

## مقایسه تأثیر مهارکننده‌های بافتی بر فعالیت ضد میکروبی یک شوینده‌ی جدید حاوی نانوذره‌ی نقره، هیپوکلریت سدیم و کلر هگزیدین

علیرضا عدل<sup>۱</sup>، محمد معتمدی فر<sup>۲</sup>، فرشته صبح نمایان<sup>۳</sup>، لادن شاه چراغی<sup>۴\*</sup>، مهرداد وثوقی<sup>۵</sup>، احمد غلامی<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار گروه اندودانتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> استاد گروه باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه اندودانتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

<sup>۴</sup> دندان پزشک، شیراز، ایران

<sup>۵</sup> استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان و دندان، گروه سلامت دهان و دندان پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

<sup>۶</sup> استادیار مرکز تحقیقات داروسازی، گروه بیوتکنولوژی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، 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<sup>1</sup>, Mohammad Motamedifar<sup>2</sup>, Fereshteh Sobh Namayan<sup>3</sup>, Ladan Shahcheraghi<sup>4\*</sup>,  
Mehrdad Vossoughi<sup>5</sup>, Ahmad Gholami<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor of Department of Endodontics, Dental School, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Professor of Department of Bacteriology, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor of Department of Endodontics, Dental School, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

<sup>4</sup> Dentist, Shiraz, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor Oral and Center Disease Research Center, Department of Dental Public Health, School of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>6</sup> Assistant Professor Pharmaceutical Science Research Center and Pharmaceutical Biotechnology Department, Shiraz University of Medical Sciences, 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  $\mu$ L of each irrigating solution was mixed with 50  $\mu$ L of an *Enterococcus faecalis* suspension, and bacterial survival was assessed after 10, 30, and 60 seconds. In the second set of experiments, 100  $\mu$ L of each inhibitor suspension was mixed with 100  $\mu$ L of each irrigating solution and incubated for one hour. Afterwards, 100  $\mu$ L 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

یک شوینده ی جدید حاوی نانو ذرات نقره (Im-based AgNPs) اثرات ضد میکروبی قابل قبولی نشان داده است. در این مطالعه تاثیر چندین مهارکننده ی بافتی (پودر عاج، ماتریکس عاج، آلومین سرم گاوی و لیپولی ساکارید باکتریال) بر روی فعالیت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم، کلرگزیدین و یک شوینده جدید حاوی نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** در سری اول آزمایش ها،  $950 \mu\text{L}$  از هر یک از شوینده ها با  $50 \mu\text{L}$  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،  $100 \mu\text{L}$  از سوسپانسیون هر یک از مهارکننده ها با  $100 \mu\text{L}$  از هر یک از شوینده ها مخلوط و به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. سپس  $100 \mu\text{L}$  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 *Dunn* و *Kruskal-wallis* برای آنالیز آماری استفاده شد.  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** در سری اول آزمایش، در هر سه زمان فعالیت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرگزیدین بیش تر از AgNPs و سالیین بود. ( $P < 0.05$ ) در سری دوم آزمایش هر چهار مهارکننده ی بافتی، فعالیت ضد میکروبی کلرگزیدین و هیپوکلریت سدیم را کاهش دادند. ( $P < 0.05$ ) غیر از لیپولی 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 سدیم و کلرگزیدین را به درجات مختلفی تحت تاثیر قرار دادند. AgNPs صرف نظر از حضور یا عدم حضور مهارکننده ها اثر ضد میکروبی قابل توجهی نشان نداد.

**کلمات کلیدی:** شوینده، کلرگزیدین، مهار کننده بافتی، نانوسیلور، هیپوکلریت سدیم  
مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۷ / دوره ۴۲ / شماره ۴ : ۸-۳۲۰.

### مقدمه

آماده سازی و علی رغم استفاده از این محلول ها، هم چنان باکتری های زنده ای در کانال حضور دارند.

