

ارتقاء عملکرد کارکامین در جلوگیری از پوسیدگی دندان با استفاده از بارگذاری در نانوذرات

مرضیه عزیزی^۱، فاطمه یزدیان^{۲*}، امیر مقصودی^{۳*}، لیلا قادری^۴، فاطمه حقیرالسادات^{۴و۲}

مقاله پژوهشی

مقدمه: هدف از این تحقیق ارتقا خواص کارکامین جهت به کارگیری در بهداشت دندان می باشد. بدین منظور نانوسامانه های نشاسته حاوی کارکامین جهت ارتقاء خصوصیات اتصال و برهمکنش با مینای دندان از یک سو و اثربخشی بهینه ضد استرپتوکوکوس موتانس از سوی دیگر ساخته شد.

روش بررسی: نوع مطالعه پژوهش آزمایشگاهی است. روش سنتز نانوذرات با روش ترسیب و ژل سازی یونی بود. مشخصه یابی نمونه ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی، پخش نور پویا و هم چنین پتانسیل زتا بود. سپس آزمایش های MIC به منظور بررسی عملکرد نانوذرات حاوی کارکامین بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس مورد مطالعه قرار گرفت. میزان جذب نانوذرات حاوی دارو بر روی هیدروکسی آپاتیت بررسی گردید و در انتها رهایش دارو از نانوسامانه نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: قطر متوسط ذرات ۶۱/۱ نانومتر و پتانسیل زتای این نانوذرات ۱۴/۷- میلی ولت بود. میزان بارگذاری در نانوذرات نیز برابر با ۲۴/۵۹ درصد بود که از طریق قرائت جذب نوری و از روی منحنی استاندارد کارکامین محاسبه شد. حداقل غلظت مهار کننده (MIC) علیه استرپتوکوکوس موتانس برای نانوذرات نشاسته و کارکامین خالص به ترتیب برابر با ۰/۲۰۴ و ۰/۴۳۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود. هم چنین مشخص شد که نانوذرات نشاسته دارای اثر بازدارندگی از تولید بیوفیلم باکتری نیز می باشند.

نتیجه گیری: نانوسامانه های نشاسته حاوی کارکامین باعث ارتقاء خصوصیات اتصال و برهمکنش با مینای دندان شده و از پوسیدگی دندان ناشی از استرپتوکوکوس موتانس جلوگیری می کنند.

واژه های کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، کارکامین، پوسیدگی دندان

ارجاع: عزیزی مرضیه، یزدیان فاطمه، مقصودی امیر، قادری لیلا، حقیرالسادات فاطمه. ارتقاء عملکرد کارکامین در جلوگیری از پوسیدگی دندان با استفاده از بارگذاری در نانوذرات. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۳): ۴۵-۱۳۲۷

۱-دکتری تخصصی بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، ایران

۲-دکتری تخصصی مهندسی شیمی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، ایران

۳-دکتری تخصصی مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی صنعتی، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، ایران

۴-دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۸۲۶۷۶۸۶، پست الکترونیکی: maghsoudi.a@ut.ac.ir, Yazdian@ut.ac.ir، کد پستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱

مقدمه

بهداشت دهان و دندان در کشورهای در حال توسعه و بالاخص کشور ما ایران وضعیت به سامانی ندارد. پژوهش‌های متعددی در زمینه به‌کارگیری نانو فناوری و به‌خصوص نانوذرات در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس و پلاک روی دندان‌ها و کنترل فعالیت باکتریایی در حفره دهانی صورت گرفته است (۱،۲،۳). عمده این مطالعات بر روی نانوذرات فلزی مانند نقره، MgF₂، روی، مس، بیسموت و غیره بوده است و تعداد کمتری از آن‌ها از پلیمرهای طبیعی مانند کیتوزان و پلیمرهای سنتزی مانند پلی‌اتیلن ایمین استفاده کرده‌اند. با این وجود پژوهشی که به خصوصیات مورد نیاز نانو سامانه‌ها جهت اتصال بهینه و ایجاد برهمکنش با مینای دندان بپردازد و هم‌زمان خصوصیات مورد نیاز آن جهت اثربخشی ضد استرپتوکوکوس موتانس را نیز بررسی نماید، انجام نشده است.

