بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات نقره در رزین‌های آکریلی

احمد قهرمانلو*، امید رجبی، کیارش قزوینی***، امیرطاهر میرمرتضوی****#، محسن متولی حقیقی*****
* دانشیار پروتزهای دندانی، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
** دانشیار گروه شیمی داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
*** استادیار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**** استادیار پروتزهای دندانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
***** دندانپزشک

تاریخ ارائه مقاله : ۹۱/۱۱/۱۸ – تاریخ پذیرش : ۹۲/۳/۲۶

Antifungal Effect of Silver Nanoparticles in Acrylic Resins

Ahmad Ghahremanloo*, Omid Rajabi, Kiarash Ghazvini***, AmirTaher Mirmortazavi****#, Mohsen Motevali Haghighi*****
** Associate Professor of Prosthodontic, Dental Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
*** Associate Professor, Dept of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
**** Assistant Professor of Microbiology, Microbiology Research Center, Buali Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
***** Assistant Professor of Prosthodontic, Oral & Maxillofacial Diseases Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
****** Dentist*

Received: 6 February 2013; Accepted: 16 June 2013

Introduction: In patients using dental prosthesis, growth of various microorganisms under the prosthesis base which leads to inflammation and infections such as candidiasis is common. The aim of this study was to assess the antifungal effects of acrylic resins containing silver nanoparticles on candida Albicans.

Materials & Methods: To accomplish this *in vitro* study inorder to prepare acrylic samples, metallic cylindricals with a diameter of 10mm and thickness of 4mm were used. Forty samples as standard control group and 40 samples containing silver nanoparticles in four different concentrations were used. Immersion of samples in fungal suspension (standard and hospitally isolated) were carried out to accomplish antifungal tests. After 0,1,6 and 24 hours the fungal colonies were counted. To describe the data and to compare groups, student-*t* test was used.

Results: In the silver nanoparticles with 2.5% concentration, the highest mean difference for standard candida Albicans after 24 hours of exposure time was 501.0±23.1 and for 5% concentration after 6 hours of exposure time was 953±87 and for 10% concentration after 6 hours of exposure time was 1000±24.9.

Conclusion: In acrylic resins, increasing both the silver nanoparticles concentration and the exposure time will increase the antifungal effect.

Key words: Silver nanoparticles, acrylic resin, antifungal effect.

 # Corresponding Author: mirmortazaviat@mums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2013; 37(3): 239-48 .

چکیده

مقدمه: در بیماران دارای دنچر، رشد میکروارگانیسم‌های مختلف در زیر بیس پروتز و در نتیجه التهاب و عفونت‌هایی مثل کاندیدیازیس شایع است. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر ضدقارچی آکریل‌های حاوی نانوذرات نقره بر کاندیدا آلبیکانس بود.

مولف مسؤول، نشانی: مشهد، میدان پارک، دانشکده دندانپزشکی، گروه پروتزهای دندانی، تلفن: ۱۵-۸۸۲۹۵۰۱-۰۵۱۱
E-mail: mirmortazaviat@mums.ac.ir

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، برای تهیه نمونه‌های آکریلی از قطعات استوانه ای فلزی به قطر ۱۰ و ارتفاع ٤ میلی متر استفاده شد. ٤۰ عدد نمونه به عنوان گروه کنترل و ٤۰ نمونه حاوی نانوذرات نقره با چهار غلظت مختلف تهیه گردید. برای انجام آزمایشات ضدقارچی از روش غوطه‌ورسازی نمونه‌ها در سوسپانسیون قارچی استاندارد و بیمارستانی استفاده شد. در زمان‌های صفر، ۱، ٦ و ۲٤ ساعت کلونی‌های قارچی شمارش گردید. توصیف داده‌ها و مقایسه گروه‌ها توسط آزمون *t*-student انجام شد.

یافته‌ها: بیشترین میانگین کاهش تعداد قارچ، مربوط به کاندیدا آلبیکانس استاندارد در مجاورت با آکریل حاوی نانوذرات با غلظت ۲/۵ درصد و در زمان ۲٤ ساعت (۲۳/۱±۵۰۱)، با غلظت ۵ درصد و در زمان ٦ ساعت (۸۷±۹۵۳) و با غلظت ۱۰ درصد و در زمان ۲٤ ساعت (۲٤/۹±۱۰۰۰) بود.

نتیجه گیری: در رزین آکریلی حاوی نانوذرات نقره با افزایش زمان تماس و غلظت نانوذرات نقره اثر ضدقارچی بیشتر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، آکریل رزینی، اثر ضدقارچی.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۲ دوره ۳۷ / شماره ۳ : ٤۸-۲۳۹ .