علاوه بر آناتومی پیچیده کانال ها و مقاومت باکتری ها<sup>(۶)</sup>، یکی دیگر از دلایل عدم حذف باکتری ها پس از شست و شو حضور انواع مهارکننده های بافتی (Tissue inhibitors) در کانال ها می باشد. کانال های عفونی حاوی باکتری ها و محصولات آن ها، مایعات بافتی، عاج، ماتریکس عاج و بقایای بافت پالپی می باشند که نشان داده شده است که این محتویات باعث کاهش و یا مهار کامل اثرات ضد میکروبی کلرگزیدین و آیودین پتاسیم آیوداید می گردند.<sup>(۷و۸)</sup> بخش معدنی عاج نیز به دلیل قابلیت بافرینگ، نقش مهمی به عنوان مهارکننده دارد. مشخص شده است که عاج اثرات ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم و Qmix را کاهش می دهد.<sup>(۹)</sup> در تحقیقی دیگر نیز نشان داده شد که هم پودر عاج و هم سلول های کشته شده ی *Candida albicans* باعث کاهش چشمگیر فعالیت ضد میکروبی

از سال ها پیش پذیرفته شده است که میکروارگانیسم ها علت اصلی بیماری های پالپ و ایجاد ضایعات پری اپیکال هستند<sup>(۱و۲)</sup>، به همین دلیل در درمان اندودنتیک سعی می شود به روش فیزیکی و شیمیایی میزان باکتری های کانال ریشه به حداقل برسد.<sup>(۳)</sup> مطالعات نشان داده اند که در آماده سازی مکانیکی بخش وسیعی از دیواره های کانال دست نخورده باقی می ماند و حذف کامل باکتری ها از کانال با تکیه بر آن به تنهایی امکان پذیر نمی باشد؛ که دلیل این امر آناتومی پیچیده ی سیستم کانال ریشه می باشد. بنابراین کاربرد محلول های شست و شو دهنده که اثرات ضد میکروبی داشته باشند برای حذف بقایای پالپی و کشتن میکروارگانیسم ها و آماده سازی کانال لازم می باشد.<sup>(۴و۵)</sup> با وجود قابلیت بالای ضد میکروبی شوینده های رایج (هیپوکلریت سدیم و کلرگزیدین) در مطالعات *in vitro* در مطالعات کلینیکی نشان داده شده است که پس از مراحل

توسط ایمیدازولیوم معرفی شده است که تأثیر ضدباکتری زیادی علیه باکتری E. faecalis حتی در غلظت‌های پایین دارد. این قدرت بالای آنتی باکتریال، به واکنش بار مثبت این شوینده با بار منفی غشا سلولی که منجر به افزایش لیکسیج و مرگ باکتری می‌گردد نسبت داده شده است.<sup>(۲۰)</sup> این نانوپارتیکل نقره دارای بار مثبت همراه با زنجیره‌ی ایمیدازولیوم، سازگاری بافتی بالاتری در مقایسه با کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم نشان داده است.<sup>(۲۱)</sup>

علیرغم اثرات ضدباکتریایی قابل قبول نانو پارتیکل‌های نقره، تا کنون مطالعه‌ی تأثیر انواع مهارکننده‌های بافتی را بر روی آنها بررسی نکرده است. بنابراین هدف از این مطالعه آزمایشگاهی، ارزیابی تأثیر پودر عاج، ماتریکس عاج، لیپولی ساکارید باکتریال و آلبومین سرم گاوی بر فعالیت ضد میکروبی 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.<sup>(۲۰)</sup> جهت ساخت محلول AgNPs، تمامی ظروف شیشه‌ای، در محلول HCL:HNO<sub>3</sub> 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، AgNO<sub>3</sub> به ۲۰ml محلول آبی ۲/۶ mM - dodecyl-3-methylimidazolium chloride اضافه شده و

کلرهگزیدین می‌گردند.<sup>(۱۰)</sup> همچنین گزارش شده است که عاج و آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumine) باعث کاهش قدرت میکروب کشی کلرهگزیدین و MTAD می‌گردند.<sup>(۱۱)</sup> بنابراین لازم است شوینده‌های جدید و استراتژی‌های ضد عفونی کننده‌ی جدید در حضور مهارکننده‌های بافتی بررسی شوند تا توانایی ضد میکروبی آن‌ها به خوبی ارزیابی گردد.

