مقایسه تأثیر مهارکننده‌های بافتی بر فعالیت ضدمیکروبی یک شوینده‌ی جدید حاوی نانوذره‌ی نقره، هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین

علیرضا عدل[۱]، محمد معتمدی فر[۲]، فرشته صبح نمایان[۳]، لادن شاه چراغی[۴]*

[۱] دانشیار گروه اندودانتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز،ایران

[۲] استاد گروه باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

[۳] استادیار گروه اندودانتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز،شیراز، ایران

[۴] دندان پزشک، شیراز، ایران

تاریخ ارائه مقاله : ۹۶/۱۲/۵ – تاریخ پذیرش : ۹۷/۸/۳

Comparison of the Effect of Tissue Inhibitors on the Antibacterial Efficacy of a New Silver Nanoparticle Irrigant Containing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine

Alireza Adl[1], Mohammad Motamedifar[2], Fereshteh Sobh Namayan[3], Ladan Shahcheraghi[4]*

[1] Associated Professor of Department of Endodontics, Dental school, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

[2] Professor of Department of Bacteriology, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

[3] Assistant Professor of Department of Endodontics, Dental School, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

[4] Dentist, Shiraz, Iran

Received: 24 February 2018; Accepted: 25 October 2018

Introduction: The present study aimed to evaluate the effects of various tissue inhibitors, including dentin powder, dentin matrix, bovine serum albumin, and bacterial lipopolysaccharide, on the antibacterial activity of sodium hypochlorite (NaOCl), chlorhexidine (CHX), and a new silver nanoparticle irrigant (Im-based AgNPs).

Materials and Methods: In the first set of experiments, 950 µL of each irrigating solution was mixed with 50 µL of an *Enterococcus faecalis* suspension, and bacterial survival was assessed after 10, 30, and 60 seconds. In the second set of experiments, 100 µL of each inhibitor suspension was mixed with 100 µL of each irrigating solution and incubated for one hour. Afterwards, 100 µL of the bacterial suspension was added. Bacterial survival was assessed after 10 seconds and 10 and 60 minutes. Both sets of experiments were performed in triplicate. The colony-forming units were counted, and the log-transformed number was analyzed using the Kruskal-Wallis and Dunn tests. In the statistical analysis, P-value of less than 0.05 was considered significant.

Results: In the first set of the experiments, the antibacterial activity of NaOCl and CHX was significantly higher compared to the AgNPs and saline solutions at all the times ($P<0.05$). In the second set of the experiments, the four inhibitors significantly inhibited the antibacterial effects of CHX and NaOCl ($P<0.05$), with the exception of bacterial lipopolysaccharide, which had no effect on NaOCl. Similar to the negative control, AgNPs showed the high survival of the bacteria regardless of the presence or absence of the tissue inhibitors.

Conclusion: According to the results, the tissue inhibitors affected the antibacterial activity of NaOCl and CHX at variables degrees. However, AgNPs showed no antibacterial activity regardless of the presence or absence of the inhibitors.

Key words: Irrigants, Chlorhexidine, Sodium Hypochlorite, Nanosilver, Inhibitors.

 # Corresponding Author: lshahcheraghil@gmail.com

J Mash Dent Sch 2019; 42(4): 320-8 .

چکیده

مقدمه: یک شوینده ی جدید حاوی نانو ذرات نقره (Im-based AgNPs) اثرات ضد میکروبی قابل قبولی نشان داده است. هدف از این مطالعه، ارزیابی مهارکننده‌های بافتی مختلف (پودر عاج، ماتریکس عاج، آلبومین سرم گاوی و لیپوپلی ساکارید باکتریال) بر فعالیت ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم، کلرهگزیدین و یک شوینده جدید حاوی نانو ذرات نقره (Im-based AgNPs) بود.

مواد و روش ها: در سری اول آزمایش ها، ۹۵۰µL از هر یک از شوینده ها با ۵۰µL از سوسپانسیون باکتری انتروکوکوس فکالیس مخلوط گردیدند و زنده ماندن باکتری ها بعد از ۱۰، ۳۰ و ۶۰ ثانیه ارزیابی شد. در سری دوم آزمایش، ۱۰۰µL از سوسپانسیون هر یک از مهارکننده‌ها