مقدمه

از آن جایی که اصلی‌ترین ماده برای جایگزینی نسوج از دست رفته در بیماران دندانپزشکی (به خصوص بیماران بی‌دندان) آکریل می‌باشد، با گذشت زمان و علیرغم بهبود خواص مکانیکی و زیبایی این مواد، شاهد رشد زیاد میکروبی در زیر بیس‌های رزینی آکریلی در بیماران هستیم و تاکنون توجه زیادی به خواص ضدقارچی آکریل‌های رزینی نشده است.از جمله عفونت‌های شایع، زخم دهانی وابسته به دنچر است که به صورت التهاب منتشر (بیشتر در نواحی ماگزیلاری) دیده می‌شود و در ۷۰ درصد موارد همراه با قارچ کاندیدا آلبیکانس می‌باشد. از آن جایی که تقریباً اکثر روش‌های درمانی رایج (نیستاتین، فلوکونازول و در موارد شدیدتر آمفوتریسین B) دارای اثر کوتاه مدت هستند و کارآیی کافی را ندارند، روش جدید استفاده از آکریل‌های جدید حاوی نانوذرات نقره می‌باشد.[۱] Kawahara و همکاران[۲] نشان دادند که باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت به زئولیت نقره حساسیت بیشتری دارند. بنابراین ساختار دیواره‌های سلولی ممکن است در حساسیت دخیل باشد. دیواره سلولی گونه‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حاوی ۳ تا ۲۰ برابر پپتیدوگلیکان بیشتر است. بر این اساس، باکتری‌های گرم مثبت ممکن است در مقایسه با گونه‌های گرم منفی به یون نقره کمتری اجازه رسیدن به غشای پلاسمایی را بدهند. Kim و همکاران[۳] اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره علیه مخمر، اشرشیاکلی و استافیلوکوک طلایی را مورد بررسی قرار دادند. رشد مخمر و اشرشیاکلی در غلظت‌های پایینی از نانوذرات نقره متوقف شدند، در حالی که اثرات مهار رشدی روی استافیلوکوک طلایی خفیف بود. Kassaee و همکاران[٤] نشان دادند که رزین آکریلی حاوی ۰/۵٪ نانوذرات نقره اثر ضدمیکروبی قوی در برابر باکتری اشرشیاکلی دارد. همچنین افزودن این مقدار نقره به رزین آکریلی باعث بهبود نسبی خواص مکانیکی رزین آکریلی حاصله گردید. Francisco و همکاران[۵] نشان دادند که نانوذرات نقره در مقایسه با نانوذرات طلا و زینک اکسید با غلظت پایین‌تری از رشد گونه‌های استرپتوکوک موتانس ممانعت می‌کند. بنابراین نانوذرات نقره ممکن است تأثیر زیادی روی استرپتوکوک موتانس و پوسیدگی‌ها داشته باشند. همچنین کاهش اندازه نانوذرات باعث افزایش سطح تماس می‌شود که یک شرط مهم برای اثرات نقره است. Casemiro و همکاران[۱] نشان دادند افزودن ۵٪ و ۲/۵٪ نانوذرات نقره به رزین آکریلی اثر ضدمیکروبی بالایی در برابر قارچ کاندیداآلبیکانس اعمال می‌کند. خواص مکانیکی رزین آکریلی، به میزان درصد نانوذرات مخلوط شده، بستگی

داشت. Kim و همکاران[٦] نشان دادند که نانوذرات نقره ممکن است با ایجاد گسستگی در ساختار غشای سلولی، اثر ضدقارچی خود را اعمال کند. نانوذرات نقره اثر ضدمیکروبی قوی روی روی کاندیدا آلبیکانس داشت که مشابه اثر ضدقارچی آمفوتریسین B (به عنوان کنترل) بود. در حالی که اثر همولیتیکی نانوذرات نقره روی گلبول قرمز کمتر از آمفوتریسین B بود. Espinosa و همکاران[۷] اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره علیه استرپتوکوک موتانس را بررسی کردند. نتایج نشان داد که هر چه اندازه نانوذرات نقره کوچکتر باشد، اثر ضدمیکروبی آنها افزایش می‌یابد که علت این امر افزایش سطح تماس نانوذرات می‌باشد. Sadeghi و همکاران[۸] فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر علیه استافیلوکوک طلایی (گرم مثبت) و اشرشیاکلی (گرم منفی) را بررسی کردند. به طور نسبی، میزان اثر ضد باکتریایی علیه اشرشیاکلی در مقایسه با استافیلوکوک طلایی پایین‌تر بود، که احتمالاً به دلیل تفاوت در دیواره‌های سلولی بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. نتایج این مطالعه نشان می‌داد که اثر ضدمیکروبی فقط تحت تاثیر شکل نانوذرات نقره نبود، بلکه نوع باکتری نیز در میزان اثر نانوذرات تاثیر داشت.

Li و همکاران[۹] نشان دادند که حداقل غلظت باکتریسیدال نانوذرات نقره برای استافیلوکوک طلائی ۲۰μg/ml بود. نقره در مقایسه با بسیاری از فلزات دیگر بیشترین سمیت را برای میکروارگانیسم‌ها داشت. Nasrollahi و همکاران[۱۰] نشان دادند که اثر آمفوتریسین B روی کاندیدا آلبیکانس و ساکارومایسز سروزیه، بیشتر از فلوکونازول بود. نانوذرات نقره اثر قوی‌تری در مقایسه با آمفوتریسین B و فلوکونازول روی این دو قارچ داشت.

