بررسی خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی افزودن ترکیب نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan به مواد بهسازی بافت مورد استفاده در پروتز کامل

دکتر سید امین موسوی [۱]، دکتر آذین خرم دل [۲#] دکتر حامد آقاجانزاده [۳]

۱- استادیار، گروه پروتز، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲-استادیار، گروه پریودنتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳-دانشجوی فارغ التحصیل، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

وصول مقاله: ۹۹/۲/۲۲ اصلاح نهایی: ۹۹/۵/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۲۲

Evaluation of antifungal and antibacterial properties of adding Ag, ZnO, Chitosan nanoparticles to tissue conditioners of complete dentures

Seyed Amin Mousavi[1], Azin Khorramdel[2*], HamedAghajanzadeh[3]

[1]*Assistant professor, Prosthodontics Dept, dental school, Tabriz University of medical science, Tabriz. Iran.*
[2]*Assistant professor, Periodontics Dept, dental school, Tabriz University of medical science, Tabriz. Iran.*
[3]*Graduated student, dental school, Tabriz University of medical science, Tabriz. Iran.*

Received: May 2020 Accepted: August 2020

Background and aim: Chitosan has the property of inhibition of the growth of many pathogenic bacteria and fungi. Tissue conditioners are good substances for the growth and colonization of a variety of micro-organisms. The aim of this research was to investigate the antibacterial and antifungal properties of Chitosan, ZnO and Ag nanoparticles added to tissue conditioners.
Material and Method: In this clinical trial study, 42 patients were randomly divided into 7 groups. In first group, the patients received the tissue conditioners (control group) and the second to seventh groups received the tissue conditioners included Chitosan, ZnO and Ag by weight percentage of 0.675, 1.25, 2.5, 5, 10, 20. After 24 and 48 hours using these substances, the microbial culture inside the mouth and denture was done by sterile swap.
Results: Complete inhibition of growth at 24 h and 48 h occurred in Candida albicans at 2.5 % concentration and in Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa and Streptococcus mutans at 5% concentration of Chitosan, ZnO and Ag nanoparticles. Over time, the growth rate of Candida albicans, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa and Streptococcus mutans was decreased.
Conclusion: Increasing the concentration of nanoparticles increases the growth inhibition in all studied microorganisms. By increase of growth inhibition, the growth of microorganisms also increases. An enhancement of 5% in the concentration of tissue conditioners results in complete inhibition of the studied microorganisms.

Key words: Chitosan,Zing Oxid, Ag, Nanoparticles, Tissue Conditioners, Microorganism

***Corresponding Author:** a_khorramdel@yahoo.com
J Res Dent Sci. 2020; 17:(3):171-181

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر آذین خرم دل نلفن: ۰۹۸۹۱۴۱۰۵۶۸۵۹+ پست الکترونیک:a_khorramdel@yahoo.com

خلاصه:

سابقه و هدف: چیتوسان خاصیت بازدارندگی رشد بسیاری از باکتری های بیماری زا و قارچها را دارد. مواد بهسازی بافتی بستر مناسبی برای رشد و کلونیزاسیون انواع میکرو ارگانیسم ها می باشند . این مطالعه با هدف بررسی خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی حاصل از افزودن نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan به ماده بهساز بافتی انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه کارآزمایی بالینی، ۴۲ بیمار کاندید دریافت مواد بهساز بافتی به طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند. در گروه اول بیماران مواد بهساز بافتی معمول را دریافت کردند (گروه کنترل) و در گروه های دوم تا هفتم به ترتیب بیماران مواد بهساز بافتی حاوی نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan با درصد وزنی ۰/۶۷۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰و ۲۰را دریافت نمودند. پس از گذشت ۲۴و ۴۸ ساعت از شروع استفاده مواد بهساز بافتی، کشت میکروبی از داخل دهان و داخل دنچر به وسیله سواپ استریل انجام گرفت.

یافته ها: مهار کامل رشد در زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، برای قارچ کاندیدا آلبیکانس در غلظت ۲/۵ درصد و برای انتروکوک فکالیس، سودوموناس آیروژنزا و استرپتوکوکوس موتانس در غلظت ۵ درصد نانوذرات Ag، **ZnO**، Chitosan اتفاق افتاد. همچنین با گذشت زمان، میزان رشد قارچ کاندیدا آلبیکانس، انتروکوک فکالیس، سودوموناس آیروژنزا و استرپتوکوکوس موتانس کمتر شد.

نتیجه گیری: افزایش غلظت نانو ذرات باعث افزایش مهار رشد کلیه میکروارگانیسم های مورد بررسی گردید. با افزایش زمان مهار رشد میکروارگانیسم ها بیشتر گردید. افزایش غلظت ۵ درصد جرمی بهساز بافتی منجر به مهار کامل میکروارگانیسم های مورد مطالعه می گردید.

کلید واژه ها: چیتوسان، زینک اکساید، نقره، ریزذرات، آماده سازی بافت، میکروارگانیسم

مقدمه:

بهسازهای بافتی برای درمان و آماده سازی بافت های آزرده ی حمایت کننده ی دنچر استفاده می شوند. در مواردی که خارج کردن دنچر از دهان امکان پذیر نباشد، می توان از یک لایه نازک ماده بهسازی بافت در سطح مخاطی دنچر استفاده کرد که به صورت یک ضربه گیر برای جلوگیری از تروما عمل می کند[۱]. این مواد همچنین جهت مقاصد تسکینی، تشخیصی، برگرداندن ارتفاع عمودی اکلوژن و اصلاح اکلوژن پروتز های قدیمی به کار می روند[۲]. متاسفانه در مواردی این مواد بهسازی خود بستر مناسبی برای رشد و کلونیزاسیون انواع میکروارگانیسم ها فراهم می آورند که می تواند عوارض ناشی از دنچر را تشدید نماید.[۱،۳]

