

Evaluation of Antimicrobial Effect of Resin Cements Containing Nano Particles on Cariogenic Bacteria of *Streptococcus Mutans*

Abdolrahim Davari¹ 

Farnaz Farahat² 

Hengame Zandi³ 

Hooman Fakhar⁴ 

1. Professor, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2. Associate Professor, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

3. Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

4. **Corresponding Author:** Post Graduate Student, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Email: hf1374@gmail.com

Abstract

Introduction: this study aimed to investigate the antibacterial properties of resin cement containing nano-titanium oxide particles and nano-chitosan particles on the cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*.

Materials & Methods: This experimental study was conducted at Yazd University in 2023 and included 60 samples divided into three groups. The control group samples were made of resin cement, and the second and third groups contained chitosan and titanium dioxide nanoparticles, respectively. For checking the antibacterial effects, 24 samples were placed on the Culture medium containing *Streptococcus mutans*, and the diameter of the non-growth halo of bacteria was measured. To investigate how time impacts the antibacterial activity of the samples, four samples from each of the three groups were placed in test tubes containing culture medium, and on days 1, 8, and 28, *Streptococcus mutans* was added to the test tube, and after culture on agar medium, the number of bacteria was reported. The data was analyzed using Kolmogorov-Smirnov and Independent samples T-test, Kruskal-Wallis Test non-parametric equivalents.

Results: The mean diameter of the non-growth halo in the control group was significantly lower than the other two groups (p value < 0.05). In investigating the effect of time on the antibacterial effect of the samples, on the first day, the average number of bacteria in resin cement containing titanium was lower than the other two groups, but this difference was not statistically significant. (p value > 0.05) The average number of bacteria on days 8 and 28 was the same in all three groups.

Conclusion: Resin cement containing titanium and chitosan reduces the growth of bacteria in the vicinity of samples. Although the number of bacteria in the surroundings of these nanoparticles decreased on the first day, the long-term results indicated no difference between the groups.

Key words: Resin cement; Titanium dioxide; Chitosan; *Streptococcus mutans*.

Received: 30.05.2024

Revised: 02.09.2024

Accepted: 05.11.2024

How to cite: Davari A, Farahat F, Zandi H, Fakhar H. Evaluation of Antimicrobial Effect of Resin Cements Containing Nano Particles on Cariogenic Bacteria of *Streptococcus Mutans*. J Isfahan Dent Sch 2024; 20(3): 206-14.

بررسی اثر ضد میکروبی سمان‌های رزینی حاوی نانوذرات بر باکتری پوسیدگی‌زای استرپتوکوکوس موتانس

۱. استاد، گروه دندان پزشکی ترمیمی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
 ۲. دانشیار، گروه دندان پزشکی ترمیمی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
 ۳. دانشیار، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
 ۴. نویسنده مسئول: دستیار تخصصی، گروه دندان پزشکی ترمیمی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
 Email: hf1374@gmail.com

عبدالرحیم داوری^۱ ID

فرناز فراحت^۲ ID

هنگامه زندی^۳ ID

هومان فخار^۴ ID

چکیده

مقدمه: هدف این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی سمان‌های رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم اکساید و نانو ذرات کیتوزان بر باکتری پوسیدگی‌زای استرپتوکوکوس موتانس بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه‌ی تجربی در دانشگاه یزد در سال ۱۴۰۲ انجام شد و شامل ۶۰ عدد نمونه بود که به ۳ گروه تقسیم شدند. نمونه‌های گروه اول (شاهد) از جنس سمان رزینی و گروه دوم و سوم به ترتیب حاوی نانو ذرات کیتوزان و تیتانیوم دی‌اکساید بودند. برای بررسی اثرات ضدباکتریایی، ۲۴ نمونه بر روی محیط کشت حاوی استرپتوکوکوس موتانس قرار گرفتند و قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری اندازه‌گیری شد. برای بررسی تأثیر زمان در فعالیت ضد باکتریایی، تعداد ۴ نمونه از هر گروه در لوله آزمایش حاوی محیط کشت قرار داده شد. در روزهای ۱، ۸ و ۲۸ به لوله آزمایش، باکتری اضافه شد و پس از کشت بر محیط آگار، تعداد باکتری‌ها گزارش گردید. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov و آزمون ناپارامتری Independent Samples T-test و Kruskal-Wallis استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد در گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر از دو گروه دیگر بود ($p \text{ value} < 0/05$). در بررسی تأثیر زمان بر اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها، در روز اول میانگین تعداد باکتری در گروه سمان رزینی حاوی تیتانیوم، کمتر از دو گروه دیگر بود اما تفاوت معنی‌دار نبود ($p \text{ value} > 0/05$). میانگین تعداد باکتری در روز ۸ و ۲۸ در هر سه گروه یکسان بود.