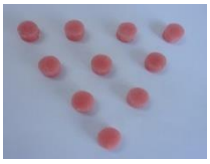
هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدقارچی آکریل‌های جدید حاوی نانوذرات نقره بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، اثر ضدقارچی نمونه‌های آکریلی با چهار غلظت مختلف نانوذرات نقره بر روی سویه‌های استاندارد و بیمارستانی قارچ کاندیدا آلبیکانس مورد آزمایش قرار گرفت. سپس داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تهیه نانوذرات نقره، کلوئید آن از طریق فرایند شیمیایی احیا، تهیه گردید. نیترات نقره Packed in ghataran shimi T.Co Iran-M:169.8 Cod (No:15102) با غلظت یک هزارم مولار درون آب حل گردید و گرما داده شد تا به دمای۸۰ درجه برسد، سپس پنج میلی‌لیتر از محلول تری‌سدیم سیترات (TriSodium citrate granules 99.99 Propuct of USA MSDS) یک درصد به صورت قطره قطره درون محلول که به شدت در حال تکان دادن بود، اضافه شد. محلول تا زمانی که به رنگ قهوه‌ای در آمد، حرارت داده شد. نهایتاً محلول در حالی که تکان داده می‌شد تا دمای اتاق سرد شد. جهت مشخص کردن شکل نانوذرات تولید شده از میکروسکوپ الکترونی استفاده گردید و نتایج نشان داد که ذرات کروی شکل می‌باشد. برای اندازه‌گیری سایز نانوذرات از دستگاه Nanosizer (Malvern Instrument, UK) استفاده گردید. میانگین سایز ذرات حدود ۲۲ نانومتر بود. در انتها برای تعیین بار سطحی نانوذرات نقره از دستگاه Zeta potential استفاده گردید که براساس نتایج حاصله بار سطحی ۲- بود. برای تهیه نمونه‌های آکریلی بدون نانوذرات نقره (نمونه‌های کنترل) از قطعات استوانه ای به قطر ده میلی‌متر و ضخامت چهار میلی‌متر استفاده شد. (تصویر ۱) ابتدا گچ و آب طبق دستور کارخانه مخلوط گردید و تا ده میلی‌متری لبه فوقانی قسمت تحتانی مفل ریخته شد. بعد از سفت شدن گچ روی آن سیلیکون (پوتی) به ضخامت حدود ده میلی‌متر قرار داده شد. در حالی که پوتی در

حال سفت شدن بود ده عدد استوانه درون آن قرار داده شد به طوری که کل ضخامت استوانه‌ها درون پوتی مدفون گردید. سپس قسمت فوقانی مفل نیز روی قسمت تحتانی قرار داده شد و درون مفل گچ ریخته شدو زیر دستگاه پرس هیدرولیک قرار گرفت. بعد از ۳ ساعت، استوانه‌های فلزی بیرون آورده شد و برای تهیه خمیر آکریلی، پودر و مایع به نسبت کارخانه آماده شد. مخلوط هنگامی که در مرحله خمیری بود درون فضاهای خالی قرار داده شد. نهایتاً مفل زیر دستگاه پرس و سپس درون حمام آب گرم با دمای ۷۲°c به مدت ٦ ساعت قرار داده شد. بعد از ۲٤ ساعت مفل باز شد و نمونه‌ها از درون گچ در آورده شد. توسط آکریل‌بُر، اضافات تراشیده و درون سرم فیزیولوژی قرار داده شد. (تصویر ۲)

تصویر ۱ : استوانه‌های فلزی (Stainless steel)



تصویر ۲ : نمونه‌های آکریلی نهایی بدون نانوذرات نقره

برای تهیه نمونه‌های آکریلی حاوی نانوذرات نقره، نیاز بود، کلوئید نانوذرات نقره به حجم‌های کمتری (حدود ۲۵cc) تقسیم و هر کدام جداگانه توسط دستگاه سانتریفیوژ غلیظ شود. برای انجام این کار، حدود ۲۵cc کلوئید درون حباب مخصوص ریخته شد و در درجه حرارت ۸۵°c و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت تا کلوئید به حجم حدود ۲cc غلیظ گردد. پس از تغلیظ، وزن ۱/۵cc از کلوئید نانوذرات نقره ۲gr بود. جهت تخمین وزن هر نمونه، ۵۰ عدد نمونه بدون نانوذرات نقره تهیه شد. میانگین وزن هر نمونه ۰/٤ گرم محاسبه شد.