---

* مولف مسؤول، نشانی: شیراز، دانشکده دندانپزشکی، تلفن: ۰۹۱۷۱۰۲۴۲۲۱

E-mail: lshahcheraghil@gmail.com

با ۱۰۰µL از هر یک از شوینده ها مخلوط و به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. سپس ۱۰۰µL از سوسپانسیون میکروبی به آن ها اضافه گردید و زنده ماندن باکتری ها بعد از ۱۰ ثانیه، ۱۰ و ۶۰ دقیقه بررسی شد. هر دو سری آزمایش ها سه بار تکرار شدند و تعداد کلونی ها شمارش شده و سپس لگاریتم بر مبنای ۱۰ آنها محاسبه شد. از تست Kruskal-wallis و Dunn برای آنالیز آماری استفاده شد. $P<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: در سری اول آزمایش، در هر سه زمان فعالیت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین بیش تر از AgNPs و سایلین بود. ($P<۰/۰۵$) در سری دوم آزمایش هر چهار مهارکننده ی بافتی، فعالیت ضد میکروبی کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم را کاهش دادند. ($P<۰/۰۵$) غیر از لیپوپلی ساکارید باکتریال که بر روی هیپوکلریت سدیم اثری نداشت. AgNPs مشابه با گروه کنترل منفی، رشد بالای باکتری ها را صرف نظر از وجود یا عدم وجود مهارکننده ها نشان داد.

نتیجه گیری: مهارکننده های بافتی فعالیت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیمو کلرهگزیدین را به درجات مختلفی تحت تأثیر قرار دادند. AgNPs صرف نظر از حضور یا عدم حضور مهارکننده ها اثر ضد میکروبی قابل توجهی نشان نداد.

کلمات کلیدی: شوینده ، کلرهگزیدین، مهار کننده بافتی، نانوسیلور، هیپوکلریت سدیم

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۷ دوره ۴۲ / شماره ۴ : ۸-۳۲۰ .

مقدمه

از سال‌ها پیش پذیرفته شده است که میکروارگانیسم‌ها علت اصلی بیماری‌های پالپ و ایجاد ضایعات پری اپیکال هستند[۱و۲]، به همین دلیل در درمان اندودنتیک سعی می‌شود به روش فیزیکی و شیمیایی میزان باکتری‌های کانال ریشه به حداقل برسد.[۳] مطالعات نشان داده اند که در آماده سازی مکانیکی بخش وسیعی از دیواره‌های کانال دست نخورده باقی می‌مانند و حذف کامل باکتری‌ها از کانال با تکیه بر آن به تنهایی امکان پذیر نمی‌باشد؛ که دلیل این امر آناتومی پیچیده‌ی سیستم کانال ریشه می‌باشد. بنابراین کاربرد محلول‌های شست و شو دهنده که اثرات ضدمیکروبی داشته باشند برای حذف بقایای پالپی و کشتن میکروارگانیسم‌ها و آماده سازی کانال لازم می‌باشد.[۴و۵] با وجود قابلیت بالای ضدمیکروبی شوینده‌های رایج (هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین) در مطالعات *in vitro*، در مطالعات کلینیکی نشان داده شده است که پس از مراحل آماده سازی و علی رغم استفاده از این محلول‌ها، هم چنان باکتری‌های زنده ای در کانال حضور دارند.

علاوه بر آناتومی پیچیده کانال‌ها و مقاومت باکتری‌ها[۶]، یکی دیگر از دلایل عدم حذف باکتری‌ها پس از شست و شو حضور انواع مهارکننده‌های بافتی (Tissue inhibitors) در کانال‌ها می‌باشد. کانال‌های عفونی حاوی باکتری‌ها و محصولات آن‌ها، مایعات بافتی، عاج، ماتریکس عاج و بقایای بافت پالپی می‌باشند که نشان داده شده است که این محتویات باعث کاهش و یا مهار کامل اثرات ضدمیکروبی کلرهگزیدین و آیودین پتاسیم آیوداید می‌گردند.[۷و۸] بخش معدنی عاج نیز به دلیل قابلیت بافرینگ، نقش مهمی به عنوان مهارکننده دارد. مشخص شده است که عاج اثرات ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم و Qmix را کاهش می‌دهد.[۹] در تحقیقی دیگر نیز نشان داده شد که هم پودر عاج و هم سلول‌های کشته شده‌ی Candida albicans باعث کاهش چشمگیر فعالیت ضدمیکروبی کلرهگزیدین می‌گردند.[۱۰] همچنین گزارش شده است که عاج و آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumine) باعث کاهش قدرت میکروب کشی کلرهگزیدین و MTAD می‌گردند.[۱۱] بنابراین لازم است شوینده‌های جدید و استراتژی‌های ضدعفونی کننده‌ی جدید در حضور مهارکننده‌های بافتی بررسی شوند تا توانایی ضدمیکروبی آن‌ها به خوبی ارزیابی گردد.