نتیجه‌گیری: سمان رزینی حاوی تیتانیوم و کیتوزان منجر به کاهش رشد باکتری در مجاورت نمونه‌ها می‌شود. اگرچه تعداد باکتری‌ها در روز اول در مجاورت این نانو ذرات کاهش داشت ولی نتایج طولانی‌مدت حاکی از عدم تفاوت بین گروه‌ها بود.

کلید واژه‌ها: سمان رزینی؛ تیتانیوم دی اکساید؛ کیتوزان؛ استرپتوکوکوس موتانس.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۶/۱۲

تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۰۳/۱۰

استناد به مقاله: داوری عبدالرحیم، فراحت فرناز، زندی هنگامه، فخار هومان. بررسی اثر ضد میکروبی سمان‌های رزینی حاوی نانوذرات بر باکتری پوسیدگی‌زای استرپتوکوکوس موتانس. مجله دانشکده دندان پزشکی اصفهان. ۱۴۰۳؛ ۲۰(۳): ۲۱۴-۲۰۶.

مقدمه

ترمیم‌های سرامیکی به دلیل زیبایی عالی، سهولت ساخت و زیست‌سازگاری اخیراً در بین دندان‌پزشکان و بیماران محبوبیت پیدا کرده‌اند (۱). سمان‌های رزینی برای ترمیم‌های سرامیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. این سمان‌ها ماندگاری زیادی دارند و به علت توانایی باند شدن به دندان و برخی رستوریشن‌ها بیشتر مورد پذیرش قرار گرفته‌اند (۲-۴).

هنگام سمان کردن ترمیم‌های غیر مستقیم سرامیکی، دندان‌پزشکان باید نوع سمان رزینی مورد استفاده را در نظر بگیرند، زیرا سمان‌های مختلف تشکیل شکاف مارژینال و داخلی متفاوتی را نشان می‌دهند (۵). تطابق داخلی ناکافی و سیل مارژینال سمان‌های رزینی می‌تواند منجر به کاهش استحکام و ریزش مضر در مارژین ترمیم شود. بیوفیلم شکل گرفته در شکاف مارژینال ناشی از انقباض پلیمرایزسیون، نشان‌دهنده‌ی افزایش رشد/استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد که این موضوع خود باعث هیدرولیز شیمیایی مونومرهای سمان در مارژین ترمیم است (۶).

باکتری/استرپتوکوکوس موتانس یک کوکسی بی‌هوازی اختیاری و گرم مثبت است که به عنوان پاتوژن اصلی مسئول پوسیدگی دندان انسان با توانایی بالا در تشکیل بیوفیلم شناخته شده است. این باکتری در حضور کربوهیدرات‌های قابل تخمیر باعث تخریب سطوح سخت دندانی می‌شود (۷، ۸). نداشتن شکاف مارژینال عامل مهمی برای موفقیت بلندمدت ترمیم‌های ثابت می‌باشد و وجود آن مسئول ۱۰ درصد از شکست‌های پروتزی است. تطابق نامناسب مارژینال منجر به انحلال سمان، نفوذ باکتری‌ها و پوسیدگی ثانویه با عوارض پالپی، بیماری پریودنتال، تغییر رنگ حاشیه‌ای و در نهایت شکست عملکردی و زیبایی شناختی ترمیم می‌شود (۹، ۱۰).

به دلیل عدم وجود خاصیت ضد میکروبی در کامپوزیت رزین‌ها و سمان‌های مشتق شده از آن‌ها چندین روش برای مهار رشد بیوفیلم ایجادکننده‌ی پوسیدگی در سمان‌ها و رزین کامپوزیت‌ها استفاده شده است (۱۱). یکی از آن‌ها استفاده از اکسیدهای فلزاتی همانند منیزیم، زینک، نقره و تیتانیوم می‌باشد