وزن کلوئید نانوذرات نقره مورد نیاز برای تهیه یک عدد نمونه آکریلی حاوی ۲/۵٪ نانوذرات نقره به این ترتیب محاسبه شد:

$$\text{۰/٤ gr وزن هر نمونه آکریلی} \times \text{۲/۵٪ } \frac{\text{وزن نانو ذرات نقره gr}}{\text{وزن هر نمونه آکریلی gr}} = \text{۱٪ gr}$$

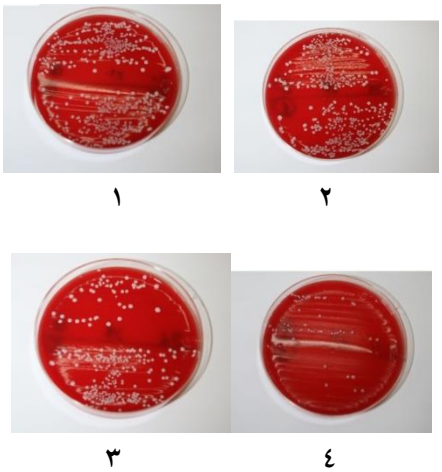
حجم کلوئید مورد نیاز برای تهیه ٤۰ عدد نمونه آکریلی حاوی ۲/۵٪ نانوذرات نقره به این ترتیب محاسبه گردید:

$$\text{۰/٤ gr نانوذرات نقره} \times \frac{\text{کلوئید نانو ذرات نقره 1/5cc}}{\text{کلوئید نانو ذرات نقره 2gr}} = \text{۰/۳ cc}$$

با توجه به معادلات فوق، مقدار حجم کلوئید لازم جهت تهیه ٤۰ عدد نمونه آکریلی هر کدام به وزن gr ۰/۰۱ برای غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد وزنی به ترتیب ۰/۳cc، ٦cc/. وcc ۱/۲ بود که هر کدام با ۵۳/۳cc پودر و ۲٦/٦cc مایع آکریل مخلوط شد و با اسپاتول شیشه ای به هم زده شد تا کاملاً هموژن گردد. سپس درون فضاهای تعبیه شده درون مفل ریخته شد و سایر مراحل همانند نمونه‌های بدون نانوذرات نقره ادامه یافت.

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این مطالعه، شامل Candida Albicans (ATCC 10231) بود که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و Candida Albicans hospital isolated بود که از بیمارستان قائم مشهد تهیه گردیدند. نمونه‌های آکریلی جهت ارزیابی اثرات ضدمیکروبی در چهار غلظت صفردرصد نانوذرات نقره (نمونه‌های آکریلی بدون نانوذرات نقره، به عنوان نمونه

کنترل)، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪ نانوذرات نقره تهیه گردید. برای هر نوع قارچ، ۱۰ بار تکرار از هر غلظت انجام گرفت، لذا مجموع کل نمونه‌ها، برای دو نوع قارچ ۸۰ عدد بود. نمونه‌ها بعد از تهیه، درون ظرف‌های حاوی سرم فیزیولوژی قرار گرفت و در آزمایشگاه، هر نمونه درون یک لوله آزمایش جداگانه گذاشته شد و در دمای ۱۲۰° به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. محیط کشت Brain Heart broth (Merc, Darmstadt, Germany) جهت رشد باکتری‌های مورد آزمایش طبق دستور کارخانه، به صورت ۳۷ گرم در لیتر تهیه شد و سپس با اتوکلاو استریل گردید. محیط کشت Blood agar نیز به روش معمول جهت کشت نمونه‌ها تهیه گردید. به این ترتیب که محیط مولرهینتون براث تهیه شد و بعد از استریل شدن توسط اتوکلاو و خنک شدن تا دمای محیط به اندازه ۱۰ درصد حجم، خون گوسفندی (Blood Sheep) به آن اضافه شد و جهت کشت نمونه‌ها درون پلیت‌های ۸ سانتیمتر استریل ریخته شد. سویه‌های باکتری در محیط کشت Brain heart broth حل شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، بر روی پلیت‌های استریل کشت داده شد تا باکتری رشد نماید. سپس از باکتری‌های رشد یافته، سوسپانسیون باکتری به غلظت Mc Farland ۰/۵ (معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$CFU میکروب) در مقایسه با استاندارد مک فارلند تهیه گردید. سپس با رقیق سازی این سوسپانسیون، به غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$CFU رسانده شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری به غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$CFU، ۱cc از سوسپانسیون با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ با ۹cc از محیط کشت مخلوط شد و سوسپانسیون با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۷}$ به دست آمد و همین کار ۲ بار دیگر تکرار گردید تا سوسپانسیون به غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$ برسد. از سوسپانسیون نهایی با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$CFU در هر لوله آزمایش ۱ml توسط سمپلر ریخته و یک نمونه آکریلی درون هر لوله قرار داده شد. در شروع کار ۱۰µl از هر سوسپانسیون جدا شد و به عنوان زمان اولیه تماس نمونه‌ها با باکتری، کشت خطی داده شد. سپس لوله‌های آزمایش درون شیکر انکوباتور، به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها درون انکوباتور بعد از ۱، ٦و ۲۴ ساعت نیز مجدداً ۱۰µl از سوسپانسیون برداشته و کشت داده شد (تصویر ۳). هر پلیت بعد از این که کشت خطی داده شد، به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور انکوبه شد و سپس کلونی‌های باکتری شمارش گردید. برای توصیف داده‌ها از میانگین و انحراف معیار و جهت مقایسه بین تعداد باکتری‌های موجود در سوسپانسیون نمونه‌های حاوی نانوذرات نقره با نمونه‌های کنترل، از آزمون t-student استفاده گردید (α=۰/۰۵).