یکی از شایعترین عوارض استفاده از دنچر های کامل بروز استوماتیت دنچری یا کاندیدیازیس مزمن آتروفیک می باشد[۴]. اتیولوژی استوماتیت دنچری شامل مجموعه ای از فاکتورهاست که کاندیدا به عنوان یکی از عوامل مهم در شروع این بیماری در افراد استفاده کننده از دنچر بیس به ثبت رسیده است.[۵]

هر چند در این موارد، درمان ضد قارچی موضعی و رفع عیب دنچر پیشنهاد می شود؛ ولی به دلیل شستشوی ناشی از بزاق و بلعیده شدن مواد ضد قارچی، نمی توان دوز مناسب دارو را در دهان ثابت نگه داشت. به علاوه مصرف داروهای موضعی ضد قارچی در بیماران مسن به علت طعم ناخوشایند، کاهش حافظه و قدرت حرکتی بسیار مشکل می باشد[۴]. ترکیب داروهای ضد قارچی و ضد میکروبی با ماده بهسازی بافت می تواند تشکیل پلاک میکروبی خصوصا بیوفیلم کاندیدایی را مهار کرده و برای پیشگیری از بروز و کنترل دنچر استوماتیت موثر واقع شود.[۶]

در مطالعه ی آزمایشگاهی(۲۰۱۱ Nam KY (با افزودن به میزان ۰/۵ درصد وزنی ماده بهسازی بافت GC(Soft-Liner) با نانو ذرات نقره و تهیه دیسکهایی از آن مهار کامل کلونیزاسیون قارچهایی مانند کاندیدا را گزارش کرد. در تحقیق مذکور کلونیزاسیون باکتریهایی مانند استرپتوکوکوس موتانس و استافیلوکوکوس ارئوس نیز با افزودن این نانوذرات به میزان ۰/۱ وزن ماده بهسازی بافت مهار شد. همچنین مشخص گردید که مهار رشد باکتری ها در لوله های آزمایش حتی در غلظت های پایین نقره نیز اتفاق می افتد؛ با افزایش غلظت نقره پیش از رسیدن به آستانه ی سمیت، می توان زمان رهایش نقره و پایداری خاصیت آنتی باکتریال را افزایش داد.[۷]

در مطالعه ای zhe li و همکاران نشان داده شد که نانو ذرات نقره اضافه شده به رزین اکریلیک به میزان ۱ تا ۵ درصد وزنی دارای خاصیت ضد قارچی بوده و همچنین از تشکیل biofilm جلوگیری می کند[۸]. در مطالعه ای Kristina نشان داد که نانو ذرات اکسید روی بصورت سوسپانسیون دارای خواص ضد قارچی و ضد میکروبی می باشد[۹]

چیتوسان یک پلیمر آلی تهیه شده از پوسته ی سخت آبزیانی همچون خرچنگ و میگو است که به دلیل دارا بودن خواص ضد باکتریایی به تازگی مورد توجه قرار گرفته است. به دلیل خواص منحصر به فرد چیتوسان، کاربرد آن در صنایع مختلف از جمله زیست فناوری[۱۰]، دارویی و پزشکی[۱۱] و صنایع غذایی[۱۲] گزارش شده است.

فیلمهای چیتوسانی، فیبرها، میکروذرات ونانوذرات چیتوسانی برای مهندسی بافت، انتقال دارو، واکسینه کردن و انتقال DNA کاربرد دارند[۱۳]. در حال حاضر، چیتوسان در علوم پزشکی و صنایع غذایی به دلیل خواص ضد باکتریایی ضد توموری[۱۴] و عملکرد هیپوکلسترومیک[۱۵] مورد توجه است. امروزه خواص ضد باکتری و ضد قارچی چیتوسان علیه طیف گسترده ای ازسویه های باکتریایی و قارچی گزارش شده است.[۱۶،۱۷]

در مطالعه ای طاهری و همکاران نشان دادند که چیتوسان، خواص ضد میکروبی بهتری علیه استافیلوکوکوس اورئوس و ویبریو اوگاوان دارد و خواص ضد قارچی چیتوسان بالا بوده و اختلاف معنی داری با داروهای معمول ضد باکتری و ضد قارچ (شامل استرپتومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و اریترومایسین) نشان داد. [۱۸]

هر چند مطالعات متعددی از خواص ضد میکروبی ماده چیتوسان انجام شده ولی بررسی اثر ترکیبی این ماده با نانو ذرات نقره در افزودن به مواد بهساز بافتی و نهایتا تاثیر این ترکیب بر خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی انجام نگرفته است. این مطالعه با هدف بررسی خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی حاصل از افزودن نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan به بهساز بافتی صورت خواهد گرفت.

مواد و روش ها:

در مطالعه حاضر که توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز با شماره IR.TBZMED.REC.1397.474 و در مرکز کارآزمایی بالینی ایران به شماره IRCT20150628022951N9به تصویب رسیده است، تعداد ۴۲ بیمار دچار دنچر استئوماتایتیس مراجعه کننده به برخی درمانگاههای شهر تبریز و مطب خصوصی مجری طرح، به صورت تصادفی انتخاب و بعد از اخذ رضایت نامه آگاهانه وارد مطالعه شدند. معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد: مصرف مواد مخدر یا سیگار توسط بیمار، حساسیت دارویی شناخته شده به ترکیبات روی، نقره یا سایر داروها و عدم وجود میکروارگانیسم های مورد نظر در تست های تکمیلی. بیماران بعد از ویزیت توسط دو نفر متخصص پروتزهای دندانی و تایید نیاز به درمان با مواد بهساز بافتی، به طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند. قبل از استفاده از مواد بهساز بافتی با سواپ استریل کشت میکروبی دهان جهت مقایسه انجام شد. در گروه اول بیماران مواد بهساز بافتی معمول را دریافت کردند (گروه کنترل) و در گروه های دوم تا هفتم به ترتیب بیماران مواد بهساز بافتی حاوی نانوذراتAg ، ZnO، Chitosanبا درصد وزنی ۰/۶۷۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ دریافت نمودند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از شروع استفاده مواد بهساز بافتی، کشت میکروبی از داخل دهان و داخل دنچر به وسیله سواپ استریل انجام گرفت.