(۱۲-۱۴). نشان داده شده است تیتانیوم اکساید، هنگامی که در ساختار رزین کامپوزیت به کار می‌رود یک ماده ضد میکروبی با خواص زیبایی قابل مقایسه با محصولات تجاری موجود ایجاد می‌کند. فعالیت فوتوکاتالیتیک دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) در زیر نور UV توجه بیشتر پژوهشگران در زمینه‌های مختلف را به خود جلب کرده است. در مواجهه با نور UV، دی‌اکسید تیتانیوم گونه‌های اکسیژن فعال (Oxygen Species Reactive) تولید می‌کند و باعث خواص ضد میکروبی نسبت به طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، تک یاخته‌ها و ویروس‌ها می‌شود (۷). یک ماده پرکاربرد دیگر با داشتن خصوصیات غیر سمی، غیر آنتی‌ژنی و زیست‌سازگاری یک بیوپلیمر جدا شده از سخت‌پوستان به نام کیتوزان می‌باشد که گزارش شده است اثرات مفید متعدد مرتبط با سلامتی، از جمله خواص ضد باکتری و ضد قارچی قوی دارد (۱۵). هنگامی مواد ضد میکروبی مقیاس نانو به کار روند اثرات افزایش یافته‌ای دارند (۱۶، ۱۷). نانومتریال‌ها موادی هستند که حداقل در یک بعد کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشند که شامل خوشه‌ها و صفحه‌هایی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند (۱۸). این ابعاد کوچک‌تر نسبت سطح به حجم بالایی ایجاد می‌کند که در نتیجه آن واکنش بهتری با سایر مواد از جمله غشای سلولی و دیواره‌ی میکروب‌ها ایجاد می‌شود که اثرات ضد میکروبی نانومتریال‌ها را وسیع‌تر و مؤثرتر می‌کند (۱۹). با توجه به محدود بودن مطالعات در بررسی خصوصیات ضد باکتریایی سمان‌های رزینی، هدف این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی سمان‌های رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم اکساید و نانو ذرات کیتوزان بر باکتری پوسیدگی‌زای/استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد. در فرضیه‌ی صفر مطالعه هیچ کدام از نانوذرات در هیچ زمانی خواص ضد میکروبی نشان نمی‌دهند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۲ در دانشگاه علوم پزشکی یزد با شناسه‌ی اخلاق IR.SSU.DENTISTRY.REC.1402.010 انجام شد و

شامل ۶۰ عدد نمونه از جنس سمان رزینی بود. نمونه‌ها با ابعاد مورد نظر و سطوح پالیش شده و صاف‌گزینش و نمونه‌های دارای ترک حذف شدند. از این تعداد، ۲۴ نمونه (۳ گروه ۸ تایی) برای آزمایش اول و تعداد ۳۶ نمونه (۳ گروه ۱۲ تایی) جهت انجام آزمایش دوم بود. در گروه اول به عنوان گروه شاهد، نمونه‌ها از جنس سمان رزینی Choice2 (Bisco, USA) بودند.

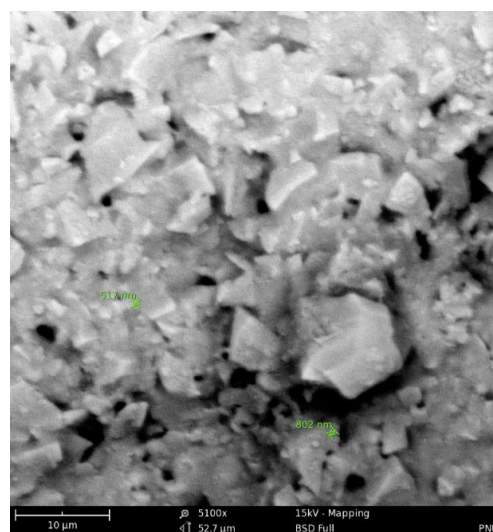
گروه دوم و سوم به ترتیب از جنس سمان رزینی Choice2 ترکیب شده با نانو ذرات کیتوزان (Nano sany, Iran) و سمان رزینی Choice2 ترکیب شده با نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم (Nano sany, Iran) بود. برای تهیه نمونه‌های گروه دوم، نانو ذرات کیتوزان با اندازه‌ی ۵۰ nm که از شرکت تولیدکننده‌ی ذرات نانو به صورت آماده و غربالگری شده تهیه شده بود، با سمان رزینی Choice2، بر روی یک اسلب شیشه‌ای به وسیله‌ی اسپاتول پلاستیکی کوچک در یک محیط نیمه تاریک مخلوط شد. جهت یکنواختی نمونه‌ها، مواد مخلوط شده به مدت ۵ دقیقه مجدداً در دستگاه vortex (Heidolph, Germany) مخلوط شدند. در این گروه مقدار ۰/۵ گرم کیتوزان به ۴/۵ گرم سمان رزینی اضافه شد تا نمونه‌هایی حاوی ۱۰ درصد وزنی کیتوزان تهیه شود (۱۲).

برای تهیه نمونه‌های گروه سوم، سمان رزینی Choice2 با نانو ذرات تیتانیوم دی اکساید با اندازه‌ی ۲۰ nm مشابه گروه دوم مخلوط شد. در این گروه مقدار ۰/۴۴۵ گرم نانو ذرات تیتانیوم دی اکساید به ۴/۵ گرم سمان رزینی اضافه شد تا نمونه‌هایی حاوی ۹ درصد وزنی تیتانیوم دی اکساید تهیه شود (۱۳). در هر سه گروه مطالعه جهت تهیه نمونه‌ها ابتدا یک اسلب قرار داده و بر روی آن کاغذ سلولوئیدی گذاشته و سپس مولدهایی از جنس لاستیک فشرده با قطر داخلی ۵ mm و ضخامت ۱ mm قرار داده شد. سپس سمان رزینی گروه مدنظر را در داخل مولد گذاشته و بر روی آن یک کاغذ سلولوئیدی و سپس یک لام آزمایشگاهی شیشه‌ای قرار داده شد. سپس نمونه‌ها توسط لایت کیور DTE LITEX696 (Dentamerica, USA) با شدت نور خروجی ۱۲۰۰ mw/cm² با فاصله‌ی ۱ میلی‌متر از سطح خارجی