کارکامین فعال‌ترین ماده گیاهی در ادویه هندی، زردچوبه، است که به‌عنوان جزئی در رژیم غذایی به‌کار می‌رود. این ماده ویژگی‌های زیستی مختلفی از جمله فعالیت ضد رشد در برابر سلول‌های سرطانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. به علاوه فعالیت ضد باکتریایی چشم‌گیری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند باسیلوس سوبتیلیس، اش‌ریشیا کلائی، هلیکوباکتر پیلوری، سالمونلا انتریکا و برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از آن گزارش شده است. هم‌چنین، اثر بازدارندگی قوی کارکامین در برابر باکتری‌ها در مجراهای بالای تنفسی و جلوگیری از رشد، اتصال، حمله و ایجاد التهاب اثبات شده است. در پژوهش‌های دو سال اخیر نشان داده شده است که کارکامین از تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس جلوگیری می‌کند و بنابراین امیدهای تازه‌ای در استفاده از آن برای کنترل بار میکروبی حفره دهانی ایجاد شده است (۴،۱). نشاسته نیز پلی‌ساکاریدی به‌خوبی شناخته شده، تطبیق‌پذیر و ارزان است که در کاربردهای رسانش دارو به علت این‌که آبدوست، زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار است؛ توجه زیادی را به خود جلب کرده است. با توجه به این‌که نشاسته

یک پلی‌ساکارید کم محلول در آب است و تولید سوسپانسیون می‌کند؛ جهت غلبه بر این مشکل می‌توان از افزایش حلالیت (در این‌جا تا ۹۰°C به مدت یک ساعت) و سورفاکتانت‌ها (در این‌جا از سورفاکتانت غیر یونی گروه پلی سوربات توئین ۲۰ استفاده گردید) استفاده نمود. نانوذرات نشاسته با اندازه ذرات در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ nm به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان نانوحامل‌های رهایش کنترل شده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال، نانوذرات نشاسته پروپیل که با انواع مختلفی از داروها بارگذاری شده‌اند (فلوفنامیک‌اسید، آزمونوسترون و کافئین)، تأثیر افزایش یافته‌ای را در مطالعات نفوذپذیری پوست انسان نشان داده‌اند. نانوذرات نشاسته دی‌آلدئید (DASNPs) که با ۵- فلئوئورواوراسیل (Fu-۵) کانژوگه شده‌اند، مشخص شده که افزایش مهار سلول سرطان سینه (MF-7) را در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با Fu-۵ آزاد دارا می‌باشند (۵،۶). در این پروژه نیز باتوجه به اینکه نشاسته منبع غذایی بسیار خوب برای بیوفیلم دندان و پوسیدگی آن است؛ باکتری‌های تشکیل دهنده پلاک به‌مصرف آن تمایل دارند. لذا با مصرف نانوذرات آنتی‌باکتریال نانو سامانه‌های نشاسته حاوی کارکامین، از بین خواهند رفت؛ و از این بهداشت دهان و دندان ارتقا می‌یابد.

در این پروژه به بررسی کاهش فعالیت یا از بین رفتن سویه‌های باکتریایی مؤثر در ایجاد پوسیدگی دندان از طریق به‌کارگیری و ساخت نانوذرات نشاسته‌ای حاوی کارکامین با توانایی برهم‌کنش و اتصال غیر کووالانسی با مینای دندان مدل پرداخته شده است. از نتایج این پژوهش می‌توان در فرمولاسیون خمیرهای دندان و دهان‌شویه‌های جدید که اثربخشی قوی‌تر و طولانی مدت‌تری در برابر فعالیت باکتریایی در دهان دارا باشند استفاده کرد. کارکامین رنگ بسیار قوی زرد دارد که با قرار گرفتن در نانو سامانه‌های نشاسته، رنگ آن کاسته می‌شود (شکل ۳) و سوسپانسیون آن بسیار روشن می‌باشد؛ لذا برای زیبایی دندان مشکلی ایجاد نخواهد کرد. سامانه نانوذره‌ای حاصل از این پژوهش قابلیت افزوده شدن به برخی از خوراکی‌ها یا آشامیدنی‌ها را نیز دارا خواهد بود (۸،۷). از موارد نوآوری این