اخیرا نانو ذرات نقره به دلیل توانایی ضدباکتریایی و ضد ویروسی وسیع الطیفی که دارند در بسیاری از زمینه‌های بهداشتی مورد استفاده قرار گرفته اند.<sup>(۱۲)</sup> 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.<sup>(۱۳)</sup> مکانیسم ضدباکتریایی این نانو ذرات مربوط به چسبیدن و نفوذ آنها به دیواره سلولی باکتری‌هاست که در نهایت منجر به ازدست رفتن یکپارچگی و افزایش نفوذ پذیری دیواره سلولی می‌گردد.<sup>(۱۴)</sup> مطالعات نشان داده اند که نانوذرات نقره از پتانسیل ضدباکتریایی بالایی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی<sup>(۱۵)</sup> و باکتری‌های مقاوم بر خوردارند.<sup>(۱۶)</sup>

خاصیت ضد میکروبی قابل قبول و همچنین سازگاری بافتی به خصوص در غلظت‌های کم<sup>(۱۷)</sup>، 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.<sup>(۱۸)</sup> 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.<sup>(۱۹)</sup> اخیرا نوعی نانوذره نقره دارای بار مثبت و پوشیده شده

تست واکنش کاتالاز تایید شد. در مرحله‌ی بعد با استفاده از ۵ mL سایلین استریل، یک سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. با استفاده از یک اسپکتروفوتومتر، یک سوسپانسیون نوری با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (معادل کدورت ۰/۵ لوله مک فارلند که برابر  $10^8 \times 1/5$  CFU/mL) تنظیم گردید.

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

۱۰  $\mu$ L 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 ضد میکروبی شوینده‌ها در حضور مهارکننده‌های بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ۲۸ mgr پودر عاج، ۵ mgr ماتریکس عاج، ۵ mgr آلبومین سرم گاوی ۱۸ درصد و ۵ میلی گرم لیپوپلی ساکارید (1  $\mu$ gr/mL) در ۱۰۰  $\mu$ L آب مقطر حل گردیدند. ۱۰۰  $\mu$ L از سوسپانسیون حاوی مهارکننده با ۱۰۰  $\mu$ L از هر یک از شوینده‌ها مخلوط و به مدت ۱ ساعت انکوبه گردیدند. سپس ۱۰۰  $\mu$ L از سوسپانسیون میکروبی به آن‌ها اضافه گردید طوری که حجم کلی ۳۰۰  $\mu$ L به دست آمد. در گروه کنترل منفی، سایلین استریل به جای محلول‌های شوینده مورد استفاده قرار گرفت. در گروه کنترل مثبت، از ۱۰۰  $\mu$ L 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.

بعد از تکان دادن شدید، محلول تازه‌ی 0.4M NaBH<sub>4</sub> توسط قطره چکان به آن اضافه گردید تا زمانی که محلولی به رنگ طلایی بدست آید. سپس برای حذف یون‌های آبی اضافه، محلول کلئوئید 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 ۱۷ درصد EDTA (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 (E. faecalis) ATCC29212 به عنوان میکروارگانیزم 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

در هر سه زمان ۱۰ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۱ ساعت مهارکننده‌ها بر توانایی ضد میکروبی شوینده‌ها تأثیرگذار بودند ( $P < 0/05$ ).