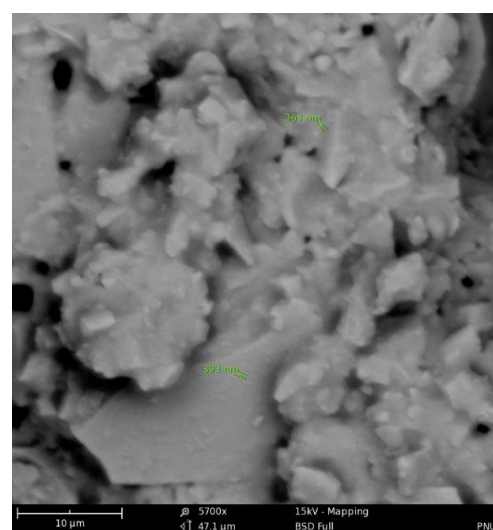
نمونه‌ها به مدت ۴۰ ثانیه (۲۰ ثانیه از هر طرف) کیور شدند. سپس همه‌ی سطوح نمونه‌ها به طور یکسان تحت پرداخت با توالی رنگی دیسک‌های پالیش (TORVM, Russia) قرار گرفتند. در انتها نمد پالیش (FGM, Brazil) Diamond جهت پالیش و مسطح نمودن نمونه‌ها استفاده شد. سطح همه‌ی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری (kern, Germany) بررسی شد و نمونه‌های دارای ترک یا پرداخت نامناسب حذف شدند. جهت بررسی بیشتر نانو ذرات و اطمینان از یکنواختی توزیع آن‌ها از هر گروه چند نمونه به صورت تصادفی انتخاب شد و زیر میکروسکوپ الکترونی SEM (Pro X, Netherlands) بررسی شدند (شکل ۱ و ۲). در انتها نمونه‌های تهیه شده تحت نور UV، استریل شدند.

ابتدا سویه‌ی استاندارد باکتری/استرپتوکوکوس موتانس ATCC 35668 بصورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. سویه‌ی/استرپتوکوکوس موتانس در لوله آزمایش محتوی محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث (TSB; Merck, Germany) تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس با استفاده از لوپ استریل سوسپانسیون باکتریایی به محیط آگار خوندار غنی شده با ۵ درصد خون گوسفندی (Merck, Germany) تلقیح و کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت انجام شد تا از خلوص باکتری اطمینان حاصل شود. جهت بررسی اثرات ضدباکتریایی از روش انتشار روی محیط آگار استفاده شد. در این روش ابتدا از سویه استاندارد (که قبلاً طبق روش ذکر شده از نظر خلوص و هویت تأیید شد)، سوسپانسیونی در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژیک تهیه شده و با لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه گردید تا کدورتی معادل غلظت لوله ۰/۵ مک فارلند (۱۰^۸CFU/ml × ۱/۵ باکتری) ایجاد شود. سپس با استفاده از سواب استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتریایی بر روی

محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) غنی شده با ۵ درصد خون گوسفندی تلقیح و بصورت چمنی کشت داده شد. سپس جهت انجام آزمایش اول، ۲۴ نمونه ساخته شده، جهت بررسی اثرات ضد میکروبی با فاصله ۲۴ میلی متر از یکدیگر بر روی محیط کشت قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط های کشت در دمای ۳۵ درجه ی سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف نمونه بر حسب میلی متر اندازه گیری و ثبت شد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانو ذرات کیتوزان در ساختار سمان رزینی کیور شده



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در ساختار سمان رزینی کیور شده

جهت بررسی اثر ضد باکتریایی نمونه ها در زمان های مختلف، تعداد ۴ نمونه از هر یک از گروه ها بطور جداگانه در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر برین هارت اینفیوژن براث (BHI; Merck, Germany) قرار داده شده و در دمای ۳۵ درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. در روزهای ۱، ۸ و ۲۸ نمونه های هر گروه بطور جداگانه خارج و به لوله های آزمایش حاوی محیط کشت BHI منتقل گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی / استرپتوکوکوس موتانس با غلظت $2/5 \times 10^5$ CFU/ml به لوله آزمایش حاوی نمونه اضافه شد. لوله آزمایش در دمای ۳۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت نگهداری شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون داخل لوله آزمایش به محیط کشت آگار خون دار غنی شده با ۵ درصد خون گوسفندی تلقیح و کشت داده شد. بعد از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت، تعداد کلنی ها شمارش شده و تعداد باکتری بصورت CFU/ml گزارش گردید. لازم به ذکر است جهت تحقق فعالیت فوتوکاتالستی دی اکسید تیتانیوم، در حین انکوباسیون نهایی نمونه های گروه سوم به مدت ۴ ساعت در روز تحت نور مرئی قرار گرفتند.