ترسیب ذرات درشت تر و حذف آن‌ها سانتریفیوژ شد. سپس رسوب را دور ریخته و محلول روئی نگه داشته شد. در این مرحله، محلول روئی در میکروتیوب‌های ۲ mL ریخته شد و در ۱۵۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. این بار محلول روئی دور ریخته شد و رسوب به دست آمده با ۱ mL اتانول مطلق به منظور حذف کارکامین آزاد شستشو داده شد و سپس اتانول سریعاً از آن خارج گردید و رسوب باقی مانده که حاوی نانوذرات بارگذاری شده است برای ادامه آزمایش به منظور اندازه‌گیری وزن خشک یا اندازه‌گیری میزان بارگذاری نانوذرات نگه داشته شد و به روش انجمادی خشک گردید. با توجه به این‌که اتانول استفاده شده به‌عنوان حلال کورکومین کشنده باکتری است؛ در مرحله انجماد دقت می‌شود که هیچ‌گونه حلالی در محتوی نانوذرات باقی نماند و نمونه کاملاً خشک شود. بنابراین نمونه‌های به‌کار رفته در آزمایشات MIC فاقد هرگونه حلال اتانولی بودند.

اندازه و بار سطحی نانوذرات با استفاده از روش تفرق پویای نور (DLS) Dynamic Light Scattering و پتانسیل زتا Zeta potential

نانوذره نشاسته بارگذاری شده با کارکامین به صورت سوسپانسیون با غلظت ۰/۱-۰/۵ mg/mL و حجم ۵ mL برای آنالیز DLS و زتاپتانسیل آماده گردید. این نمونه حدود ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و پس از آن توسط دستگاه نانو سایزر Brookhaven Instruments Corp در مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران مورد آنالیز قرار گرفت. اندازه‌گیری نانو ذرات نشاسته بارگذاری شده در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ nm در دمای ۲۵ سانتی‌گراد صورت گرفت. هم‌چنین اندازه‌گیری نمونه‌ها در ۵ مرتبه و هر مرتبه با مدت زمان ۳۰ ثانیه انجام گردید. هم‌چنین پتانسیل زتا نانوذرات نشاسته حامل دارو با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای ۲۵ سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید. برای تعیین بار سطحی از ۱۵۰۰ میکرولیتر نمونه با غلظت ۰/۱ mg/mL استفاده گردید.

طرح می‌توان به بررسی نانوسامانه‌های پلی‌ساکاریدی در کاهش فعالیت باکتریایی مؤثر در پوسیدگی دندان اشاره کرد.

روش بررسی

نوع مطالعه در این مقاله، پژوهش آزمایشگاهی می‌باشد.

ریزسازواره

در این پژوهش، از ریزسازواره *Streptococcus mutans* PTCC 1683 استفاده شده است. ریزسازواره یاد شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) به صورت لیوفیلیزه خریداری شد.

سنتز نانوذرات پلی‌ساکاریدی به روش ترسیب و ژل‌سازی یونی

در ابتدا غلظت‌های نشاسته (Merck) محلول در آب دیونیزه (آزمایشگاه نانو فناوری-دانشکده علوم و فنون) (۴۰ mg/mL) و هم‌چنین غلظت‌های مختلف کارکامین (Merck) (۱۰ mg/mL) و (۵-۱ mg/mL) و حجم‌هایی از اتانول مطلق (Merck) (۱-۳) به‌عنوان متغیر در نظر گرفته شد و با انجام آزمایش‌های متعددی هر کدام بهینه گردیدند. با توجه به اینکه نشاسته یک پلی‌ساکاید کم محلول در آب است و تولید سوسپانسیون می‌کند؛ جهت غلبه بر این مشکل می‌توان از افزایش حلالیت (در این جا تا ۹۰°C به مدت یک ساعت) و سورفاکتانت‌ها (در این جا از سورفاکتانت غیر یونی گروه پلی‌سوربات توتین ۲۰ استفاده گردید) استفاده نمود. لذا برای سنتز نانوذره نشاسته مشخص گردید که ابتدا نشاسته محلول (۱۰۰ mg) و توتین ۲۰ (Merck) (۱۰ μL) در ۱۰ mL آب دیونیزه حل گردد. سپس، مخلوط در ظرفی در بسته تا ۹۰°C به مدت یک ساعت به منظور حل شدن و ژله‌ای شدن کامل نشاسته روی همزن مغناطیسی (۵۰۰ rpm) حرارت داده شد. سپس حرارت همزن مغناطیسی خاموش گردید و همراه با سرد شدن محلول در دمای اتاق، ۱/۳۱ mL محلول اتانولی حاوی کارکامین (۱ mg/mL) و توتین ۲۰ (۱۰ μL) به صورت قطره قطره به محلول نشاسته همراه با همزدن مداوم برای یک ساعت دیگر اضافه شد و دما روی ۷۰°C تنظیم شد. پس از گذشت این زمان، سوسپانسیون نانوذرات در فالكون‌های ۱۵ mL ریخته شد و در ۱۰۰۰۰ g و در دمای آزمایشگاه به مدت ۲ دقیقه به منظور