اخیرا نانو ذرات نقره به دلیل توانایی ضدباکتریایی و ضدویروسی وسیع الطیفی که دارند در بسیاری از زمینه‌های بهداشتی مورد استفاده قرار گرفته اند.[۱۲] نانو ذرات نقره به دلیل نسبت بالای سطح به حجم و همچنین ویژگیهای منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی از قدرت واکنش پذیری بالایی برخوردار می‌باشند.[۱۳] مکانیسم ضدباکتریایی این نانو ذرات مربوط به چسبیدن و نفوذ انها به دیواره سلولی باکتری‌هاست که در نهایت منجر به ازدست رفتن یکپارچگی و افزایش نفوذ پذیری دیواره سلولی می‌گردد.[۱٤] مطالعات نشان داده اند که نانوذرات نقره از پتانسیل ضدباکتریایی بالایی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی[۱٦و۱۵] و باکتری‌های مقاوم بر خوردارند.[۱٤]

خاصیت ضدمیکروبی قابل قبول و همچنین سازگاری بافتی به خصوص در غلظت‌های کم[۱۷]، باعث شده است که استفاده از نانو ذرات نقره به عنوان شوینده اندودانتیک پیشنهاد گردد.

در یک مطالعه میزان تأثیر نانوپارتیکل نقره و هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به عنوان شوینده‌های اندودانتیک در کنترل رشد باکتری‌ها یکسان گزارش شد.[۱۸] همچنین تأثیر آنتی باکتریال نانوپارتیکل نقره بر بیوفیلم باکتری E.faecalis همچون هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و موثرتر از نرمال سالین و کلرهگزیدین ۱۲ درصد گزارش شده است.[۱۹] اخیرا نوعی نانوذره نقره دارای بار مثبت و پوشیده شده توسط ایمیدازولیوم معرفی شده است که تأثیر ضدباکتری زیادی علیه باکتری E.faecalis حتی در غلظت‌های پایین دارد. این قدرت بالای انتی باکتریال، به واکنش بار مثبت این شوینده با بار منفی غشا سلولی که منجر به افزایش لیکیج و مرگ باکتری می‌گردد نسبت داده شده است.[۲۰] این نانوپارتیکل نقره دارای بار مثبت همراه با زنجیره‌ی ایمیدازولیوم، سازگاری بافتی بالاتری در مقایسه با کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم نشان داده است.[۲۱]

علیرغم اثرات ضدباکتریایی قابل قبول نانو پارتیکل‌های نقره، تا کنون مطالعه ای تأثیر انواع مهارکننده‌های بافتی را بر روی آنها بررسی نکرده است. بنابراین هدف از این مطالعه آزمایشگاهی، ارزیابی تأثیر پودر عاج، ماتریکس عاج، لیپوپلی ساکارید باکتریال و آلبومین سرم گاوی بر فعالیت ضدمیکروبی یک نوع شوینده‌ی نانوپارتیکل نقره در مقایسه با هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین بود.

مواد و روش‌ها

شوینده‌های مورد استفاده در این مطالعه‌ی پژوهشی شامل هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد (Chloraxid, Cerkamed, Poland)، کلر هگزیدین ۰/۲ درصد (Choloraxid, Cerkamed, Poland) نانو پارتیکل نقره پوشش داده شده با ایمیدازولیوم (ساخته شده توسط دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز) و نرمال سالین استریل بود.

ساخت محلول نانوپارتیکل نقره پوشش داده شده توسط ایمیدازولیوم در مطالعات قبلی توضیح داده شده است.[۲۰] جهت ساخت محلول AgNPs، تمامی ظروف شیشه ای، در محلول HCL:HNO3 به نسبت ۱ به ۳ قرار داده شده و سپس ۳ بار توسط آب مقطر شسته شد. سپس 1 mL از محلول آبی ۰/۰۱ M، AgNO3 به ۲۰ml محلول آبی ۲/٦ mM – ۱dodecyl-3-methylimidazolium chloride اضافه شده و بعد از تکان دادن شدید، محلول تازه‌ی 0.4M NaBH4 توسط قطره چکان به آن اضافه گردید تا زمانی که محلولی به رنگ طلایی بدست آید. سپس برای حذف یون‌های آبی اضافه، محلول کلوئید به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سوسپانسیون بدست آمده در دمای اتاق نگهداری گردید.[۲۰]

مهارکننده‌های بافتی مورد استفاده در این مطالعه شامل پودر عاج، ماتریکس عاج، آلبومین سرم گاوی ۱۸ درصد (BSA)، Sigma و لیپوپلی ساکارید (LPS) بود.

جهت تهیه‌ی پودر عاج، دندان‌های مولر کشیده شده‌ی انسان جمع آوری شده و به منظور حذف بافت‌های نرم و جلوگیری از رشد باکتری‌ها تا زمان انجام مطالعه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد نگه داری شدند. سپس دندان‌ها با آب جاری شسته شده و اتوکلاو گردیدند. تاج دندان‌ها حذف شد و ریشه‌ها توسط فرز روند شماره ۲۱ هندپیس تراش داده شدند و پودر حاصل از این تراش جمع آوری گردید.