پس از جمع آوری داده ها، اطلاعات وارد نرم افزار SPSS نسخه ی ۲۷ (IBM Corporation, Armonk, NY) شد. جهت آنالیز داده ها از آزمون ناپارامتری Independent Samples T-test، Kruskal-Wallis استفاده شد ($p \text{ value} = 0/05$).

یافته ها

این مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی با هدف تعیین اثرات ضد باکتریایی سمان های رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم دی اکساید و نانو ذرات کیتوزان بر باکتری پوسیدگی زای / استرپتوکوکوس موتانس می باشد. جهت آنالیز داده ها در این مطالعه از آزمون ناپارامتری Independent Samples T-test، Kruskal-Wallis استفاده شد. ($p \text{ value} = 0/05$).

ابتدا نرمالیتی متغیرهای قطر هاله عدم رشد باکتری و تعداد باکتری به وسیله آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت و به علت عدم برخورداری از توزیع نرمال در این متغیرها، جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های ناپارامتریک استفاده گردید ($p \text{ value} < 0/05$).

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری برحسب گروه‌های مورد مطالعه در Error Bar قابل مشاهده می‌باشد (نمودار ۱). بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون Kruskal-Wallis به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی، اختلاف معنی‌داری بین میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری برحسب گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد ($p \text{ value} = 0/028$) (جدول ۱).

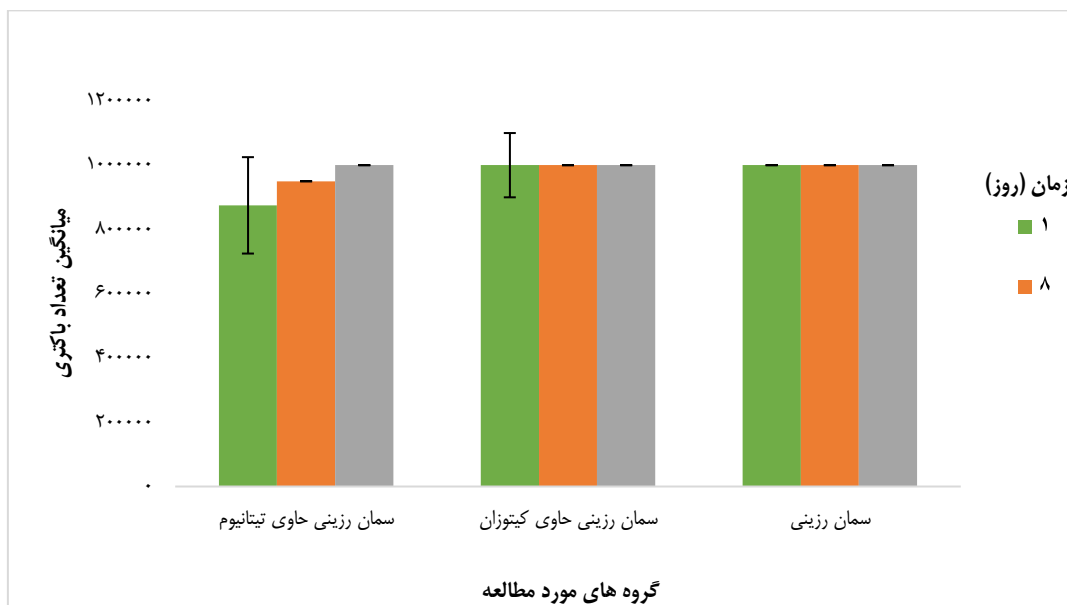
جدول ۱: مقایسه‌ی میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری برحسب گروه‌های مورد مطالعه ($p \text{ value} = 0/028$)

گروه	میانگین (میلی متر)	انحراف معیار
سمان رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم	۰/۶۲۵	۰/۵۱۷
سمان رزینی حاوی نانو ذرات کیتوزان	۰/۵۰۰	۰/۵۳۴
سمان رزینی (شاهد)	*	*

Independent sample T-test
Kruskal Wallis Test

در ادامه مقایسه‌ی دو به دوی گروه‌ها با استفاده از آزمون Post hoc نشان داده شد که میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر از دو گروه سمان رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم ($p \text{ value} = 0/011$) و سمان رزینی حاوی نانو ذرات کیتوزان ($p \text{ value} = 0/043$) می‌باشد. اگرچه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در گروه سمان رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم ($0/625 \pm 0/517$) بیشتر از گروه سمان رزینی حاوی نانو ذرات کیتوزان ($0/534 \pm 0/500$) بود اما این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود ($p \text{ value} = 0/613$).