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

میکروسکوپ الکترونی روبشی که به آن Scanning Electron Microscope، یا به اختصار SEM می‌گویند یکی از ابزارهای مورد استفاده در فناوری نانو است که با کمک بمباران الکترونی تصاویر اجسامی به کوچکی ۱۰ نانومتر را برای مطالعه تهیه می‌کند. بمباران نمونه سبب می‌شود تا الکترون‌هایی از نمونه به سمت صفحه دارای بار مثبت رها شود که این الکترون‌ها در آنجا تبدیل به سیگنال می‌شوند. برای آماده‌سازی نمونه به‌منظور تهیه تصویر SEM، قبل از هر کار، باید آب از نمونه جدا شود چرا که آب در خلاء تبخیر می‌شود. تمامی فلزات رسانا هستند؛ لذا نیازی به آماده‌سازی آن‌ها برای تهیه تصویر با SEM نیست. موادی که جزء دسته فلزات نیستند مثل پلی‌ساکاریدها، باید به وسیله یک لایه نازک رسانا پوشانده شوند. این کار به کمک ابزاری به نام پوشش دهنده انجام می‌شود و به این منظور از میدان الکتریکی و گاز آرگون استفاده می‌شود؛ به طوری که نمونه در یک محفظه خلاء، قرار داده می‌شود و گاز آرگون و میدان مغناطیسی سبب جدا شدن الکترون از آرگون و مثبت شدن بار الکتریکی اتم‌ها می‌شوند. یون‌های آرگون توسط فویل طلای دارای بار منفی جذب می‌شوند. یون‌های آرگون، به اتم‌های طلای سطح فویل طلا برخورد می‌کنند. این اتم‌های طلا روی سطح نمونه قرار می‌گیرند و سبب ایجاد یک پوشش رسانا از طلا بر سطح نمونه می‌شوند. آنالیز نمونه توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی دانشکده فنی-دانشگاه تهران انجام شد.

اندازه‌گیری وزن خشک نانوذره

برای اندازه‌گیری وزن خشک نانوذرات، به هرکدام از میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی رسوب از مرحله قبل (مرحله سنتز نانوذرات، پس از سانتریفیوژ دوم)، مقدار ۱ mL آب مقطر (آزمایشگاه نانوفناوری-دانشکده علوم و فنون) افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در حمام اولتراسونیک (W340) (Reyhan Teb) قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، رسوبات به همراه آب داخل هر یک از میکروتیوب‌ها بر روی یک فویل آلومینیومی سترون و به شکل قالب در آمده با

وزن مشخص ریخته شد و در آن (Behdad) 90°C به مدت ۵ ساعت نگه داشته شد. پس از گذشت این زمان فویل آلومینیومی را که به شکل قالب بوده و حاوی رسوب خشک شده نانوذرات است، بار دیگر وزن کرده و برای اندازه‌گیری وزن خشک نانوذرات، وزن ثانویه فویل را از وزن اولیه آن کم می‌کنیم. ترازوی استفاده شده حساس دیجیتالی از شرکت KERN بود.

اندازه‌گیری میزان بارگذاری

برای اندازه‌گیری میزان بارگذاری، به هرکدام از میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی رسوب از مرحله قبل (مرحله سنتز نانوذرات، پس از سانتریفیوژ دوم)، ۱/۵ mL اتانول افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. سپس میکروتیوب‌ها در 15000 g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (HERMLE-LABNET) شدند و محلول‌های روئی از تمامی میکروتیوب‌ها در یک بالن ژوژه ریخته شد و با اتانول به حجم ۱۰ mL رسید. از این محلول برای اندازه‌گیری غلظت کارکامین با استفاده از روش طیف سنجی و بر اساس رسم منحنی استاندارد کارکامین استفاده شد. جرم کارکامین بارگذاری شده از حاصل ضرب غلظت کارکامین (mg/mL) در حجم ۱۰ mL اتانول تعیین گردید. هم‌چنین بازده بارگذاری نیز از تقسیم جرم کارکامین به دام افتاده بر جرم کارکامین استفاده شده برای تولید نانوذره، به دست آمد.