برای تهیه‌ی ماتریکس عاج، مقداری از پودر عاج بدست آمده با EDTA ۱۷ درصد (Endo-Solution, Cerkamed, Poland) مخلوط گردید. از آنجایی که در این مخلوط پودر عاج ته نشین می‌شود هر روز مایع رویی تخلیه شده و با EDTA تازه جایگزین می‌شد. این کار به مدت ۵ روز تکرار شد. در روز پنجم مایع رویی خارج شده و با آب مقطر جایگزین گردید و مخلوط برای ۳ بار سانتریفیوژ گردید. ماتریکس عاج بدست آمده از عمل سانتریفیوژ تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگه داری شد.[۲۱]

باکتری ATCC29212 (E.faecalis) به عنوان میکروارگانیسم مورد آزمایش در این مطالعه استفاده گردید. این باکتری بر روی آگار Brain_heart infusion (BHI) کشت داده شد و خلوص آن توسط رنگ آمیزی Gram و تست واکنش کاتالاز تایید شد. در مرحله‌ی بعد با استفاده از ۵ mL سایلین استریل، یک سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. با استفاده از یک اسپکتروفتومتر، یک سوسپانسیون نوری با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (معادل کدورت ۰/۵ لوله مک فارلند که برابر ۱/۵×۱۰^۸ CFU /mL) تنظیم گردید.

در سری اول آزمایش‌ها، µL ۹۵۰ از محلول‌های شوینده با µL ۵۰ از سوسپانسیون باکتریایی در یک لوله‌ی آزمایش اپندورف مخلوط گردیدند. بعد از اینکوبیشن به مدت ۱۰ثانیه، ۳۰ ثانیه و یک دقیقه، نمونه‌های ۱۰۰µL از مخلوط مذکور برداشته شد و عمل رقیق سازی سریالی (Serial dilution) انجام شد.

۱۰µL از هر رقت بر روی پلیت‌های حاوی آگار BHI کشت داده شدند و در دمای ۳۷°c نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت تعداد کلونی‌ها شمارش شد.(CFU/mL) تمام آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد.

در سری دوم آزمایش‌ها فعالیت ضدمیکروبی شوینده‌ها در حضور مهارکننده‌های بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ۲۸ mgr پودر عاج، ۵mgr ماتریکس عاج، ۵ mgr آلبومین سرم گاوی ۱۸ درصد و ۵ میلی گرم لیپوپلی ساکارید (1µgr/mL) در µL ۱۰۰ آب مقطر حل گردیدند. ۱۰۰µL از سوسپانسیون حاوی مهارکننده با µL ۱۰۰ از هر یک از شوینده‌ها مخلوط و به مدت ۱ ساعت انکوبه گردیدند. سپس µL ۱۰۰ از سوسپانسیون میکروبی به آن‌ها اضافه گردید طوری که حجم کلی µL ۳۰۰ به دست آمد. در گروه کنترل منفی، سایلین استریل به جای محلول‌های شوینده مورد استفاده قرار گرفت. در گروه کنترل مثبت، از ۱۰۰µL آب مقطر (بدون هرگونه مهار کننده ای) استفاده گردید. اینکوبیشن در یک لوله‌ی آزمایش اپندورف به مدت زمان ۱۰ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۱ ساعت انجام شد.

سپس بعد از مدت زمان انکوباسیون، نمونه‌های µL ۱۰۰ از سوسپانسیون‌های مورد آزمایش برداشته شد و رقیق سازی سریالی انجام شد. µL ۱۰ از هر یک از رقت‌ها بر روی پلیت‌های حاوی آگار BHI کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت تعداد کلونی‌ها تشکیل شد و شمارش گردید (CFU/mL) تمام آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردید.

جهت آنالیز آماری از تعداد کلونی‌ها در واحد حجم (CFU/mL) لگاریتم بر پایه‌ی ۱۰ گرفته شد و سپس میانگین، میانه و انحراف معیار بدست آمد. برای انجام مقایسه‌های آماری از تست Kruskal-Wallis و تست Dunn جهت مقایسه‌های دو به دو استفاده گردید. سطح معنی‌داری معادل ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سری اول آزمایش در هر سه زمان بین محلول‌های شوینده تفاوت معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۵$). (جدول ۱)