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون Kruskal-Wallis به منظور بررسی میانگین تعداد باکتری سمان رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم در طی زمان، اگرچه میانگین تعداد باکتری در روز اول (875000 ± 150000) کمتر از روز ۸ (1000000) بود اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p \text{ value} = 0/113$) (نمودار ۱). میانگین تعداد باکتری سمان رزینی حاوی نانو ذرات کیتوزان در روزهای اول، ۸ و ۲۸ (1000000 ± 0) یکسان بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین زمان‌ها وجود نداشت ($p \text{ value} = 0/368$) (نمودار ۱).



نمودار ۱: میانگین تعداد باکتری گروه‌های مورد مطالعه در طی زمان

نبود. در بررسی میانگین تعداد باکتری‌ها در روز اول، نانوذرات تیتانیوم دی‌اکساید بیشترین تأثیر را در کاهش تعداد باکتری داشتند و پس از آن نانوذرات کیتوزان تعداد باکتری کمتری را نشان داد.

در بررسی تعداد باکتری‌ها در روزهای ۸ و ۲۸ بین گروه‌های مطالعه، تفاوتی وجود نداشت.

مواد ضد میکروبی در مقیاس نانو اثرات افزایش یافته‌ای دارند (۱۶، ۱۷). زیرا نسبت سطح به حجم بالاتری دارند (۱۹). Friedman و Juneja اشاره به آن داشتند که این مولکول‌های کوچک‌تر، راحت‌تر به غشای باکتری نفوذ کرده و در غلظت‌های پایین اثر افزایش یافته‌ای را نشان می‌دهند (۲۰). هنگامی که باکتری‌ها به سطح رزین اتصال پیدا می‌کنند، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در مواجهه با نور، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید می‌کند که این اکسیژن فعال به صورت مستقیم با غشای باکتری واکنش داده و حتی با نفوذ به آن منجر به آسیب به DNA باکتری و مرگ سلولی می‌شود (۲۲).

Fauzi و همکاران، در مطالعه‌ی خود بر روی تیتانیوم به نتایج مشابه با مطالعه‌ی حاضر دست یافتند و گزارش نمودند که با افزایش درصد وزنی تیتانیوم، خاصیت ضد میکروبی افزایش یافته است (۱۳). در خصوص خاصیت ضد میکروبی کیتوزان، همبستگی و اتصال بین گروه آمین با بار مثبت کیتوزان و گروه‌های کربوکسیلیک با بار منفی فسفولپید غشای باکتری منجر به آسیب غشای سلولی شده که نتیجه‌ی آن نشت مواد سلولی و مرگ باکتری می‌باشد (۲۳).

Sodagar و همکاران در مطالعه‌ی خود بر روی نانو ذرات کیتوزان به این نتیجه رسیدند که همه‌ی غلظت‌های نانوذرات کیتوزان اثرات ضد میکروبی مؤثری بر باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس دارند (۱۸).

Tanbakuchi و همکاران، هر دو ماده‌ی تیتانیوم دی‌اکساید و کیتوزان را در ساختار سمان و کامپوزیت‌ها بررسی کردند و خواص ضد میکروبی هر دو ماده را تأیید کردند. آن‌ها با اشاره به این موضوع که نانو ذرات کیتوزان بر

میانگین تعداد باکتری سمان رزینی (شاهد) در روزهای اول، ۸ و ۲۸ (0 ± 1000000) یکسان بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین زمان‌ها وجود نداشت ($p = 0/999$) (value) (نمودار ۱).

در بررسی میانگین تعداد باکتری در روز اول برحسب گروه‌های مورد مطالعه، اگرچه میانگین تعداد باکتری در گروه سمان رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم (875000 ± 150000) کمتر از گروه‌های سمان رزینی حاوی نانو ذرات کیتوزان (950000 ± 0) و شاهد (0 ± 100000) بود اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p\text{ value} = 0/27$).

در بررسی میانگین تعداد باکتری در روز ۸م برحسب گروه‌های مورد مطالعه، میانگین تعداد باکتری روز هشتم در هر سه گروه (0 ± 100000) یکسان بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود نداشت ($p\text{ value} = 0/999$).

در ضمن بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون Kruskal-Wallis به منظور بررسی میانگین تعداد باکتری در روز ۲۸ گروه‌های مورد مطالعه، میانگین تعداد باکتری روز ۲۸ در هر سه گروه (0 ± 100000) یکسان بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود نداشت ($p\text{ value} = 0/999$).