تعیین بیشینه بازده بارگذاری نانوذرات بر اساس وزن خشک

برای تعیین مقدار حجم مناسب محلول اتانولی حاوی کارکامین برای اضافه کردن به محلول پلی‌ساکاریدی نشاسته، مقادیر حداقل و حداکثر حجم اتانول مورد استفاده با رجوع به مقالات مختلف مشخص گردید و برای به دست آوردن بیشینه بازدهی با توجه به وزن خشک نانوذرات طبق روش‌های سنتز نانوذره نشاسته و هم‌چنین اندازه‌گیری وزن خشک نانوذره عمل شد؛ به این صورت که در این آزمایش حجم‌های مختلف ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌لیتری از محلول اتانولی حاوی کارکامین انتخاب گردید تا هر یک به مدت یک ساعت در دمای 70°C به محلول نشاسته اضافه گردند. بقیه مراحل مشابه روش‌های اشاره شده

آن افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. سپس میکروتیوب در ۱۵۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول روئی به میکروتیوب دیگری منتقل شد و با اتانول به حجم نهایی ۲ mL رسید و با استفاده از روش طیف‌سنجی نوری (اسپکتروفوتومتر، PG Instrument) و منحنی کالیبراسیون کارکامین، میزان غلظت کارکامین در نانوسامانه تعیین گردید. برای تعیین مقدار دارو در نانوسامانه، غلظت دارو در حجم استخراج (۲ mL) ضرب شد تا وزن کل داروی استخراج شده به دست آید. همچنین به منظور تعیین ظرفیت بارگذاری، وزن دارو بر وزن نانوسامانه (۱۰ mg) تقسیم گردید و با ضرب کردن در عدد ۱۰۰ به صورت درصدی بیان گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده با کارکامین بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس، کشت یک شبانه روزی (۱۸ ساعته) باکتری در محیط کشت (Merck, BHI Brain heart broth) در دمای ۳۷°C و دور ۱۵۰ rpm تهیه شد. پس از گذشت این زمان در زیر هود زیستی جذب نوری (OD_{۶۰۰}) ماده تلقیح توسط BHI تازه روی ۰/۲ تنظیم گردید. سپس به هر ویال ۱ mL از ماده تلقیح و ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۰ میکرولیتر از محلول نانوذره (۱ mg/mL) اضافه شد. ویال‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد (انکوباتور، Binder). جذب نوری در ۶۰۰ nm ثبت گردید. MIC نانوذرات برابر است با کمترین غلظت نانوذرات که منجر به OD_{۶۰۰} کمتر یا مساوی ۰/۰۵ شود (۹). شکل ۱ مراحل انجام و آماده‌سازی آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکننده نانوذرات را نشان می‌دهد. در این شکل به خوبی دیده می‌شود که نانوذرات نشاسته‌ای حاوی کوکورمین توزیع یکنواختی در محیط کشت داشته و بنابراین می‌توان انتظار داشت که به همه نقاط غلظت یکنواختی برسد.

در فوق بود. وزن اولیه قالب فویل آلومینیومی سترون قبل از ریختن رسوب اندازه‌گیری شد. سپس هنگامی که رسوب به همراه آب داخل هر یک از میکروتیوب‌ها به داخل قالب ریخته شد و به مدت ۵ ساعت در ۹۰°C نگهداری شد، وزن نهایی قالب حاوی رسوب بار دیگر اندازه‌گیری گردید. فرمول محاسبه بازده به شرح زیر است:

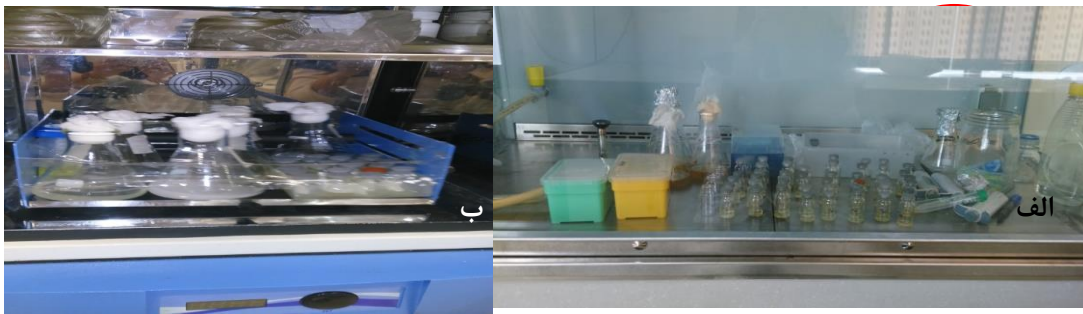
$$\text{بازده} = \frac{\text{وزن خشک نانوذرات (وزن نهایی قالب - وزن اولیه قالب)}}{\text{وزن کارکامین + وزن نشاسته}} \times 100$$