مقایسه‌ی دو به دوی شوینده‌ها نشان داد که در هر سه زمان قدرت ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین بیش تر از شوینده‌ی نانوپارتیکل نقره و نرمال سایلین بود ($P<۰/۰۵$). اما بین هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین و هم چنین بین شوینده‌ی نانوپارتیکل نقره و نرمال سالین تفاوت آماری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱ : میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت برحسب شوینده‌ها و زمان

گروه‌ها	۱۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	یک دقیقه
هیپوکلریت سدیم	۱/۳+۲/٤	۰/۸+۲/۱	۰/۵+۱/۸
کلرهگزیدین	۱/۷+۲/۹	۱/٤+۲/٦	۱/۱+۲/٤
نانوسیلور	۸/۱+۰/۳	۸/۱+۰/۲	۸/۲+۰/۱
نرمال سالین	۸/۰+۰/۳	۷/۹+۰/٤	۸/۰+۰/٦
آزمون کروسکال-والیس	x^2=٤۰/۵۵	x^2=٤۱/٦۷	x^2=٤۲/۰۱
	$P<۰/۰۰۱$	$P<۰/۰۰۱$	$P<۰/۰۰۱$

در هر سه زمان ۱۰ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۱ ساعت مهارکننده‌ها بر توانایی ضدمیکروبی شوینده‌ها تأثیرگذار بودند ($P<۰/۰۵$).

در زمان ۱۰ ثانیه در گروه هیپوکلریت سدیم، تمام مهارکننده‌ها غیر از لیپوساکارید باکتریال ($P=۱$) بر فعالیت ضدمیکروبی اثر منفی داشتند ($P<۰/۰۵$). در این زمان بیش ترین اثر مهاری بر روی هیپوکلریت سدیم مربوط به آلبومین بودکه با سایر مهارکننده‌ها غیر از عاج ($P=۰/۳۷۵$) تفاوت آماری داشت ($P<۰/۰۵$).

در گروه کلرهگزیدین تمام مهارکننده‌ها در مقایسه با گروه کنترل فعالیت ضدمیکروبی را کاهش دادند ($P<۰/۰۵$). در همین زمان بیش ترین اثر مهاری بر روی کلرهگزیدین مربوط به لیپوساکارید بود که با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$).

در این زمان گروه‌های نانوپارتیکل نقره و سالین صرف نظر از حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها، رشد زیاد باکتری‌ها را نشان دادند ($P>۰/۰۵$). (جدول ۲)

برای هیپوکلریت سدیم بعداز ۱۰دقیقه تماس با آلبومین و عاج، در مقایسه با گروه کنترل اثر مهاری داشتند ($P<۰/۰۵$). در حالی که لیپوساکارید و ماتریکس عاج این اثر را نداشتند ($P>۰/۰۵$).

بیش ترین اثر مهاری برای هیپوکلریت سدیم مربوط به آلبومین بود که با سایر گروه‌ها غیر از عاج ($P=۰/۳۷۵$) تفاوت داشت ($P<۰/۰۵$).

در این زمان در گروه، کلرهگزیدین، لیپوساکارید و آلبومین با گروه کنترل تفاوت داشتند ($P<۰/۰۵$). بیش ترین اثر مهاری مربوط به لیپوساکارید بود که با تمام گروه‌ها غیر از آلبومین ($P=1$) تفاوت داشت ($P<۰/۰۵$). مجدداً در این زمان گروه‌های نانوپارتیکل نقره و نرمال سالین صرف نظر از حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها رشد بالای باکتری‌ها را نشان دادند ($P>۰/۰۵$). (جدول۳)

در گروه هیپوکلریت سدیم، آلبومین و ماتریکس عاج اثر مهاری داشتند ($P<۰/۰۵$). اما لیپوساکارید و عاج اثر مهاری نداشتند ($P>۰/۰۵$).

در این زمان بیش ترین اثر مهاری مربوط به آلبومین بود که با سایر گروه‌ها غیر ماتریکس عاج (P=۰/۱۲٦) تفاوت داشت (P<۰/۰۵).

در گروه کلرهگزیدین تمام مهارکننده‌ها غیر از عاج (P=۱) اثر مهاری نشان دادند (P<۰/۰۵).

بیشترین اثر مهاری مربوط به *Lps* بود که از سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری بیش تر بود (P<۰/۰۵)، اما با آلبومین تفاوتی نداشت (P=۱).