-سنتز نانو ذراتAg ، ZnO ، Chitosan : ، نانوذراتAg ، ZnO، Chitosanبه روش ترسیب نوری-(photo precipitation technique)سنتز شدند. در این روش مقدار مشخصی نمک استات روی در اتانول و آب مقطر حل شده سپس با دستگاه اولتراسوند به مدت ۵ ساعت و با قدرت ۱۳۰ وات پخش یکنواخت ذرات انجام شده و داخل یک راکتور تحت رفلاکس (بازروانی) به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی گراد حرارت داده شد. در ادامه مقدار مشخصی نمک نیترات نقره به محلول گرم اضافه شد، یک ساعت باز روانی ادامه یافت. سپس محلول حاصل تحت نور فرابنفش به مدت ۲ ساعت بدون حرارت هم زده شد. در انتها رسوب حاصل

سانتریفیوژ شده و به کوره منتقل گردید و در دمای ۵۵۰ درجه‌ی سانتی گراد کلسینه شد. محصول حاصلAg ، ZnO، Chitosan می‌باشد. برای تهیه ی نانو ذرات چیتوسان ابتدا مقدار مشخصی چیتوسان را در اسید سیتریک حل کرده و مقداری آب مقطر به آن اضافه گردید، سپس به مدت ۵ ساعت با دستگاه اولترا سوند یکنواخت کرده و مقدار مشخصی تری پلی فسفات به آن اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت با همزن مکانیکی هم زده شد. پس از آن توسط دستگاه فریز درایر نانو ذرات چیتوسان تهیه گردید و سپس ژل نانو ذرات چیتوسان با غلظت مشخص با درصد معینی از نانو ذراتAg ، ZnO، Chitosanمخلوط شده و تا خمیری شدنِ مخلوط آن تحت خلا، آبگیری شد. خمیر حاصل ترکیب نانوذراتAg ، ZnO، Chitosanمی باشد.[۱۹]

نانوذراتAg ، ZnO، Chitosanتهیه شده توسط سه روش تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ، پراش اشعه ایکس (XRD) و طیف مادون قرمز (FT-IR) مورد تایید قرار گرفت.

-افزودن نانو ذراتAg ، ZnO، Chitosanبه بهساز بافتی:

این نانو ذرات با درصدهای جرمی (۰/۶۷۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰) طبق اصول روش) MIC حداقل غلظت مهار کننده) با مایع بهساز بافتی حل شده و پس از همگن سازی با پودر بهساز بافتی مخلوط شدند، لازم به ذکر است که در تعیین غلظت های نانو مواد به این مهم توجه شده است که افزودن نانو ذرات در غلظت های بیش از ۲۰٪ باعث ایجاد خواص توکسیک می شود[۷]. از این رو بیشترین غلظت مورد استفاده از نانو ذرات ۲۰٪ جرمی در نظر گرفته شده است و سپس طبق اصول روش MICاین عدد جهت رقیق سازی در هر مرحله نصف شده است[۲۰]. در واقع دلیل اختلاط با مایع، همگن سازی بهتر و تهیه ی محلول همگن تر می باشد[۷]. سپس این مواد به دنچرهای کامل ببیماران اضافه گردیدند.

مراحل میکروبیولوژی

برای تعیین اثر مواد بهساز بافتی حاوی نانوذرات Chitosan Ag, ZnO,بر روی میکروارگانیسمهای مورد نظر یعنی کاندیدا آلبیکانس،انتروکوک فکالیس، سودوموناس آیروژنزا واستریتوکوک موتانس با استفاده از یک سواپ استریل مخصوص، نمونه ها یکبار قبل از ساخت و تحویل بهساز بافتی و بار دیگر ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ناحیه عفونی برداشته شده (با استفاده از روش نمونه گیری تصادفی ساده) و به آزمایشگاه میکروب شناسی فرستاده شدند(شکل ۱)

نمونه برداری توسط سوآپ مخصوص

کاندیدا آلبیکانس

برای اثبات وجود قارچ کاندیدا آلبیکانساز تست آزمایشگاهی Germ Tube استفاده شد. نمونه های مشخص شده در محیط کشت ۴٪ اختصاصی SABOURAUD dextrose (SDA)کشت داده شده و پس از انکوباسیون به وسیله ویژگی های مورفولوژیک شمارش کلونی انجام گرفت.

انتروکوک فکالیس

نمونه های تعیین شده در محیط کشت اختصاصی m-Enterococcus Agar کشت داده شده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار گرفتند، سپس شمارش کلونی نمونه ها توسط Leselupe Magnifying Glass صورت گرفت.

سودوموناس آیروژنزا

نمونه های تعیین شده در محیط کشت اختصاصی Cetrimide Agar که فقط به کلونی های سودوموناس آیروژنزا اجازه رشد میدهند کشت داده شده و همانند سایر گروه ها انکوباسیون و سپس شمارش کلونی ها صورت گرفت.

استرپتوکوک موتانس

نمونه های تعیین شده در محیط کشت اختصاصی استرپتوکوکوس سلکتیو آگار کشت داده شده و پس از انکوباسیون همانند سایر میکروارگانیسم ها توسط ویژگی های مورفولوژیک تعداد کلونی ها اندازه گیری شدند.