در زمان ۱۰ ثانیه در گروه هیپوکلریت سدیم، تمام مهارکننده‌ها غیر از لیپوساکارید باکتریال ( $P = 1$ ) بر فعالیت ضد میکروبی اثر منفی داشتند ( $P < 0/05$ ). در این زمان بیشترین اثر مهاری بر روی هیپوکلریت سدیم مربوط به آلومین بود که با سایر مهارکننده‌ها غیر از عاج ( $P = 0/375$ ) تفاوت آماری داشت ( $P < 0/05$ ).

در گروه کلرگزیدین تمام مهارکننده‌ها در مقایسه با گروه کنترل فعالیت ضد میکروبی را کاهش دادند ( $P < 0/05$ ). در همین زمان بیشترین اثر مهاری بر روی کلرگزیدین مربوط به لیپوساکارید بود که با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ).

در این زمان گروه‌های نانوپارتیکل نقره و سالین صرف نظر از حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها، رشد زیاد باکتری‌ها را نشان دادند ( $P > 0/05$ ). (جدول ۲)

برای هیپوکلریت سدیم بعد از ۱۰ دقیقه تماس با آلومین و عاج، در مقایسه با گروه کنترل اثر مهاری داشتند ( $P < 0/05$ ). در حالی که لیپوساکارید و ماتریکس عاج این اثر را نداشتند ( $P > 0/05$ ).

بیشترین اثر مهاری برای هیپوکلریت سدیم مربوط به آلومین بود که با سایر گروه‌ها غیر از عاج ( $P = 0/375$ ) تفاوت داشت ( $P < 0/05$ ).

در این زمان در گروه، کلرگزیدین، لیپوساکارید و آلومین با گروه کنترل تفاوت داشتند ( $P < 0/05$ ). بیشترین اثر مهاری مربوط به لیپوساکارید بود که با تمام گروه‌ها غیر از آلومین ( $P = 1$ ) تفاوت داشت ( $P < 0/05$ ). مجدداً در این زمان گروه‌های نانوپارتیکل نقره و نرمال سالین صرف نظر

سپس بعد از مدت زمان انکوباسیون، نمونه‌های  $100 \mu\text{L}$  از سوسپانسیون‌های مورد آزمایش برداشته شد و رقیق سازی سریالی انجام شد.  $10 \mu\text{L}$  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  $0/05$  در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

سری اول آزمایش در هر سه زمان بین محلول‌های شوینده تفاوت معنی‌داری دیده شد ( $P < 0/05$ ). (جدول ۱) مقایسه‌ی دو به دو شوینده‌ها نشان داد که در هر سه زمان قدرت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرگزیدین بیش تر از شوینده‌ی نانوپارتیکل نقره و نرمال سالین بود ( $P < 0/05$ ). اما بین هیپوکلریت سدیم و کلرگزیدین و هم چنین بین شوینده‌ی نانوپارتیکل نقره و نرمال سالین تفاوت آماری وجود نداشت ( $P > 0/05$ ).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت بر حسب

شوینده‌ها و زمان

| گروه‌ها             | ۱۰ ثانیه    | ۳۰ ثانیه    | یک دقیقه    |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| هیپوکلریت سدیم      | $1/3+2/4$   | $0/8+2/1$   | $0/5+1/8$   |
| کلرگزیدین           | $1/7+2/9$   | $1/4+2/6$   | $1/1+2/4$   |
| نانوسیلور           | $8/1+0/3$   | $8/1+0/2$   | $8/2+0/1$   |
| نرمال سالین         | $8/0+0/3$   | $7/9+0/4$   | $8/0+0/6$   |
| آزمون کروسکال-والیس | $X^2=4/05$  | $X^2=41/67$ | $X^2=42/01$ |
|                     | $P < 0/001$ | $P < 0/001$ | $P < 0/001$ |

در گروه کلرگزیدین تمام مهارکننده‌ها غیر از عاج را نشان دادند ( $P > 0/05$ ). (جدول ۳)

در گروه هیپوکلریت سدیم، آلومین و ماتریکس عاج اثر مهاری داشتند ( $P < 0/05$ ). اما لیپوساکارید و عاج اثر مهاری نداشتند ( $P > 0/05$ ).