بحث

در این مطالعه، فرضیه‌ی صفر که اشاره به عدم تأثیر ضد باکتریایی نانو ذرات در زمان‌های مختلف داشت مردود شد. این مطالعه به بررسی خواص ضد میکروبی سمان‌های رزینی حاوی نانوذرات کیتوزان و نانوذرات تیتانیوم دی‌اکساید پرداخت. بر اساس نتایج به دست آمده، میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری در گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر از دو گروه سمان رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم ($p = 0/011$) و سمان رزینی حاوی نانو ذرات کیتوزان ($p\text{ value} = 0/043$) بود. این مسأله نشان‌دهنده‌ی اثرات ضد میکروبی نانوذرات کیتوزان و نانوذرات تیتانیوم دی‌اکساید بود. در گروه نانوذرات تیتانیوم قطر هاله‌ی عدم رشد بزرگ‌تر از نانوذرات کیتوزان بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار

روی فرم پلانکتونی باکتری‌ها به علت انسجام کمتر اثر بیشتری نسبت به بیوفیلم دارد، علت خواص ضد میکروبی کیتوزان را افزایش نفوذپذیری غشاء باکتری و در نتیجه نشت مواد داخل سلولی به بیرون سلول و غیر فعال سازی آنزیم‌های باکتری‌ها دانستند (۲۲). در مورد تیتانیوم دی اکساید تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تخریب غشای سلولی و دیواره‌ی سلولی باکتری به عنوان مکانیسم ضد میکروبی در این مطالعه مطرح شد. اما نتایج مطالعه‌ی داوری و همکاران که به بررسی خواص ضد میکروبی کامپوزیت رزین‌های حاوی سایر نانو ذرات بر روی باکتری / استرپتوکوکوس موتانس پرداخته بودند، حاکی از رشد باکتری در اطراف دیسک‌های کامپوزیتی حاوی نانو ذرات بود و اثر ضد باکتری حداقل را گزارش کردند (۲۵). اما در مورد دیسک پنی سیلین چون محلول در آب است، توانست با خاصیت انتشار در محیط پایه‌ی آبی منتشر شده و بر روی باکتری‌ها اثر گذاشته و هاله‌ی عدم رشد میکروبی را ایجاد نماید. آن‌ها اشاره کردند چون در این مطالعه دیسک دیفیوژن در محیط مولر هینتون آگار انجام شده که یک محیط جامد می‌باشد انتشار نانو ذرات و در نتیجه خواص ضد میکروبی حداقل بوده است. در محیط های جامد، تمامی اتفاقات بر اساس قوانین انتشار می‌باشد. یکی از این قوانین، بیان می‌کند که تنها موادی قابلیت انتشار در محیط پایه آبی را دارند که محلول در آب باشند. در نتیجه زمانی که می‌خواهیم اثر ضد میکروبی یک ماده‌ی جامد (نامحلول در آب) مانند سمان‌های رزینی و نانو ذرات را بررسی کنیم، این روش مطلوب و کار آ نمی‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر در بررسی میانگین تعداد باکتری با وجود کاهش تعداد

باکتری در روز اول، این کاهش در روزهای ۸ و ۲۸ نشان داده نشد. احتمال می‌رود این عدم تداوم خاصیت ضد میکروبی به علت عدم قابلیت انحلال و انتشار نانو ذرات محصور شده در یک ساختار منسجم و مستحکم رزینی باشد که برخلاف تست‌های تماسی مستقیم، این نانو ذرات محصور شده اثر کمتری در تست‌های طولانی مدت که بر مبنای انتشار مواد ضد میکروبی از داخل رزین می‌باشد را نشان می‌دهند.

با توجه به محدودیت آزمایش‌های انجام شده در قابلیت انتشار مواد، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در خصوص خواص ضد میکروبی و اثرات طولانی مدت با آزمایش‌های جایگزین انجام شود و همچنین با توجه به محدودیت‌های بالینی توصیه می‌شود بر روی اثربخشی و زیست سازگاری نانو ذرات مطالعات بالینی بیشتری انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده در روز اول، بر حسب گروه‌های مورد مطالعه، اگرچه میانگین تعداد باکتری در گروه سمان رزینی حاوی نانو ذرات تیتانیوم کمتر از گروه‌های سمان رزینی حاوی نانو ذرات کیتوزان و کنترل بود اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود. در ضمن میانگین تعداد باکتری در روز ۸ و ۲۸ بین گروه‌ها یکسان بود.

سپاسگزاری

این مقاله منتج از پایان‌نامه به شماره‌ی ۲۴۰ ت و طرح به شماره ۱۵۶۰۷ می‌باشد. با تشکر از دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد بابت همکاری در اجرای این پژوهش.