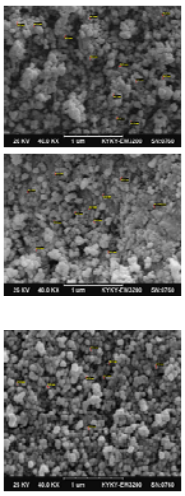
روش تجزیه و تحلیل اطلاعات:

نتایج مطالعه با استفاده از روش های آمار توصیفی (میانگین±انحراف معیار) گزارش شد. جهت مقایسه میزان رشد میکروارگانیسم در درصدهای مختلف وزنی، از آنالیز واریانس یک طرفه One-Way ANOVA استفاده شد. نرمالیتی داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد . آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS17 انجام شده و سطح معنی دار P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها:

-بررسی تصاویرمیکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نانوذرات در مقدار جزئی آب حل شده و سوسپانسیون حاصل در روی گرید طلا مورد تصویربرداری SEM قرار گرفت. شکل ۱ تصاویر SEM نانوپارتیکلهای تهیه شده را نشان می دهد.



(A)

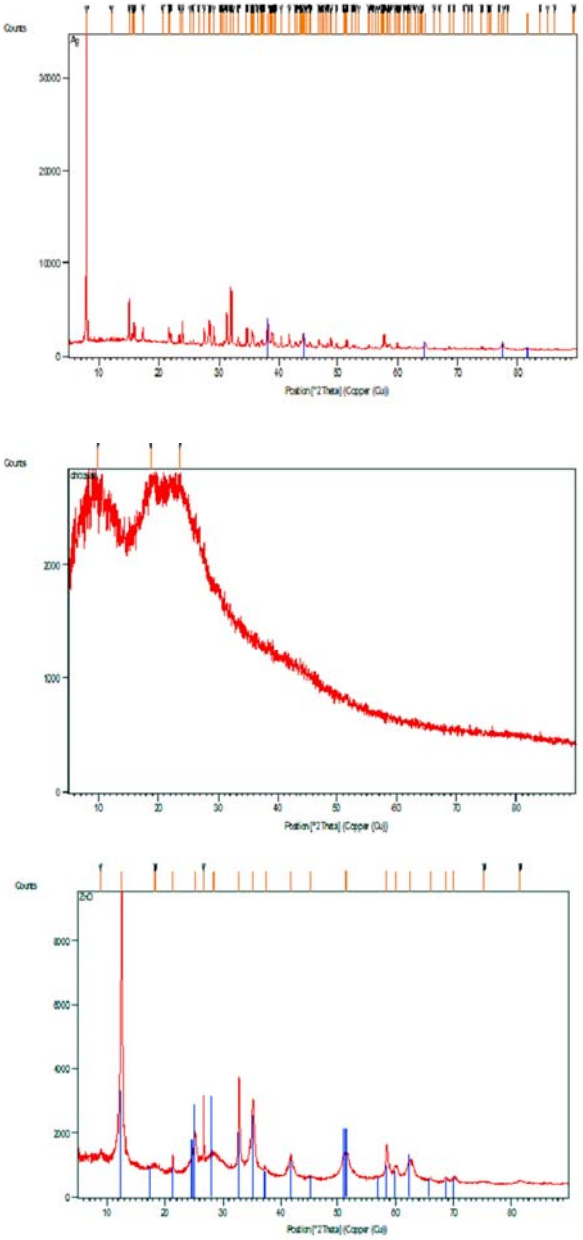
(B)

(C)

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانو ذرات با استفاده از SEM به دست آمد. پس از مطالعه‌ی دقیق و نقطه به نقطه‌ی نواحی مختلف نمونه، اندازه نانو ذرات مغناطیسی حدوداً بین ۴۰ تا ۱۰۰ نانومتر تعیین شد.

-بررسی پراش اشعه ایکس (XRD)

ساختار کریستالی نمونه‌ی مگنتیت سنتز شده بوسیله‌ی XRD آنالیز گردید. مقدار θ2 در گستره‌ی بین ۲۰ تا ۱۰۰ در نظر گرفته شد. همانطور که انتظار می‌رود در شکل های بدست آمده (a-نانوذره ی نقره و b- نانوذره ی چیتوسان و c- نانوذره ی روی اکسید) مشخص شده که با خطوط طیفی ارائه شده در مراجع مطابقت کامل دارد (شکل ۲).



شکل ۲-تصاویر مربوط بهپراش اشعه ایکسنانوذرات نقره (a) و نانوذرات چیتوسان (b) و نانوذرات اکسید روی(c)

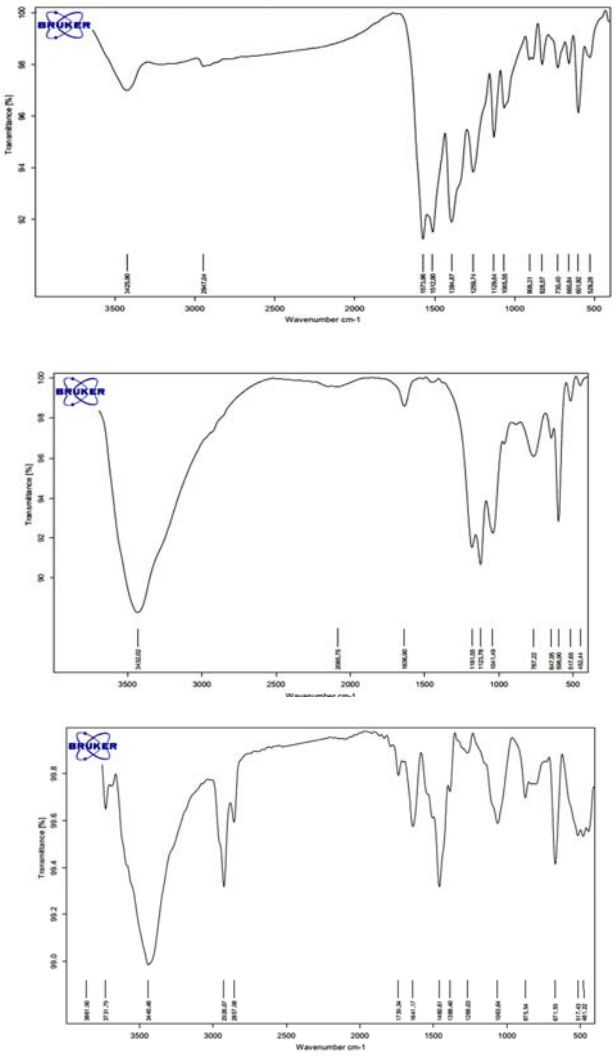
در کریستال‌های مربوط به نانوپارتیکل‌ها شدیدترین پیک