مجدداً در این زمان نیز گروه‌های نانوپارتیکل نقره و نرمال سالین صرف نظر از حضور یا عدم حضور شوینده، رشد بالای باکتری‌ها را نشان دادند (P>۰/۰۵). (جدول ٤)

جدول ۲ : میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت برحسب مهارکننده‌ها بر فعالیت ضدمیکروبی شوینده‌ها و گروه در زمان ۱۰ ثانیه

شوینده	مهار کننده				
	عاج	ماتریکس عاج	لیپوپلی ساکارید	آلبومین	آب
هیپوکلریت سدیم	۷/۳(۰/۵)	٦/۸(۰/۳)	۰/۰ (۰/۰)	۸/۰(۰/۲)	۱/۰(۲/٦)
کلرهگزیدین	٦/۹(۰/٤)	۷/۰(۰/۳)	۷/۸(۰/٦)	۷/۱(۰/۵)	۱/۵(۳/۱)
نانوسیلور	۷/۹(۰/٤)	۸/۲(۰/۱)	۸/۲(۰/۱)	۸/۲(۰/۱)	۸/۲(۰/۱)
نرمال سالین	۸/۱(۰/۲)	۸/۱(۰/۲)	۸/۱(۰/۲)	۷/۷(۰/۵)	۸/۳(۰/۰)

جدول ۳ : میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت برحسب مهارکننده‌ها بر فعالیت ضدمیکروبی شوینده‌ها و گروه در زمان ۱۰ دقیقه

شوینده	مهار کننده				
	عاج	ماتریکس عاج	لیپوپلی ساکارید	آلبومین	آب
هیپوکلریت سدیم	۷/٤(۰/۵)	٦/۹(۰/٤)	۰/۰ (۰/۰)	۸/۲(۰/۱)	۲/٤(۳/۵)
کلرهگزیدین	٦/۹(۰/٦)	٦/۹(۰/۵)	۷/۹(۰/٤)	۷/۳(۰/٤)	۱/۸(۳/۳)
نانوسیلور	۸/۱(۰/۲)	۸/۲(۰/۰۲)	۸/۲(۰/۰۸)	۸/۲(۰/۰۷)	۸/۳(۰/۰)
نرمال سالین	۸/۰(۰/٦)	۸/۲(۰/۱)	۸/۳(۰)	۷/٦(۰/۵)	۸/۳(۰/۰)

جدول ٤ : میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت بر حسب تأثیر مهارکننده‌ها بر فعالیت ضدمیکروبی شوینده‌ها و گروه در زمان ۱ ساعت

شوینده	مهار کننده				
	عاج	ماتریکس عاج	لیپوپلی ساکارید	آلبومین	آب
هیپوکلریت سدیم	۲/۵(۲/۸)	۷/۱(۰/۲)	۰/۰ (۰/۰)	۸/۱(۰/۳)	۰/۷(۲/۲)
کلرهگزیدین	٤/۱(۲/۱)	۷/۰(۰/۵)	۸/۰(۰/٤)	۷/۷(۰/٦)	۱/۵(۳/۰۸)
نانوسیلور	۸/۲(۰/۰)	۸/۳(۰/۰)	۸/۲(۰/۰)	۸/۳(۰/۰)	۸/۳(۰/۰)
نرمال سالین	۸/۳(۰/۰)	۸/۳(۰/۰)	۸/۳(۰/۰)	۷/۵(۰/٦)	۸/۳(۰/۰)

بحث

در این مطالعه، تأثیر مهاری چهار مهارکننده‌ی بافتی شامل پودر عاج، ماتریکس عاج، LPS باکتریایی و آلبومین سرم گاوی بر فعالیت ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم، کلرهگزیدین و شوینده‌ی جدید نانوپاتیکل نقره پوشش داده شده با ایمیدازولیوم دارای بار مثبت مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر از باکتری‌ها E.faecalis به عنوان میکروارگانیسم هدف استفاد گردید، زیرا شیوع آن در دندان‌های درمان ریشه شده‌ی ضایعه دار تا ۷۷ درصد گزارش شده است. هم چنین این میکروارگانیسم می‌تواند دوره‌های طولانی از بی غذایی را تحمل کند و در عین حال می‌تواند به شکل تکی ایجاد عفونت نماید(منواینفکشن).[۲۳]