تهیه پودر نانوذرات بارگذاری شده با کارکامین

به منظور تهیه پودر نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین، مراحل سنتز مطابق روش ذکر شده تهیه گردید، با این تفاوت که بعد از سانتریفیوژ دوم نانوذرات که در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام می‌گیرد؛ محلول روئی به دست آمده، در میکروتیوب‌های ۲ mL حذف گردید و به رسوب‌های باقی‌مانده ۱ mL آب مقطر اضافه گردید و در حمام اولتراسونیک (W340: Reyhan Teb) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن هر یک از میکروتیوب‌ها به تانک حاوی نیتروژن مایع انتقال داده شدند تا پس از انجماد سریع بلافاصله به دستگاه فریز درایر منتقل گردند. نمونه‌ها به مدت حداقل ۲۴ ساعت در فریزدرایر (Operon) نگهداری شدند و به این صورت پودر حاصله از نانوذرات بارگذاری شده تهیه گردید. از این پودر برای تعیین مقدار دارو در نانوسامانه و همچنین آزمایش رهایش استفاده گردید.

تعیین مقدار دارو در نانوسامانه‌ها و تعیین ظرفیت بارگذاری

برای تعیین مقدار دارو بارگذاری شده در نانوسامانه‌ها، نانوذرات نشاسته حاوی کارکامین در شرایط بهینه خود تولید گردید و بعد از خشک کردن انجمادی و تهیه پودر، مقدار mg ۱۰ از نانوذره حاوی دارو (کارکامین) در یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس مقدار ۱/۵ mL اتانول مطلق به



شکل ۱: مراحل انجام و آماده‌سازی آزمایش تعیین حداقل غلظت مهار کننده نانوذرات پلی‌ساکاریدی بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس.

الف) ویالهای حاوی ۱ mL از مادهٔ تلقیح و ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲، ۱۰۲۴ میکرولیتر از محلول نانوذره (۱ mg/mL)

ب) انکوباسیون ویالها به مدت ۲۴ ساعت در 37°C

ذرات به‌طور میانگین بین ۵۰-۸۸ نانومتر تهیه می‌شود که در غلظت ۱ mg/mL به کار رفته، محلولی کاملاً شفاف است. در واقع هم بلانک و هم کنترل حاوی ۱ mL بافر به‌جای نانوذره بودند. در مرحلهٔ بعد محلول نانوذره حذف گردید و ویال و مینای دندان ۳ بار با پیپت کردن ۱/۵ mL سرم فیزیولوژی سترون شستشو داده شد. به‌منظور تثبیت بیوفیلم، ۱ mL اتانول به هر ویال اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه اتانول حذف شد و ویالها در معرض هوا گذاشته شدند تا خشک گردند. پس از خشک شدن مینای دندان، ۱ mL کریستال ویوله ۱٪ به هر ویال اضافه شد. پس از ۵ دقیقه کریستال ویوله طی شستشو با الکل حذف گردید و ویال و مینای دندان ۵ بار با پیپت کردن ۱/۵ mL سرم فیزیولوژی سترون شستشو داده شد. سپس ویالها رها شده تا خشک گردند. در مرحلهٔ آخر ۱ mL اسیداستیک ۳۳٪ v/v به هر ویال اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه جذب نوری در ۵۵۰ nm قرائت گردید (۹،۱۰). باکتری‌های چسبیده به بیوفیلم در طول مرگ سلولی از بیوفیلم جدا می‌شوند. از این ویژگی باکتریایی می‌توان برای اندازه‌گیری غیر مستقیم میزان مرگ سلولی و تعیین اثر بازدارندگی عوامل مختلف بر روی تولید بیوفیلم حاصل از باکتری استفاده نمود. یکی از روش‌های ساده برای شناسایی باکتری‌های چسبیده و موجود در بیوفیلم، رنگ‌آمیزی باکتری‌های متصل با رنگ بنفش کریستالی است که به پروتئین‌ها و DNA متصل می‌شود. سلول‌هایی که دچار مرگ سلولی شده باشند، چسبندگی خود را از دست می‌دهند و در نتیجه از جمعیت سلول‌ها کاسته