مربوطه تعیین کننده‌ی میانگین اندازه کریستال‌ها بوده که از فرمول دبای شررحدود اندازه نانوذرات بدست آمد. $Dhkl= \frac{0.9\lambda}{(\beta Cos\theta)}$

در این فرمول β نصف پهنای پراش XRD را نشان می‌دهد و λ برابر ۰/۱۵۴ نانومتر بوده و θ برابر نصف زاویه پراش 2θ است.

-بررسی طیف مادون قرمز(FT-IR)

طیف IR نانوذرات نقره(a) و نانوذرات چیتوسان(b) و نانوذرات روی اکسید(c) (ZnO)در شکل های زیر نشان داده شده که باندهای جذبی مربوط به گروه های عاملی هر نانو ذره موید سنتز صحیح آن ها می باشد (شکل ۳).



شکل ۳-تصاویر مربوط بهطیف مادون قرمز نانوذرات نقره (a) و نانوذرات چیتوسان (b) و نانوذرات اکسید روی(c)

بررسی خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی بهساز های بافتی با افزودن ترکیب نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan با درصدهای جرمی ۰/۶۷۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ جدول ۱ به توصیف میانگین و انحراف معیار کلونی های حاصل از رشد کاندیدا آلبیکانس، استرپتوکوکوس موتانس، انتروکوکوس فکالیس و سودوموناس آئروژنزا در طی دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در بهساز های بافتی حاوی درصدهای مختلف نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan پرداخته است.

جهت بررسی معنی داری خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی در بهساز های بافتی از آزمون ANOVA استفاده گردید. نتایج این تست نشان داد که خاصیت ضد قارچی و ضد باکتزیایی بهساز های بافتی با افزودن ترکیب نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan با درصدهای جرمی مختلف علیه کاندیدا آلبیکانس هم در ۲۴ ساعت و هم در ۴۸ ساعت تفاوت معنی داری دارد($p<.05$). جهت بررسی دو به دو هر درصد جرمی با یکدیگر از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد که نتایج در جدول (۲) آورده شده است.

برای قارچ کاندیدا آلبیکانس، مهار کامل رشد در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت ۲/۵ درصد اتفاق می افتد. بهترین غلظت تاثیر نیز در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، غلظت ۱/۲۵ درصد Ag، ZnO، Chitosan می باشد.در مورد باکتری استرپتوکوکوس موتانس، مهار کامل رشد در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در غلظت ۵ درصد نانو ذرات اتفاق می افتد. بهترین غلظت موثر در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، غلظت ۲/۵درصد Ag، ZnO، Chitosan می باشد. برای باکتری انتروکوکفکالیس، مهار کامل رشد در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در غلظت ۵ درصد نانو ذرات اتفاق می افتد. بهترین غلظت تاثیر در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، غلظت ۲/۵ درصد Ag، ZnO، Chitosan می باشد. در مورد باکتری سودوموناسآیروژنزا ، مهار کامل رشد در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در غلظت ۵ درصد نانو ذرات اتفاق می افتد. بهترین غلظت تاثیر در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، غلظت ۲/۵ درصد Ag، ZnO، Chitosan می باشد.

جدول ۱. تعداد کلونی های حاصل از رشد میکروارگانیسم ها در طی دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در بهساز های بافتی حاوی درصدهای مختلف نانوذرات Chitosan.ZnO،Ag

غلظت ترکیب نانوذرات	تعداد	کاندیدا آلبیکانس		استرپتوکوکوس موتانس		انتروکوکفکالیس		سودوموناس آیروژنزا	
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
		میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار
۰/۶۷۵	۶	۰/۶۳±۱/۷۱	۰/۶۸±۱/۸۹	۱/۶۲±۳/۶۲	۱/۶۳±۲/۸۴	۰/۳۱±۱/۴۱	۰/۳۴±۱/۲۹	۰/۸۱±۲/۴۵	۱/۱۸±۱/۵۲
۱/۲۵	۶	۰/۴۸±۰/۸۱	۰/۵۶±۰/۹۵	۱/۱۳±۳/۵۶	۱/۷۵±۲/۵۱	۰/۲۴±۱/۳۲	۰/۳۹±۱/۱۴	۰/۸۵±۲/۲۱	۰/۳۳±۱/۲۲
۲/۵	۶	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۵۲±۱/۱۶	۰/۳۷±۰/۶۵	۰/۱۱±۰/۵۳	۰/۱۵±۰/۳۳	۰/۹۹±۱/۳۰	۰/۲۴±۰/۴۰
۵	۶	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰
۱۰	۶	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰
۲۰	۶	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰
شاهد	۶	۵/۲۸±۱۱/۳۸	۳/۲۵±۱۵/۲۳	۴/۹۷±۱۱/۸۰	۳/۴۱±۱۴/۰۶	۳/۴۱±۹/۵۷	۴/۰۸±۱۰/۴۷	۴/۳۱±۱۰/۷۶	۳/۵۴±۱۳/۱۸

*اعداد مضربی از ۱۰۰۰ می باشند.