در این زمان بیشترین اثر مهاری مربوط به آلومین بود که با سایر گروه‌ها غیر ماتریکس عاج ( $P = 0/126$ ) تفاوت داشت ( $P < 0/05$ ).

از حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها رشد بالای باکتری‌ها را نشان دادند ( $P > 0/05$ ). (جدول ۳)

در گروه هیپوکلریت سدیم، آلومین و ماتریکس عاج اثر مهاری داشتند ( $P < 0/05$ ). اما لیپوساکارید و عاج اثر مهاری نداشتند ( $P > 0/05$ ).

در این زمان بیشترین اثر مهاری مربوط به آلومین بود که با سایر گروه‌ها غیر ماتریکس عاج ( $P = 0/126$ ) تفاوت داشت ( $P < 0/05$ ).

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت برحسب مهارکننده‌ها بر فعالیت ضد میکروبی شونده‌ها و گروه در زمان ۱۰ ثانیه

| شونده          | مهار کننده |             |                 |          |
|----------------|------------|-------------|-----------------|----------|
|                | عاج        | ماتریکس عاج | لیپوپلی ساکارید | آلومین   |
| هیپوکلریت سدیم | ۷/۳(۰/۵)   | ۶/۸(۰/۳)    | ۰/۰ (۰/۰)       | ۸/۰(۰/۲) |
| کلرگزیدین      | ۶/۹(۰/۴)   | ۷/۰(۰/۳)    | ۷/۸(۰/۶)        | ۷/۱(۰/۵) |
| نانوسیلور      | ۷/۹(۰/۴)   | 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) |

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت برحسب مهارکننده‌ها بر فعالیت ضد میکروبی شونده‌ها و گروه در زمان ۱۰ دقیقه

| شونده          | مهار کننده |             |                 |           |
|----------------|------------|-------------|-----------------|-----------|
|                | عاج        | ماتریکس عاج | لیپوپلی ساکارید | آلومین    |
| هیپوکلریت سدیم | ۷/۴(۰/۵)   | ۶/۹(۰/۴)    | ۰/۰ (۰/۰)       | ۸/۲(۰/۱)  |
| کلرگزیدین      | ۶/۹(۰/۶)   | ۶/۹(۰/۵)    | ۷/۹(۰/۴)        | ۷/۳(۰/۴)  |
| نانوسیلور      | ۸/۱(۰/۲)   | ۸/۲(۰/۰۲)   | ۸/۲(۰/۰۸)       | ۸/۲(۰/۰۷) |
| نرمال سالین    | ۸/۰(۰/۶)   | ۸/۲(۰/۱)    | ۸/۳(۰)          | ۷/۶(۰/۵)  |

جدول ۴: میانگین و انحراف معیار کلونی فرمینگ یونیت بر حسب تأثیر مهارکننده‌ها بر فعالیت ضد میکروبی شونده‌ها و گروه در زمان ۱ ساعت

| شونده          | مهار کننده |             |                 |          |
|----------------|------------|-------------|-----------------|----------|
|                | عاج        | ماتریکس عاج | لیپوپلی ساکارید | آلومین   |
| هیپوکلریت سدیم | ۲/۵(۲/۸)   | ۷/۱(۰/۲)    | ۰/۰ (۰/۰)       | ۸/۱(۰/۳) |
| کلرگزیدین      | ۴/۱(۲/۱)   | ۷/۰(۰/۵)    | ۸/۰(۰/۴)        | ۷/۷(۰/۶) |
| نانوسیلور      | ۸/۲(۰/۰)   | ۸/۳(۰/۰)    | ۸/۲(۰/۰)        | ۸/۳(۰/۰) |
| نرمال سالین    | ۸/۳(۰/۰)   | ۸/۳(۰/۰)    | ۸/۳(۰/۰)        | ۷/۵(۰/۶) |