تعیین اثر بازدارندگی نانوذرات بر روی تولید بیوفیلم

باکتری استرپتوکوکوس موتانس

برای تعیین اثر بازدارندگی نانوذرات بر روی تولید بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس در pHهای مختلف (۵ و ۷ pH) روی دندان، ابتدا دندان‌های سالم و بدون پوسیدگی از درمانگاه‌های عمومی تهیه شد. دندان‌ها با برس کشیدن در محلول ساون و الکل ضدعفونی و تمیز شدند. با استفاده از مته لوله‌ای با قطر داخلی ۳ میلی‌متر، قطعات استوانه‌ای شکلی از دندان تراشیده شد و در ادامه پژوهش به کار رفت. هم‌چنین کشت یک شبانه‌روزی (۱۸ ساعته) باکتری استرپتوکوکوس موتانس در محیط BHI غنی شده با ۱W/V % سوکروز در دمای 37°C و دور ۱۵۰ rpm تهیه شد. پس از گذشت این زمان در زیر هود زیستی جذب نوری (OD_{600}) مادهٔ تلقیح توسط BHI تازه روی ۰/۱ تنظیم شد. سپس ۱ mL از مادهٔ تلقیح و یک قطعه از مینای دندان به هر ویال منتقل شد و در 37°C و دور ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید (بلانک حاوی BHI به جای مادهٔ تلقیح است). پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت استفاده شده حذف گردید و ویال و قطعهٔ مینای دندان ۳ بار با پیپت کردن ۱/۵ mL از سرم فیزیولوژی سترون شسته شد. سپس ۱ mL از محلول نانوذره (۱ mg/mL) در حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در محلول بافر فسفات (pHهای ۵ و ۷) به ویال‌های مربوطه منتقل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در 37°C انکوبه شد. در این مرحله سوسپانسیونی از نانوسامانه‌های نشاسته حاوی کارکامین با قطر

کنترل اضافه شد. سپس حجم‌های ۰/۲ mL از محلول نانوذره (۰/۵ mg/mL) به همه میکروتیوب‌ها به غیر از میکروتیوب‌های شاهد اضافه گردید. به میکروتیوب‌های شاهد ۰/۲ mL آب مقطر اضافه شد. در مرحله بعد همه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی ۳۷°C قرار داده شدند. پس از آن همه میکروتیوب‌ها به مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردیدند و محلول‌های روئی به دست آمده از آن‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری جدیدی منتقل شد و در ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول‌های روئی به دست آمده خارج شد و میزان کارکامین نانوذرات در رسوب‌های به دست آمده با محلول اتانول مطلق و حمام اولتراسونیک استخراج گردید و مقدار کارکامین با روش طیف‌سنجی اندازه‌گیری شد (۱۱).



شکل ۲: انحلال نانوذرات در pHهای ۵ (الف) و ۷ (ب)؛ به ازای هر pH، یک محلول شاهد (بدون باکتری)، یک محلول کنترل (بدون نانوذره)، یک محلول نانوذره (در حداقل غلظت بازدارندگی، با سه تکرار) و محلولی از کارکامین خالص (حاوی میانگین مقدار کارکامین در نانوذرات) در نظر گرفته شد.

همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، ژل نانوذره را در بافر فسفات حل شده است و کاملاً یکنواخت می‌باشد. در این بین جهت اطمینان از پایداری از عدم هیدرولیز نشاسته طی استرس اسیدیته، سایز ذرات بعد از تغییر pH به ۵ توسط DLS سنجیده شد. نتایج نشان می‌داد که سایز ذرات اختلاف چشم‌گیری با حالت pH ۷ ندارد. اندازه‌گیری میزان ره‌ایش دارو بررسی میزان ره‌ایش کارکامین در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. پودر هر یک از نانوذرات بارگذاری شده با کارکامین که به صورت لیوفیلیزه تهیه شده بود، در ۳۳ mL از محلول بافر

می‌شود و میزان رنگ بنفش کریستال ویوله آن‌ها کاهش می‌یابد. این پروتکل یک روش سریع و قابل اعتماد است که برای تعیین اثر بازدارندگی نانوذرات بر روی تولید بیوفیلیم باکتری استرپتوکوکوس موتانس مناسب است.