جدول ۲-آزمون توکی جهت مقایسه دو به دو غلظت های ترکیب نانو ذرات در بررسی خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی

غلظت (I)	غلظت (J)	کاندیدا آلبیکانس		استرپتوکوکوس موتانس		انتروکوکفکالیس		سودوموناس آیروژنزا	
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
		P value	P value	P value	P value	P value	P value	P value	P value
کنترل	۰/۶۷۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۰/۶۷۵	۱/۲۵	۰/۰۳۴	۰/۰۲۲	۰/۸۵۲	۰/۴۵۲	۰/۵۲۷	۰/۶۳۴	۰/۳۵۷	۰/۱۵۹
۱/۲۵	۲/۵	۰/۰۴۴	۰/۰۲۴	۰/۰۰۰	۰/۰۴۷	۰/۰۳۲	۰/۰۳۸	۰/۰۴۲	۰/۰۴۸
۲/۵	۵	–	–	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۵۸	۰/۲۸۱	۰/۰۳۷	۰/۲۵۸
۵	۱۰	–	–	–	–	–	–	–	–
۱۰	۲۰	–	–	–	–	–	–	–	–

در باکتری انتروکوکفکالیس، مهار کامل رشد در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در غلظت ۵ درصد نانو ذرات اتفاق می افتد. بهترین غلظت تاثیر در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، غلظت ۲/۵ درصدAg ، ZnO، Chitosan می باشد.

برای باکتری سودوموناسآیروژنزا ، مهار کامل رشد در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در غلظت ۵ درصد نانو ذرات اتفاق می افتد. بهترین غلظت تاثیر در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، غلظت ۲/۵ درصدAg ، ZnO، Chitosan می باشد.

بحث

خاصیت ضدمیکروبی فلزات، به سطح تماس آنها بستگی دارد. با کاهش اندازه ی ذرات فلزی و افزایش نسبت سطح به حجم آنها، قدرت ضد باکتریایی این مواد افزایش می یابد. تبدیل ذرات از اندازه ی میکرومتر به نانومتر، باعث بهبود و افزایش برهم کنش الکترواستاتیکی بین سطح باکتری و نانوذره گردیده و خاصیت ضدمیکروبی افزایش می یابد و افزودن این نانو ذرات به سایر مواد باعث خواص ضد باکتریایی خواهد شد[۲۱].

خاصیت ضدمیکروبی چیتوسان گستره ی وسیعی از میکروارگانیسم ها را که شامل قارچ ها و باکتری ها و ویروس ها میشود در بر می گیرد. این ویژگی چیتوسان به فاکتورهایی مثل نوع چیتوسان، درجه پلیمریزاسیون، میزبان، ترکیب شیمیایی غذایی سوبسترا، شرایط محیطی مثل میزان فعالیت آبی سوبسترا یا میزان رطوبت آن یا هر دو بستگی دارد. بین خاصیت ضد میکروبی چیتوسان و مشتقاتش هم تفاوت هایی وجود دارد . چیتوسان اثر ضد میکروبی سریع تری بر روی قارچ ها و جلبک ها نسبت به باکتری ها دارد. اثر بازدارندگی چیتوسان در PH=6 بیشتر از ۷ است چون در محیط بازی گروه های آمینی آزاد هستند[۱۸]. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی افزودن ترکیب نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan به مواد بهسازی بافت مورد استفاده در پروتز کامل انجام گرفت.

موسوی و همکاران در سال ۲۰۱۸ مطالعه ای با هدف بررسی اثر ضد میکروبی و ضد قارچی ترکیب مواد بهساز بافتی با نانو ذرات چیتوسان در پروتز کامل انجام دادند نتایج این مطالعه نشان داد غلظت های متفاوت نانوذرات چیتوسان اثر مهاری روی رشد میکرو ارگانیسم ها داشت[۲۲] و هچنین نتیجه مطالعه ای که توسط موسوی و همکاران تحت عنوان ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی و ضد قارچی ترکیبات مواد بهساز بافتی با نانوذرات ZnO-Ag در پروتز کامل انجام شد نشان داد که ترکیب نانوذرات ZnO-Ag به ماده بهساز بافتی باعث مهار کامل رشد میکروارگانیسم های مورد بررسی شده است[۲۳]. نتایج حاصل از این مطالعات تایید کننده نتایج مطالعه حاضر می باشد.

در مطالعه ی حاضر افزودن نانوذرات به بهساز بافتی باعث کاهش رشد کاندیدا آلبیکانس گردید. بطوریکه افزودن غلظت ۰/۶۲۵ درصد جرمی نانو ذرات باعث کاهش معنی داری در رشد کاندیدا نسبت به نمونه ی شاهد در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت گردیده است. در زمان ۲۴ و۴۸ ساعت در غلظت ۲/۵ درصد مهار کامل رشد اتفاق افتاد.

Nam KY در مطالعه خود با موضوع تاثیر ضد میکروبی بهساز بافتی حاوی نانوذرات نقره نشان داد که افزودن نانو ذرات نقره به ماده بهساز بافتی باعث مهار کلونیزاسیون کاندیدا می گردد[۷].Radnai و همکاران نیز نشان دادند که افزایش مواد ضد قارچی به ماده ی بهساز بافتی ارتباط معنی داری با غلظت و زمان تماس با ماده ی ضد قارچی دارد[۲۴]. نتایج مطالعه ی حاضر نیز نشان داد که افزایش غلظت و زمان تماس با نانو ذرات، منجر به افزایش مهار رشد می گردد. همچنین در مطالعه حاضر نشان داده شد که مهار کامل رشد کاندیدا آلبیکانس در غلظت ۲/۵ درصد رخ می دهد که از این جهت با نتیجه مطالعه Nam KY مطابقت دارد.