نتایج بخش اول مقاله‌ی حاضر نشان داد که قدرت ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین معادل یکدیگر و بیشتر از نانوپارتیکل نقره‌ی پوشش داده شده با ایمیدازولیوم می‌باشد. این یافته با نتایج مطالعه‌ی Abbaszadegan و همکارانش[۲۰] و Nabavizadeh و همکاران[۲٤] که نشان دادند همین محلول نانوپارتیکل نقره اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی بر علیه E.faecalis دارد در تضاد می‌باشد. یک دلیل تضاد در نتایج می‌تواند ناشی از مدت تماس باکتری و محلول شوینده باشد که در دو مطالعه‌ی مذکور بیشتر از مطالعه‌ی حاضر بوده است. در مطالعه‌ی Abbaszadegan و همکارانش[۲۰]، باکتری E.faecalis و محلول شوینده حداقل به مدت ۵ دقیقه در تماس بودند، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر مدت زمان تماس ۱۰ ثانیه، ۳۰ ثانیه و حداکثر ۱ دقیقه بود. در مطالعه‌ی Nabavizadeh و همکاران[۲٤] محلول نانوپارتیکل نقره در جریان آماده سازی کانال‌های دندان‌های کشیده شده استفاده شد که زمان آماده سازی کانال‌ها حدود ۲۰ دقیقه بوده است. یادآوری می‌گردد که در مطالعه Wu و همکاران[۲۵] وقتی نانوپارتیکل نقره دارای بار مثبت به مدت ۲ دقیقه با عاج آلوده با E.faecalis در تماس بود، اثرات ضدمیکروبی کمی دیده شد. در حالی که در نمونه‌هایی که به مدت ۱ هفته در تماس با ژل نانوپارتیکل نقره بودند، تعداد باکتری‌ها کاهش چشمگیری یافت. آن‌ها در توجیه این نتایج عنوان کردند که در مدت زمان ۲ دقیقه اینترکشن کافی بین بار مثبت نانوپارتیکل نقره و بار منفی دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها روی نمی‌دهد. همچنین باید یادآور شد که در چندین مطالعه‌ی دیگر نیز عنوان شده است که میزان از بین رفتن باکتری‌ها توسط نانوپارتیکل‌ها به غلظت نانوپارتیکل و مدت زمان تماس آن با باکتری بستگی دارد.[۲۷و۲٦]

البته باید متذکر شد که در بخش دوم این مطالعه که تأثیر مهارکننده‌های بافتی بر روی توانایی ضدمیکروبی شوینده‌ها بررسی شد، حتی در گروه‌های یک ساعته نیز این نوع نانوپارتیکل نقره توانایی جلوگیری از رشد باکتری‌ها را نداشت.

در بخش دوم این مطالعه تأثیر مهارکننده‌های بافتی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات قبلی نشان داده بودند که مهارکننده‌های بافتی مختلف می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی شوینده‌های اندودانتیک را تحت تأثیر قرار دهند.[۳۰-۲۸]

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آلبومین، عاج و ماتریکس عاج در هر سه زمان ۱۰ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۱ساعت بر روی توانایی ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم اثر مهاری دارند. اما لیپوساکارید چنین تأثیری را نشان نداد. در رابطه با کلرهگزیدین هر چهار نوع مهارکننده و در هر سه زمان درجاتی از اثرات مهاری را نشان دادند.

مطالعات قبلی که به بررسی تأثیر مهارکننده‌های بافتی بر روی فعالیت ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرهگزیدین پرداخته بودند بیش تر از پودر عاج به عنوان

مهارکننده استفاده کرده بودند. در مطالعه‌ی Morgental و همکارانش[۸] پودر عاج بر روی فعالیت ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم ٦ درصد و ۱ درصد اثر مهاری داشت، اما بر روی فعالیت کلرهگزیدین اثر مهاری نداشت. بنابراین نتایج آن‌ها در رابطه با هیپوکلریت سدیم مشابه با نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌باشد اما در رابطه با کلرهگزیدین نتایج دو مطالعه در یک راستا نمی‌باشد.

در مطالعه‌ی Portenier و همکاران[۷] نشان داده شد که پودر عاج باعث به تاخیر افتادن و آلبومین سرم گاوی باعث مهار شدید اثرات ضدمیکروبی کلرهگزیدین می‌گردد که این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر در یک راستا می‌باشد.

همان طور که قبلا ذکر شد در این مطالعه علاوه بر پودر عاج و آلبومین سرم گاوی از LPS و ماتریکس عاج نیز به عنوان مهارکننده‌های بافتی استفاده گردید. ماتریکس عاج درجاتی از اثرات مهاری هم بر روی هیپوکلریت سدیم و هم بر روی کلرهگزیدین نشان داد، اما LPS فقط بر روی کلرهگزیدین موثر بود.

در مطالعه‌ی Shrestha و همکاران[۲۲] نیز LPS و ماتریکس عاج در کنار پودر عاج، آلبومین سرم گاوی و بافت پالپی فعالیت ضدمیکروبی نانوپارتیکل چیتوزان و فتودینامیک تراپی را به درجات متفاوتی کاهش دادند.

دلیل اثر مهاری بیشتر آلبومین بر هیپوکلریت سدیم، احتمالا واکنش شیمیایی هیپوکلریت سدیم با آلبومین به عنوان یک پروتئین می‌باشد.

دلیل اثر مهاری بیش تر لیپوساکارید بر روی کلرهگزیدین نیز ممکن است واکنش الکتروشمیایی کلرهگزیدین به عنوان ملکولی دارای بار مثبت با LPS به عنوان ملکولی با بار منفی باشد.