## بحث

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

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

نتایج بخش اول مقاله‌ی حاضر نشان داد که قدرت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرگزیدین معادل یکدیگر و بیشتر از نانوپارتیکل نقره‌ی پوشش داده شده با ایمیدازولیوم می‌باشد. این یافته با نتایج مطالعه‌ی Abbaszadegan و همکارانش<sup>(۲۰)</sup> و Nabavizadeh و همکاران<sup>(۲۴)</sup> که نشان دادند همین محلول نانوپارتیکل نقره اثرات ضد میکروبی 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<sup>(۲۰)</sup>، 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<sup>(۲۴)</sup> 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<sup>(۲۵)</sup> وقتی نانوپارتیکل نقره دارای بار مثبت به مدت ۲ دقیقه با عاج آلوده با E. faecalis در تماس بود، اثرات ضد میکروبی 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.<sup>(۲۶ و ۲۷)</sup>

البته باید متذکر شد که در بخش دوم این مطالعه که تأثیر مهارکننده‌های بافتی بر روی توانایی ضد میکروبی 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 ضد میکروبی شوینده‌های اندودانتیک را تحت تأثیر قرار دهند.<sup>(۲۸-۳۰)</sup>

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آلبومین، عاج و ماتریکس عاج در هر سه زمان ۱۰ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۱ ساعت بر روی توانایی ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم اثر مهاری دارند. اما لیپوساکارید چنین تأثیری را نشان نداد. در رابطه با کلرگزیدین 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 ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم و کلرگزیدین پرداخته بودند بیش تر از پودر عاج به عنوان

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 آنها تاثیری بر فعالیت ضد میکروبی شوینده نانوپارتیکل نقره نداشت. این یافته آن است که در این مطالعه نانوپارتیکل نقره مشابه گروه نرمال سالیین رفتار کرد و عملاً فاقد اثرات ضد میکروبی بود.

### نتیجه گیری

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

### تشکر و قدردانی

مقاله ی حاضر برگرفته از پایان نامه ی دانشجویی با شماره ی طرح ۱۴۸۶۲ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز می باشد. کلیه ی هزینه ی این طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز پرداخت گردیده که بدین وسیله قدردانی می گردد.

مهارکننده استفاده کرده بودند. در مطالعه ی Morgental و همکارانش<sup>(۸)</sup> پودر عاج بر روی فعالیت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم ۶ 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 مطالعه ی حاضر می باشد اما در رابطه با کلرهگزیدین نتایج دو مطالعه در یک راستا نمی باشد.

در مطالعه ی Portenier و همکاران<sup>(۷)</sup> نشان داده شد که پودر عاج باعث به تاخیر افتادن و آلبومین سرم گاوی باعث مهار شدید اثرات ضد میکروبی کلرهگزیدین می گردد که این نتایج با یافته‌های مطالعه ی حاضر در یک راستا می باشد. همان طور که قبلاً ذکر شد در این مطالعه علاوه بر پودر عاج و آلبومین سرم گاوی از LPS و ماتریکس عاج نیز به عنوان مهار کننده‌های بافتی استفاده گردید. ماتریکس عاج در جاتی از اثرات مهاری هم بر روی هیپوکلریت سدیم و هم بر روی کلرهگزیدین نشان داد، اما LPS فقط بر روی کلرهگزیدین موثر بود.

در مطالعه ی Shrestha و همکاران<sup>(۲۲)</sup> نیز LPS و ماتریکس عاج در کنار پودر عاج، آلبومین سرم گاوی و بافت پالپی فعالیت ضد میکروبی نانوپارتیکل چیتوزان و فتوداینامیک تراپی را به درجات متفاوتی کاهش دادند. دلیل اثر مهاری بیشتر آلبومین بر هیپوکلریت سدیم، احتمالاً واکنش شیمیایی هیپوکلریت سدیم با آلبومین به عنوان یک پروتئین می باشد.

### 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.