در مطالعه آزمایشگاهی Ballal و همکاران که به بررسی حساسیت کاندیدا آلبیکانس و انتروکوکوس فکالیس به چیتوسان و کلرهگزیدین پرداخته است، نشان داد که تاثیر

چیتوسان بر روی مهار رشد کاندیدا آلبیکانس بیشتر از کلرهگزیدین می باشد و ترکیبی از ژل ۲٪ کلرهگزیدین با ژل ۲٪ چیتوسان حداکثر مهار رشد برای کاندیدا آلبیکانس را دارد[۲۵] که بیانگر این است که چیتوسان خواص ضد قارچی خود را در ترکیب با سایر مواد از دست نمی دهد، بلکه چیتوسان در کنار کلرهگزیدین یک تاثیر سینرژیک بر روی مهار رشد کاندیدا آلبیکانس دارد. همچنین در این مطالعه در خصوص مهار رشد انتروکوک فکالیس نیز به نتیجه مشابهی دست یافتند، به صورتی که تاثیر چیتوسان بر روی مهار رشد انتروکوک فکالیس بیشتر از کلرهگزیدین گزارش شد و ترکیبی از ژل ۲٪ کلرهگزیدین با ژل ۲٪ چیتوسان حداکثر مهار رشد برای انتروکوک فکالیس را داشت[۲۵].

در مطالعه ی حاضر نیز افزایش نانوذرات به بهساز بافتی باعث کاهش رشدانتروکوک فکالیس گردید، به طوری که افزایش غلظت ۰/۶۷۵ درصد جرمی نانو ذرات باعث کاهش معنی داری در رشد انتروکوک فکالیس نسبت به نمونه ی شاهد در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت گردید. همچنین افزایش غلظت نیز باعث کاهش بیشتر رشدانتروکوک فکالیس نسبت به غلظت کمتر شد به طوری که مهار کامل رشد در غلظت ۵ درصد نانو ذرات Ag، ZnO، Chitosan در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت رخ می دهد. Mohire و Yadav نیز در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که خمیردندان های گیاهی حاوی چیتوسان کاهش قابل توجهی در شاخص پلاک و تعداد باکتری دارند[۲۶]. در مطالعه Shaik و همکاران تاثیر افزایش چیتوسان را در تغییر خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی خمیرآنتی بیوتیک و هیدروکسید کلسیم بررسی کردند و نتیجه گرفتند که افزایش چیتوسان در هر دو ماده باعث افزایش خواص ضد باکتریایی علیه انتروکوک فکالیس و ضد قارچی گردید[۲۷] که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد.

همچنین نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که افزایش نانوذرات به بهساز بافتی باعث کاهش رشدسودوموناس آیروژنزا و استرپتوکوکوس موتانس گردید. بطوریکه افزایش غلظت ۰/۶۷۵ درصد جرمی نانو ذرات تاثیر مشابه انتروکوک فکالیس را در کاهش رشدسودوموناس آیروژنزا و استرپتوکوکوس موتانس دارد. در این دو نیز مهار کامل رشد در غلظت ۵ درصد نانو ذرات در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت اتفاق می افتد.

Nam KY نیز نشان داد که افزودن به میزان یک درصد جرم ماده‌ی بهساز بافتی با نانو ذرات نقره باعث مهار کلونیزاسیون کاندیدا می‌گردد(۷).مطالعات متعددی نیز خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی نانوذرات نقره و اکسید روی را در مواد دندانی نشان داده است از جمله می توان به مطالعات Li Z و همکاران ، Kasraei و همکاران در بررسی خواص نانو ذرات نقره، kairyte و همکاران،Ramezanzadeh و همکاران در بررسی خواص نانو ذرات اکسید روی اشاره کرد [۸، ۹، ۲۸، ۲۹].

Taheri و همکاران نشان دادند که چیتوسان،خواص ضدمیکروبی بهتری علیه استافیلوکوک اورئوس دارد و خواص ضد قارچی چیتوسان بالا بوده و اختلاف معنی داری با داروهای معمول ضد باکتری و ضد قارچی نشان داد[۱۸]. Saadetmand و همکاران اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت چیتوسان TiO–2 را روی باکتری های اشریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس جهت به کارگیری روی گاز استریل بیمارستانی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که این نانو کامپوزیت نزدیک به ۱۰۰٪ از رشد باکتری ها جلوگیری کرده و در حضور این ماده هیچ باکتری رشد پیدا نکرد(۳۰). Rejane و همکاران نشان دادند که قدرت مهار رشد چیتوسان به تنهایی و یا در ترکیب با سایر مواد به عوامل مختلفی از جمله غلظت ترکیب مورد استفاده و زمان مورد بررسی دارد [۳۱]. در مطالعه ی حاضر نیز افزایش غلظت ترکیب نانو ذرات باعث افزایش قدرت مهار رشد گردیده است که با نتیجه مطالعه ی Rejane هم خوانی دارد.

Mousavi و همکاران نیز در مطالعه خود در سال ۲۰۲۰ به این نتیجه رسیدند که ترکیب نانوذرات Ag، ZnO، Chitosan مانع از رشد باکتری ها و قارچ ها در ماده بهساز بافتی می گردد و نانوذرات باعث مهار بیشتر رشد قارچ ها نسبت به باکتری ها می گردد که نتایج این مطالعه نیز هم سو با مطالعه حاضر می باشد [۳۲].

نتیجه گیری:

افـزایش غلظـت نـانو ذرات باعـث افـزایش مهـار رشـد کلیـه میکروارگانیسم های مورد بررسی گردید. با افزایش زمـان مهـار رشد میکروارگانیسم ها بیشتر گردید. افزایش غلظـت ۵ درصـد جرمی بهساز بافتی منجر به مهـار کامـل میکروارگانیسـم هـای مورد مطالعه می گردید.

.