تصویر ۳ : (۱)، کشت خطی کاندیدا استاندارد در لحظه اول تماس، (۲)، یک ساعت بعد از تماس، (۳)، ٦ ساعت بعد از تماس و (٤)، ۲٤ ساعت بعد از تماس با نمونه‌های حاوی ۱۰درصد نانوذرات نقره

یافته‌ها

در جدول ۱ میانگین و انحراف مربوط به کاهش تعداد قارچ‌های موجود در سوسپانسیون و غلظت‌های مختلف از

نمونه‌های حاوی نانوذرات نقره را نشان می‌دهد.

نتایج جداول ۱ و ۲ نشان می‌دهد که در غلظت ۲/۵ درصد در زمان‌های ۰، ۱ و ۲٤ ساعت بعد از تماس بین تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). بیشترین تأثیر مربوط به زمان ۲٤ ساعت روی کاندیدای استاندارد بود. در زمان ٦ ساعت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P<۰/۵۵).

در غلظت ۵ درصد در کلیه زمان‌ها بین تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). بیشترین تأثیر مربوط به زمان ٦ ساعت روی کاندیدای استاندارد بود. در غلظت ۱۰ درصد در کلیه زمان‌ها بین تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). بیشترین تأثیر مربوط به زمان ۲٤ ساعت مربوط به کاندیدای استاندارد بود. هرچند در زمان ٦ ساعت هم خاصیت میکروب کشی حدوداً در حد ۲٤ ساعت بعد از تماس بود.

جدول ۱ : میانگین و انحراف معیار کاهش تعداد قارچ‌های موجود در سوسپانسیون و غلظت‌های مختلف از نمونه‌های حاوی نانوذرات نقره بر حسب نوع قارچ، غلظت و زمان تماس

غلظت نانوذرات نقره	قارچ	C0 - T0 میانگین±انحراف معیار	C1 – T1 میانگین±انحراف معیار	C6 – T6 میانگین±انحراف معیار	C24 – T24 میانگین±انحراف معیار
٪۲/۵	کاندیدا استاندارد	۲۹/۰±۲٤/۵	۳۵/۰±۱۱/۱	٤۳۲/۰±٤۵/۳	۵۰۱/۰±۲۳/۱
	کاندیدا بیمارستانی	۱۰/۰±۹۰/۷	۱۵۰/۰±٤۷/۵	۳۲۰/۰±۲۹/۱	٤۰۰±۳۵/۷
٪۵	کاندیدا استاندارد	٦۱/۵±٤۲/۰	۵۹/۵±۸/۵	۹۵۳/۰±۸۷/۰	۸٦۰/۰±۳٤/۳
	کاندیدا بیمارستانی	۱۳۲ /۸±۳۸/۷	۳۵۸/۳±۲۱/٤	۳۲۰/۰±۱۹/۷	۳۸۰/۰±۲۳/۲
٪۱۰	کاندیدا استاندارد	۷۲/۹±٦۰/٦	۱٦۲/۰±۵۳/۲	۹٦۳/۰±۵۲/۰	۱۰۰۰/۰±۲٤/۹
	کاندیدا بیمارستانی	۲۷۹/۵±٦/۲	۲۳۲/۸±٦/۸	۳٦۰/۰±۱۲/۵	۸٤۰/۰±۱۳/۱

C=میانگین تعداد قارچ در ۱۰ لوله آزمایش حاوی نمونه کنترل در لحظه اول(C0)، یک ساعت(C1)، ٦ ساعت(C6) و ۲٤ ساعت(C24) بعد از تماس.

T=میانگین تعداد قارچ در ۱۰ لوله آزمایش حاوی نمونه دارای نانوذرات نقره در لحظه اول(T0)، یک ساعت(T1)، ٦ ساعت(T6) و ۲٤ ساعت(T24) بعد از تماس.

جدول ۲ : نتایج معنی‌داری آنالیز واریانس یکطرفه بر حسب نوع قارچ به تفکیک غلظت و زمان

غلظت نانوذرات نقره	نوع قارچ	C0-T0	C1-T1	C6-T6	C24-T24
غلظت ۲/۵ درصد	کاندیدا استاندارد	T= ٦/۲	T=۸/۰	T= ۰/۸٤	T=٤/۳
	کاندیدا بیمارستانی	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P= ۰/۵۵	P< ۰/۰۰۱
غلظت ۵ درصد	کاندیدا استاندارد	T= ۳/۷	T= ۱۱/۱	T= ۲۲/۷	T=۲۷/۸
	کاندیدا بیمارستانی	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱
غلظت ۱۰ درصد	کاندیدا استاندارد	T= ۷/۷	T= ٤/۲	T= ۱۱/۵	T= ۱۳/٤
	کاندیدا بیمارستانی	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱

C=میانگین تعداد قارچ در ۱۰ لوله آزمایش حاوی نمونه کنترل در لحظه اول(C0)، یک ساعت(C1)، ٦ ساعت (C6) و ۲٤ ساعت (C24) بعد از تماس.