در این مطالعه و در هر زمان ۱۰ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۱ ساعت حضور مهارکننده‌ها در مقایسه با عدم حضور انها تاثیری بر فعالیت ضدمیکروبی شوینده نانوپارتیکل نقره نداشت. این یافته آن است که در این مطالعه نانوپارتیکل نقره مشابه گروه نرمال سالین رفتار کرد و عملا فاقد اثرات ضدمیکروبی بود.

نتیجه گیری

تحت شرایط این مطالعه، تمام مهار کننده‌های بافتی غیر از اندوتوکسین باکتریال بر فعالیت ضدمیکروبی هیپوکلریت سدیم تأثیر منفی داشتند. در رابطه با کلرهگزیدین همه مهارکننده‌های بافتی مورد آزمایش فعالیت ضدمیکروبی را کاهش دادند. از آن جایی که نانوپارتیکل نقره عملا اثرات ضدمیکروبی نشان نداد تحت تأثیر مهارکننده‌ها نیز قرار نگرفت.

تشکر و قدردانی

مقاله ی حاضر برگرفته از پایان نامه ی دانشجویی با شماره ی طرح ١٤٨٦٢ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز می‌باشد. کلیه ی هزینه ی این طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز پرداخت گردیده که بدین وسیله قدردانی می گردد.

منابع

1. Möller ÅJ, Fabricius L, Dahlen G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Eur J Oral Sci 1981; 89(6): 475-84.
2. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps: Umeå University; 1976.
3. Ingle J, Beveridge E, Glick D, Weichman J. Endodontic success, failure–the Washington Study. Ingle JL, Bakland LK Endodontics 4th Ed Baltimore, MD: Williams and Wilkins 1994; 22.
4. Chow T. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. J Endod 1983; 9(11): 475-9.
5. Byström A, Sunvqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985; 18(1): 35-40.

6. Gomes B, Souza S, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine *in vitro*. Int Endod J 2003; 36(4): 267-75.

7. Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against Enterococcus faecalis by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. J Endod 2002; 28(9): 634-7.

8. Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PMP, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. J Endod 2013; 39(3): 406-10.

9. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. Toxicol Appl Pharmacol 2008; 233(3): 404-10.

10. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 2007; 3(1): 95-101.

11. Mohammadi Z, Shalavi S. The effect of heat-killed Candida albicans and dentin powder on the antibacterial activity of chlorhexidine solution. Iran Endod J 2012; 7(2): 63.

12. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against Enterococcus faecalis biofilm. J Endod 2014; 40(2): 285-90.

13. Cheng Z, Al Zaki A, Hui JZ, Muzykantov VR, Tsourkas A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. Science 2012; 338(6109): 903-10.

14. Rai M, Deshmukh S, Ingle A, Gade A. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. J Appl Microbiol 2012; 112(5): 841-52.

15. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine 2012; 8(1): 37-45.

16. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005; 16(10): 2346.

17. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, et al. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. J Endod 2010; 36: 1698-702.

18. Lotfi M, Vosoughhosseini S, Ranjkesh B, Khani S, Saghiri M, Zand V. Antimicrobial efficacy of nanosilver, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate against Enterococcus faecalis. Afr J Biotechnol 2011; 10(35): 6799-803.

19. Moghadas L, Shahmoradi M, Narimani T. Antimicrobial activity of a new nanobased endodontic irrigation solution: *In vitro* study. Dental Hypotheses 2012; 3(4): 142.

20. Abbaszadegan A, Nabavizadeh M, Gholami A, Aleyasin Z, Dorostkar S, Saliminasab M, et al. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. Int Endod J 2015; 48(8): 790-800.

21. Docherty KM, Kulpa Jr CF. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. Green Chem 2005; 7(4): 185-9.

22. Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. J Endod 2012; 38(9): 1275-8.

23. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006; 32(2): 93-8.

24. Nabavizadeh M, Abbaszadegan A, Gholami A, Kadkhoda Z, Mirhadi H, Ghasemi Y, et al. Antibiofilm Efficacy of Positively Charged Imidazolium-Based Silver Nanoparticles in Enterococcus faecalis Using Quantitative Real-Time PCR. Jundishapur J Microbiol 2017; 10(10).

25. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against Enterococcus faecalis biofilm. J Endod 2014; 40(2): 285-90.

26. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. J Endod 2008; 34(12): 1515-20.

27. Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. J Endod 2010; 36(6): 1030-5.

28. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of Enterococcus faecalis by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod 2006; 32(2): 138-41.

29. Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. J Endod 2012; 38(9): 1275-8.

30. Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PMP, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. J Endod 2013; 39(3): 406-10.