References

1. Zhang Y, Dudley J. The influence of different cement spaces on the marginal gap of CAD/CAM all-ceramic crowns. Aust Dent J 2019; 64(2): 167-74.
2. Blatz M, Vonderheide M, Conejo J. The effect of resin bonding on long-term success of high-strength ceramics. J Dent Res 2018; 97(2): 132-9.
3. Hayashi M. Adhesive dentistry: understanding the science and achieving clinical success. Dent Clin North Am 2020; 64(4): 633-43.
4. Mohammadi F, Barekatin M. Antibacterial effect of glass ionomer cement and resin cement on cariogenic bacteria of Streptococcus mutans, Lactobacillus acidophilus and Streptococcus sobrinus [in Persian]. Res Dent Sci 2022; 19(2): 106-11.

5. Ashy LM, Marghalani H. Internal and marginal adaptation of adhesive resin cements used for luting inlay restorations: An in vitro micro-CT study. *Materials (Basel)* 2022; 15(17): 6161.
6. Pinna R, Usai P, Filigheddu E, Garcia-Godoy F, Milia E. The role of adhesive materials and oral biofilm in the failure of adhesive resin restorations. *Am J Dent* 2017; 30(5): 285-92.
7. Lin Y, Chen J, Zhou X, Li Y. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. *Crit Rev Microbiol* 2021; 47(5): 667-77.
8. Jang HJ, Kim JH, Lee N-K, Paik H-D. Inhibitory effects of *Lactobacillus brevis* KU15153 against *Streptococcus mutans* KCTC 5316 causing dental caries. *Microb Pathog* 2021; 157: 104938.
9. Park J-Y, Lee J-J, Bae S-Y, Kim J-H, Kim W-C. In vitro assessment of the marginal and internal fits of interim implant restorations fabricated with different methods. *J Prosthet Dent* 2016; 116(4): 536-42.
10. Savencu CE, Porojan S, Porojan L. Analysis of internal and marginal fit of metal-ceramic crowns during processing, using conventional and digitized technologies. *Rev Chim(Bucharest)* 2018; 69(7): 1699-701.
11. Davari A, Mosaddegh A, Daneshkazemi A, Mortazavi Sanigei SM. Comparison of antibacterial effect of composite resins incorporating copper with zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* [in Persian]. *J Mashhad Dent Sch* 2019; 43(4): 344-51.
12. Mirhashemi AH, Bahador A, Kassaei MZ, Daryakenari G, Ahmad-Akhoundi MS, Sodagar A. Antimicrobial effect of nano-zinc oxide and nano-chitosan particles in dental composite used in orthodontics. *J Med Bacteriol* 2013; 2(3-4): 1-10.
13. Fauzi NA, Ireland A, Sherriff M, Bandara H, Su B. Nitrogen doped titanium dioxide as an aesthetic antimicrobial filler in dental polymers. *Dent Mater* 2022; 38(1): 147-57.
14. Florez FLE, Hiers RD, Larson P, Johnson M, O'Rear E, Rondinone AJ, et al. Antibacterial dental adhesive resins containing nitrogen-doped titanium dioxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018; 93: 931-43.
15. Pinto RJ, Fernandes SC, Freire CS, Sadocco P, Causio J, Neto CP, et al. Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles. *Carbohydr Res* 2012; 348: 77-83.
16. Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DCC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén AdJP, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine* 2008; 4(3): 237-40.
17. Salas-López EK, Pierdant-Pérez M, Hernández-Sierra JF, Ruíz F, Mandeville P, Pozos-Guillén AJ. Effect of silver nanoparticle-added pit and fissure sealant in the prevention of dental caries in children. *J Clin Pediatr Dent* 2017; 41(1): 48-52.
18. Sodagar A, Bahador A, Pourhajibagher M, Ahmadi B, Baghaeian P. Effect of addition of curcumin nanoparticles on antimicrobial property and shear bond strength of orthodontic composite to bovine enamel. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*. 2016;13(5):373.
19. Verma SK, Prabhat K, Goyal L, Rani M, Jain A. A critical review of the implication of nanotechnology in modern dental practice. *Natl J Maxillofac Surg* 2010; 1(1): 41-4.
20. Friedman M, Juneja VK. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *J Food Prot* 2010; 73(9): 1737-61.
21. Fernandes JC, Tavaría FK, Soares JC, Ramos OS, Monteiro MJ, Pintado ME, et al. Antimicrobial effects of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol* 2008; 25(7): 922-8.
22. Cai Y, Strømme M, Welch K. Photocatalytic antibacterial effects are maintained on resin-based TiO₂ nanocomposites after cessation of UV irradiation. *PLoS One* 2013; 8(10): e75929.
23. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 2002; 74(1-2): 65-72.
24. Tanbakuchi B, Bahador A. Nanoparticles in orthodontics: A review article. *J Dent Med* 2018; 31(2): 119-33.