T=میانگین تعداد قارچ در ۱۰ لوله آزمایش حاوی نمونه دارای نانوذرات نقره در لحظه اول(T0)، یک ساعت(T1)، ٦ ساعت(T6) و ۲٤ ساعت(T24) بعد از تماس.

جدول ۳ : نتایج معنی‌داری آنالیز واریانس یک طرفه بر حسب غلظت به تفکیک نوع قارچ و زمان

غلظت نانوذرات نقره	نوع قارچ	C0-T0	C1-T1	C6-T6	C24-T24
کاندیدا استاندارد	۲/۵ درصد	T=۳/۹	T=۵/۵	T=۳/۵	T=۵/۱
	۵ درصد	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱
	۱۰ درصد				
کاندیدا بیمارستانی	۲/۵ درصد	T=۷/۳	T=۱۱/۸	T=۳/۵	T=۵/٦
	۵ درصد	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱	P< ۰/۰۰۱
	۱۰ درصد				

C = میانگین تعداد قارچ در ۱۰ لوله آزمایش حاوی نمونه کنترل در لحظه اول (C0)، یک ساعت بعد (C1)، ٦ ساعت بعد (C6) و ۲٤ ساعت بعد از تماس (C24).
T= میانگین تعداد قارچ در ۱۰ لوله آزمایش حاوی نمونه دارای نانوذرات نقره در لحظه اول (T0)، یک ساعت بعد (T1)، ٦ ساعت بعد (T6) و ۲٤ ساعت بعد از تماس (T24).

جدول ۳ نتایج مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به تفکیک زمان بر روی هر یک از قارچ‌ها را نشان می‌دهد. به طوری که در کاندیدا استاندارد بیشترین تأثیر در زمان ۲٤ ساعت بعد از تماس در غلظت ۱۰ درصد بود. همچنین در کاندیدا بیمارستانی هم بیشترین تأثیر در زمان ۲٤ ساعت بعد از تماس در غلظت ۱۰ درصد بود.

بحث

یکی از شایع‌ترین بیماران دندانپزشکی، بیمارانی هستند که دچار بی‌دندانی (کامل یا پارسیل) می‌باشند. در بیماران دارای پروتز کامل نیز به دلایلی از جمله از دست رفتن تطابق پروتز با فکین، ایجاد تروما به فک حین غذا خوردن عدم رعایت بهداشت دهان و پروتز، حضور میکروارگانیسم‌های فرصت طلبی چون کاندیداآلبیکانس در دهان، بروزاستوماتیت ناشی از دنچر جزء فراوان‌ترین بیماری‌های ناشی از دنچر کامل (به خصوص در فک بالا) می‌باشد.[۱۱] از سوی دیگر چون بیمارانی که پروتز کامل استفاده می‌کنند اکثراً دارای سن بالا هستند، ممکن است به دلیل سایر بیماری‌های دیگر از جمله پارکینسون، توانایی فیزیکی کافی را در رعایت کامل بهداشت نداشته باشند؛ یا به دلیل بیماری آلزایمر توانایی به خاطر سپردن مسائل بهداشتی که توسط پزشک به آنها توصیه می‌گردد را نداشته باشند. با توجه به اینکه درمان‌های موضعی فعلی برای کاندیدیازیس، نیستاتین، فلوکونازول و در موارد شدیدتر، آمفوتریسین B می‌باشد، باید مسائلی همچون عوارض استفاده از این داروها و نیز ایجاد مقاومت دارویی را نیز، برای این نوع درمان‌های موضعی درنظر گرفت. با توجه به تمامی مسائل فوق، اگر بتوان یک ماده ضدمیکروبی را هنگام تهیه پروتز درون آکریل مخلوط نمود، می توان گفت که میزان بروز مشکلات مذکور کاهش خواهد یافت. یکی از بهترین موادی که می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد؛ نانوذرات نقره می‌باشند که هیچ کدام از معایب داروهای فوق را ندارند؛ ضمن این که با توجه به برخی مطالعات موجب افزایش استحکام فیزیکی پروتز نیز می‌گردند.[٤]

در این مطالعه با هدف ایجاد اثرات ضدقارچی، نانوذرات نقره درون آکریل‌های دندانی، مخلوط گردید. این آکریل‌های جدید، بعد از قرار گرفتن در دهان به مرور زمان، ذرات نقره آزاد می‌کنند که دارای اثرات ضدقارچی قوی می‌باشند و می‌توانند موجب کاهش استوماتیت ناشی

