مواجهه با میکروب ها هستند (حدود ۳۰ ثانیه) که این زمان در آزمایشگاه به مراتب بیشتر است و در نتیجه آزمایش های آزمایشگاهی می تواند موثر باشد. اما به دلیل بازه زمانی نسبتا کوتاه بررسی انجام گرفته نمی توان در مورد سمیت احتمالی ذرات نانو بر بدن انسان به طور کامل اظهار نظر کرد.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج این مطالعه در روش آزمایشگاهی دهانشویه نانوسیلور در مقایسه با کلرهگزیدین دارای خاصیت باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی ناچیز است.

References:

1. D K Tri Putri, I L Kriswandini, Luthfi M. Characterization of Streptococcus sanguis molecular receptors for Streptococcus mutans binding molecules. Dent J 2016; 49(4): 213–6
2. Khoroushi M, Rabbani Khorasgani M, Aliasghari A. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of two plants extract on cariogenic *streptococci*. jdm 2017;30(1):12-۱۷.
3. Torkzaban P, Kadkhodazadeh M. Compare of sequntional effect of chlorhexidine NaF mouthwashes on plaque control. J Dent Sch 2012; 29(5) :399-405
4. Carranza FA. Clinical Periodontology. 9th ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 2002, 648-۶75.
5. Newman M, Takei H, Carranza F. Carranza`s clinical periodontology, 10thed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2011, 249-451-225.
6. Sadeghi M, Bahramabadi R, Assar S.A Antimicrobial Effects of Matrica® and Chlorehexidine Mouthwashes Compared with Sodium Hypochlorite on Enterococcus Faecalis and Candida Albicans: An In Vitro Study. J Mash Dent Sch 2016; 40(2): 177-86 .

7. Linde J, Karring T, Plang N. Clinical periodontology and implant dentistry. 3thed. Copenhagen: Munksgaard; 1998, 468, 475, 476, 479, 480.
8. Estrela C, Ribeiror RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. Braz Dent J 2003; 14(1): 58-62.
9. Ahrari F, Eslami N, Zamani R. The Effect of Mouthrinses Containing Metal Nanoparticles on Color Stability of Composite Resin. J Mash Dent Sch 2015; 39(1): 1-8.
10. Hoseinzadeh E, Samarghandi M, Alikhani M, Asgari G, Roshanaei G. Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on death kinetic of Gram-negative and positive bacterium. J Babol Univ Med Sci. 2012; 14(5): 13-19. [In Persian]
11. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. Water Res 2008; 42 (18): 4591-602.
12. Cozzolino C.A, Nilsson F و Lotti M, Sacchi, B, Piga A, Farris S. Exploiting the nano-sized features of microfibrillated cellulose (MFC) for development of controlled-Release packaging. Colloids Surf B. 2013; Biointerfaces 110:208-216.
13. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater 2008; 4(3): 707-16.
14. Alidadi H, Norouzian Ostad R, Esmaeili H. Effect of silver nanoparticles on inactivation of heterotrophic bacteria in water contaminated. J Sabzevar Univ Med Sci. 2016; 23(1) :40-47.
15. Fathi Hafshajani E, Fahami F. Amount of silver residual in liver, kidney and muscle of broilers chickens after administration of nanosilver.J food hyg. 2014; 4(13): 9-15.
16. Martinez, A., Lagaron, J., Ocio, M. Development and characterization of silverbased antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (Evoh) films for food-packaging applications. J. Agric. Food Chem.2012; 60(21):5350-59.
17. Sadeghi R, Owlia P, Yaraee P, Sharif F, Taleghani F. An in vitro comparison between antimicrobial activity of nanosilver and chlorhexidine against Streptococcus Sanguis and Actinomyces Viscosus. J Islam Dent Assoc Iran. 2012; 23(81): 225-31.
18. Zhong Lu , Kaifeng Rong , Ju Li , Hao Yang ,Rong Chen. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. J Mater Sci: Mater Med. 2013; 24(6): 1465–71.
19. Al-sharani A, Al-Hajj W & Madfa A. Clinical efficacy of nanosilver and chlorhexidine in the treatment of plaque-induced gingivitis: randomized controlled clinical trial. J Oral Res 2018; 7(7):238-44.
20. Esfahanian V, Mohamadi F, Amini S. An in vitro comparison of antimicrobial effect of nanosil and chlorhexidine mouthrinses. J Islam Dent Assoc Iran. 2012; 24(3) :238-43
21. Balouiri M, Sadiki M, SaadKoraich I. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016; 6(2): 71-٧9
22. Bohloli Khiavi R. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. Journal of laboratory and dignosis. 2017; 9(35): 43-53.
23. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofim formation. J Dent Res. 2010; 89(11): 1175-86.
24. Sondi I, Salopek-Sondi B. silver nanoparticle as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria. J col inter sci. 2004; 275(1): 177-182.
25. Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Schober B. Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on bacillus thuringiensis. Ecotox environ safe. 2014; 100(1): 122-130
26. Jha AK, Prasad K. Green synthesis of silver nanoparticles using Cycas leaf. Int J Green Nanotechnol: physical and chemistry. 2010; 1(2): 110-7.
27. Yavari M, Talebi AR, Rezaie Zarchi S, Razavi Sheshdeh SAR. Effects of different doses of silver nanoparticles on sperm parameters, chromatin structure and DNA integrity in mice. J cell tiss. 2015; 6(2): 177-185.
28. Roshanai K, Razavian MH, Ahmadi R, Heidari N, Masaeemanesh MB. The effect of oral nanosilver consumption on some hormonal, hematological and urine parameters of wistar rats. J Qom univ med sci. 2012; 6(23): 65-70.
29. Rezaee RanjbarS R, RezaeeZarchi S, Nasri S, Talebi A, Khoradmehr A, Razavi Shehde SA and et al. Toxicological effects of silver nanoparticles in Rats lung. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2012; 20(3): 269-76.