References:

1- J A McCarthy, J B Moser.Tissue conditioning as functional impression materials and techniques. Dent Clin North Am. 1984;28:239-51.

2-Zarb GA, Hobkirk J, Eckert S, Jacob R. Prosthodontic Treatment for Edentulous Patients-E-Book: Complete Dentures and Implant-Supported Prostheses: Elsevier Health Sciences; 2013.

3-Rathore P, Hegde A, Ginjupalli K, Upadhya N. Evaluation of antifungal activity of additives to resilient liners: an in vitro pilot study. Trends in Biomaterials and Artificial Organs. 2009;23(1):6-9.

4-Chow C, Matear D, Lawrence H. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. Gerodontology. 1999;16(2):110-8.

5-Burket LW, Greenberg MS, Glick M. Burket's oral medicine: diagnosis and treatment: BC Decker; 2003.

6-Warnakulasuriya K, Samaranayake L, Peiris J. Angular cheilitis in a group of Sri Lankan adults: a clinical and microbiologic study. Journal of oral pathology & medicine.1991;20(4):172-5.

7-Nam K-Y. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. The journal of advanced prosthodontics.2011;3(1):20-4.

8-Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on Candida albicans adhesion and biofilm formation. Gerodontology.2016 Jun;33(2):209-16.

9-Kairyte K, Kadys A, Luksiene Z. Antibacterial and Antifungal Activity of Photoactivated ZnO Nanoparticles in Suspension. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2013;128:78-84.

10-Mao H-Q, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. Journal of controlled release. 2001;70(3):399-421.

11-Kumar MR, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb A. Chitosan chemistryand pharmaceutical perspectives. Chemical reviews. 2004;104(12):6017-84.

.12-Chien P-J, Sheu F, Yang F-H. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. Journal of food engineering. 2007;78(1):225-9.

13-E Y. Chitosan :A Versatile Biomaterial. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2004;553.

14-TOKORO A, TAKEWAKI N, Suzuki K, MIKAMI T, SUZUKI S, SUZUKI M. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexanse and chitohexaose against Meth-A solid tumor. Chemical and Pharmaceutical Bulletin.1988;36(2):784-90.

15-Sugano M, Yoshida K, Hashimoto M, Enomoto K, Hirano S. Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosans in rats. Advances in chitin and chitosan. 1992;2:472e8.
16-Fujimoto T, Tsuchiya Y ,Terao M, Nakamura K, Yamamoto M. Antibacterial effects of Chitosan solution® against Legionella pneumophila, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus. International journal of food microbiology. 2006;112(2):96-101.
17-Xu J, Zhao X, Han X, Du Y. Antifungal activity of oligochitosan against Phytophthora capsici and other plant pathogenic fungi in vitro. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2007;87(3):220-8.
18-Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S. Antimicrobial and Antifungal Effects of Acid and Water-Soluble Chitosan Extracted from Indian Shrimp (Fenneropenaeus indicus) Shell. J Fasa Univ Med Sci. 2013; 3 (1) :49-55.
19-Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. ZnO nanofluids–A potential antibacterial agent. Progress in Natural Science. 2008;18(8):939-44.
20-Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Povey M, York D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnOnanoparticles (ZnO nanofluids). Journal of Nanoparticle Research. 2007;9(3):479-89.
21-El-Nour KMA, Eftaiha Aa, Al-Warthan A, Ammar RA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arabian journal of chemistry. 2010;3(3):135-40.
22-Mousavi SA, Ghotaslou R, Kordi S, Khoramdel A, Aeenfar A, Kahjough ST, et al. Antibacterial and antifungal effects of chitosan nanoparticles on tissue conditioners of complete dentures. International journal of biological macromolecules. 2018;118:881-5.
23-Mousavi SA ,Ghotaslou R, Akbarzadeh A, Azima N, Aeinfar A, Khorramdel A. Evaluation of antibacterial and antifungal properties of a tissue conditioner used in complete dentures after incorporation of ZnO–Ag nanoparticles. Journal of Dental Research, Dental Clinics ,Dental Prospects. 2019;13(1):11.
24-Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of Candida albicans. Gerodontology. 2010;27(4):292-6.
25-Ballal N, Kundabala M, Bhat K ,Acharya S, Ballal M, Kumar R, et al. Susceptibility of Candida albicans and Enterococcus faecalis to Chitosan, Chlorhexidine gluconate and their combination in vitro. Australian Endodontic Journal. 2009;35(1):29-33.
.26Mohire NC, Yadav AV. Chitosan-basedpolyherbal toothpaste: as novel oral hygiene product. Indian Journal of Dental Research. 2010;21(3):380.
27-Shaik J, Garlapati R, Nagesh B, Sujana V, Jayaprakash T, Naidu S. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste andcalcium hydroxide using chitosan as carrier .28-Kasraei S, Sami L, Hendi S, AliKhani M-Y, Rezaei-Soufi L, Khamverdi Z. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on Streptococcus mutans and Lactobacillus. Restorative dentistry & endodontics. 2014;39(2):109-14.
29-Ramazanzadeh B, Jahanbin A, Yaghoubi M, Shahtahmassbi N, GhazviniK, Shakeri M, et al. Comparison of antibacterial effects of ZnO and CuO nanoparticles coated brackets against Streptococcus mutans. Journal of Dentistry. 2015;16(3):200.
30-Jayakumar R, Prabaharan M, Kumar PS, Nair S, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology advances. 2011;29(3):322-37.
31-Goy RC, Britto Dd, Assis OB. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros. 2009;19(3):241-7
32-Mousavi SA, Ghotaslou R, Khorramdel A, Akbarzadeh A, Aeinfar A. Antibacterial and antifungal impacts of combined silver, zinc oxide, and chitosan nanoparticles within tissue conditioners of complete dentures in vitro. Irish journal of medical science. 2020.