از دنچر شوند. نقره، عنصری شفاف و سفید رنگ در موقعیت ٤٧ جدول تناوبی با نماد Ag می‌باشد. در میان موارد استفاده گوناگون نقره، مواردی که از خصوصیات ضد باکتریایی نانوذرات نقره جهت اهداف بهداشتی و پزشکی سود می‌جویند، برجسته‌ترین و مهم‌ترین آن‌ها به شمار می‌آیند. در حیطه پزشکی، پانسمان زخم‌ها، وسایل ضد بارداری، تجهیزات جراحی، پروتز استخوانی که همگی با نانوذرات نقره روکش و یا ترکیب شده‌اند به چشم می‌خورند. خصوصیات ذاتی این ذرات، تحت تأثیر اندازه و شکل کریستالی آن‌ها می‌باشد. نانوذرات نقره خصوصیات ضدباکتریایی بارزی را نسبت به سایر نمک‌های نقره از خود نشان می‌دهند که این موضوع به دلیل مساحت سطحی بسیار بالای آنهاست که سبب می‌شود تماس موثرتری را با میکروارگانیسم‌ها فراهم کند.[۱۲] نانوذرات نقره به غشای سلولی متصل شده و همچنین به داخل سلول باکتری نفوذ می‌کنند. غشای باکتری دارای پروتئین‌های حاوی گروه سولفور می‌باشد و نانوذرات نقره نه تنها با این پروتئین‌ها، بلکه با ترکیبات حاوی فسفر از جمله DNA واکنش می‌دهند. نانوذرات همچنین به زنجیره تنفسی (که در تقسیم سلولی موثر است) حمله می‌کنند و منجر به مرگ سلولی می‌شوند. همچنین نانوذرات، یون نقره را آزاد می‌کنند که این خود منجر به افزایش فعالیت ضدباکتریایی آنها می‌شود.[۱۳و۱٤] میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این مطالعه قارچ کاندیدا آلبیکانس استاندارد و بیمارستانی بود. زیرا یکی از عوامل اصلی در ایجاد استوماتیت ناشی از دنچر در بیماران، قارچ فرصت طلب کاندیدا آلبیکانس می‌باشد.[۱۱و۱۵] ما در این مطالعه جهت آزمایشات ضدمیکروبی از غوطه‌ورسازی نمونه‌ها درون سوسپانسیون باکتری استفاده شد که بزرگترین مزیت تشابه با روندی است که در دهان اتفاق می‌افتد. با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت که در دو نوع قارچ مورد آزمایش با گذشت زمان شاهد اثر نانوذرات نقره روی سوسپانسیون باکتری و کاهش تعداد آنها در اثر گذشت زمان بودیم (جداول۱و۲و۳). در بررسی روی کاندیدا آلبیکانس استاندارد و بیمارستانی با گذشت زمان تعداد هر دو میکروارگانیسم رو به کاهش بود، به طوری که کاندیدا استاندارد در غلظت ۵ درصد و ٦ ساعت بعد از تماس و در غلظت ۱۰ درصد و ٢٤ ساعت بعد از تماس و کاندیدای بیمارستانی در غلظت ۱۰ درصد و ٢٤ ساعت بعد از تماس بیشترین کاهش را نشان دادند. Sondi[۱٦] نشان داد اثر ضدباکتریایی بستگی به غلظت نانوذرات نقره و نیز غلظت باکتری دارد. Casemiro[۱] نشان داد افزودن ۵٪ نانوذرات نقره به آکریل IrgaguardB5000 و ۲/۵٪ نانوذرات نقره به آکریل Qc20 lucit، اثر ضدمیکروبی بالایی در برابر قارچ کاندیدا آلبیکانس اعمال می‌کند و با افزایش غلظت، اثر ضدمیکروبی بیشتر می‌شود. در این مطالعه نیز نتایج نشان داد افزودن پنج درصد نانوذرات نقره به آکریل باعث اثر ضدمیکروبی می‌شود و با افزایش غلظت، اثر ضدمیکروبی بیشتر می‌شود. Espinosa[۷] نیز نشان داد که هر چه سایز نانوذرات نقره کوچک‌تر باشد، اثر ضدمیکروبی آنها نیز افزایش می‌یابد. اختلاف نوع باکتری، حساسیت آنها را نسبت به مواد آنتی‌باکتریال تحت تأثیر قرار می‌دهد. دیواره سلول باکتری‌های گرم مثبت بین ۳ تا ۲۰ لایه پپتیدوگلیکان بیشتر از باکتری گرم منفی دارد. لذا باکتری‌های گرم مثبت حساسیت کمتری به نانوذرات نقره دارند زیرا نقره را درون این لایه‌های پپتیدوگلیکان غیرفعال می‌کنند.[۲] در این مطالعه از آنجا که نانوذرات نقره درون نمونه‌های اکریلی محبوس شده بودند در کوتاه مدت به خوبی قادر به اعمال اثر