30. Seraj B, Mesbah M, Shahryari A, Najafabadi M. toxicity study of silver nanoparticles synthesized using seaweed Sargassum angustifolium in common carp, Cyprinus carpio. J Vet Res. 2016; 71(2): 219-227.
31. Nikita P.P, Prasanna T.D, Yoghesh J.K, Mahesh V.D, Shrikant B.K, Ayesha G.S and et al. In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. J Saudi Dent. 2019; 31(1): 76-83.
32. Zhong Lu , Kaifeng Rong , Ju Li , Hao Yang ,Rong Chen. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. J Mater Sci: Mater Med (2013) 24:1465–1471.
33. MoeinTaghavi A, Arab HR, Khajekaramodini M, Hoseini R, Danesteh H, Niknami H. An in vitro antimicrobial comparison of chlorhexidine, Persica and Miswak Extract. J Contemp Dent Pract. 2012; 13(2): 147-52.
34. Esfahanian.v, Mohamadi.F,. Amini .SH. An In Vitro Comparison of Antimicrobial Effect of Nanosil and Chlorhexidine Mouthrinses. J Islam Dent Assoc Iran.2012; 24 (3): 187-91
35. Azimi Laysar H, Niakan M, Mohammad Taghi G, Jafarian Z, Mostafavizade M, Niakan S. Comparison of the antibacterial activity of various concentrations of Nigella Sativa and Nanosilver on the growth of S.sanguis and S. mutans. J Res Dent Sci. 2013; 9 (4) :179-186.
36. Salmani MH, Mirhosseini M, Moshtagi laregani M, Akrami Kh. Survey of Silver Nanoparticles Antibacterial Activity Against GramPositive and Gram-Negative Bacteria in Vitro. J tolou-Behdasht Sci. 2017; 15(1):76-84[Persian]
37. Khaky B, Yazdannik AR, Mahjobipoor H. Evaluation the efficacy of Nanosil mouthwash on preventing pulmonary infection in Intensive Care Unit: a randomized clinical trial. Med Arch. 2018; 72(3): 206-9.