ضدمیکروبی نبودند و تنها نانوذرات سطحی بودند که این اثر ضدمیکروبی را اعمال می‌کردند. اگر نانوذرات با یک سوسپانسیون مخلوط گردند و سپس در مجاورت باکتری قرار گیرند، شاید اثر بیشتری اعمال کنند، تا این که درون نمونه‌های آکریلی جامد قرار گیرند. Matsuura[۱۷] نشان داد که مساعدکننده‌های بافتی حاوی زئولیت نقره به مدت ٤ هفته اثرات ضدمیکروبی روی کاندیدا آلبیکانس و باکتری‌های عامل تنفسی بیمارستانی در محیط آزمایشگاه دارد. از طرفی مطالعات اخیر نشان داده است که اگر نقره درون پلیمر اشباع گردد اثر ضدمیکروبی بهتری دارد تا این که به صورت یک لایه سطحی روی آکریل پوشانده شود. علت این امر این است که نقره‌های سطحی احتمالاً توسط پروتئین‌های آنیون غیرفعال می شوند.[۱۸و۱۹] یک نتیجه نامطلوب دیگر ناشی از ادغام نانوذرات نقره با رزین آکریلیک، افزایش کدورت پلی متیل متاکریلات بود. به این صورت که هر چه درصد نانوذرات نقره اضافه شده به رزین بیشتر شود کدورت هم بیشتر می‌شود.[۱] بنابراین مطالعات بیشتری لازم است تا امکان پیشگیری از کاهش در شفافیت پایه رزین آکریلیک که محتوی نانوذرات نقره است را مورد بررسی قرار دهد، به گونه‌ای که زیبایی پروتز را به خطر نیندازد. نکته قابل توجه این است که آیا نقره اثر سمیت دارد یا خیر؟ مطالعات نشان داده است نقره نسبت به سایر فلزات سنگین تقریباً سمیت قابل توجهی ندارد.[۶و۱۰] یکی از موارد مهم دیگر بررسی اثر طولانی مدت نانوذرات نقره است. زیرا نیازمند مطالعات بیشتری است.

نتیجه گیری

با توجه به محدودیت‌های این مطالعه در رزین‌های آکریلی با افزایش غلظت نانوذرات نقره و زمان تماس با میکروارگانیسم اثر ضد قارچی بیشتر می‌شد. آکریل‌های حاوی نانوذرات نقره اثر ضدقارچی قوی تری روی کاندیداآلبیکانس استاندارد اعمال می‌کردند و اثر کمتری روی سویه‌های بیمارستانی داشتند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر منتج از پایان نامه دانشجویی به شماره ۲٤٦۸ و طرح تحقیقاتی مصوب با شماره ۸۹۲۱۵ می‌باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر تقبل هزینه این تحقیق، همچنین از جناب آقای دکتر حبیب الله اسماعیلی آمارگر و سرکار خانم مومن هروی و همکاران پژوهشکده بوعلی به خاطر بررسی میکروبی، نهایت تشکر و سپاس‌گزاری را داریم.

منابع

1. Casemiro LA, Martins CHG, Pires de Souza FCP, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver–zinc zeolite–Part 1. Gerodontol 2008; 25(3): 187-94.
2. Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver–zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. Dent Mater 2000; 16(6): 452-5.
3. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 2007; 3(1): 95-101.
4. Kassaee MZ, Akhavan A, Sheikh N, Sodagar A. Antimicrobial effect of a new dental acrylic resin containing silver nonoparticles. J Appl Polym Sci 2008; 110: 1699-703.
5. Francisco J, Ruiz F, Corina D, Martinez F. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. Nanomedicine 2008; 4(3): 237-40.
6. Kim K, Sang Sung W, Suh B, Moon S, Choi J, Kim J, et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on candida albicans. Biometals 2009; 22(2): 235-42.

7. Espinosa LF, Martinez GA, Martinez RE, Loyola JP, Patino N, Reyes JF, et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus mutans. Materials Letters 2009; 63(29): 2603-6.
8. Sadeghi B, Jamali M, Kia SH, Amini nia A, Ghafari S. Synthesis and characterization of silver nanoparticles for antibacterial activity. Int J Nano Dim 2010; 1(2): 119-24.
9. Li WR, Xie XB, Shi QS, Duan SS, Ouyang YS, Chen YB. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus areus. Biometals 2011; 24(1): 135-41.
10. Nasrorrahi A, Pourshamsian KH, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. Int J Nano Dim 2011; 1(3): 233-9.
11. Laing LP, Zaeb G. Sequelae caused by wearing complete dentures. In: Zarb G, Mobkir K JA, Eckert SE, Jacob RF. Prosthodontic Treatment for Edentulous Patients. 13th ed. St. Louis: Mosby Co; 2013. P. 44.
12. Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J Nano Sci Nanotechnol 2005; 5(2): 244-9.
13. Panacek A, Kvitek SL, Prucek R, Kolgr M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem B 2006; 110(33): 16248-53.
14. Damm C, Münstedt H, Rosch A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silvernano- and microcomposites. Mater Chem Phys 2008; 108(1): 61-6.
15. Jontell M, Molmstrup P. Red and white lesions of the mucosa. In: Burkets Oral Medicine. Greenberg Ms, Glick M, Ship JA. 11th ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2008. P. 77-81.
16. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci 2004; 275(1): 177-82.
17. Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. J Dent 1997; 25(5): 373-7.
18. Stobie N, Duffy B, McCormack DE, Colreavy J, Hidalgo M, McHale P, et al. Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating. Biomaterials 2008; 29(8): 963-9.
19. Melaiye A, Youngs WJ. Silver and its application as an antimicrobial agent. Expert Opin Ther Pat 2005; 15(2): 125-30.