جذب نانوذرات روی هیدروکسی‌آپاتیت در pHهای ۵ و ۷ برای تعیین میزان جذب نانوذرات روی هیدروکسی‌آپاتیت در pHهای ۵ و ۷، مقدار ۲۵ mL از پودر هیدروکسی‌آپاتیت در ۲۰ mg/mL در محلول بافری (محلول بافر فسفات با pHهای ۵ و ۷) تهیه گردید (شکل ۲). سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط به منظور آبدهی رها گردید. پس از ۲۴ ساعت، حجم‌های ۱/۸ mL از محلول هیدروکسی‌آپاتیت در ۱۲ میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری توزیع شد. هم‌چنین ۱/۸ mL بافر (بافر فسفات به‌طور جداگانه با pHهای ۵ و ۷) در سه میکروتیوب به‌عنوان

بررسی میزان ره‌ایش کارکامین در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. پودر هر یک از نانوذرات بارگذاری شده با کارکامین که به صورت لیوفیلیزه تهیه شده بود، در ۳۳ mL از محلول بافر

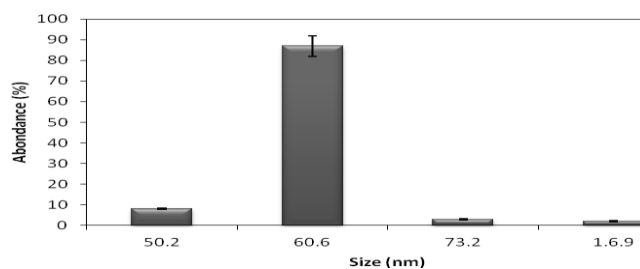
ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه شهید صدوقی یزد تایید شده است (کد اخلاق: IR.SSU.MEDICINE.REC.1395.10)

نتایج

اندازه و بار سطحی نانوذرات با استفاده از روش تفرق پویای نور **Dynamic Light Scattering (DLS)** و پتانسیل زتا **Zeta potential**

نانوذره نشاسته بارگذاری شده با کارکامین به صورت سوسپانسیون با غلظت ۰/۱-۰/۵ mg/mL و حجم ۵ mL برای آنالیز DLS و زتاپتانسیل آماده گردید. این نمونه حدود ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و پس از آن توسط دستگاه نانو سایزر Brookhaven Instruments Corp در مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران مورد آنالیز قرار گرفت. اندازه گیری نانوذرات نشاسته بارگذاری شده در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ nm در دمای ۲۵ سانتی‌گراد صورت گرفت. هم‌چنین اندازه‌گیری نمونه‌ها در ۵ مرتبه و هر مرتبه با مدت زمان ۳۰ ثانیه انجام گردید. هم‌چنین پتانسیل زتا نانوذرات نشاسته حامل دارو با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای ۲۵ سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید. برای تعیین بار سطحی از ۱۵۰۰ میکرولیتر نمونه با غلظت ۰/۱ mg/mL استفاده گردید. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود اندازه نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین که با حالت تعداد اندازه‌گیری شد، به‌طور میانگین بین ۵۰-۸۸ نانومتر بود. هم‌چنین پتانسیل زتا این نانوذرات، به‌طور میانگین با استفاده از دستگاه زتا سایزر ۱۴/۷- گزارش گردید.



شکل ۳: هیستوگرام اندازه نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین به‌دست آمده توسط دی ال اس - بیشترین فراوانی مربوط به ذرات با سایز ۶۰/۶ نانومتر می‌باشد.

۱۵۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب به‌دست آمده از نانوذرات بارگذاری شده به‌منظور استخراج کارکامین مقدار ۱۰۰ μL اتانول مطلق اضافه شد، سپس به‌مدت چند ثانیه هم‌زده شد و در نهایت به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک W340 قرار گرفت. پس از این مرحله میزان جذب کارکامین با استفاده از روش طیف سنجی نوری در ۴۲۲ nm (که بالاترین پیک جذبی کارکامین است) قرائت گردید. هم‌چنین غلظت کارکامین نیز با توجه به معادله رگرسیون به‌دست آمده از منحنی کالیبراسیون دارو تعیین گردید. مقدار رهایش دارو از رابطه زیر بدست می‌آید (۱۲).

$$\text{میزان کارکامین رها شده از نانوذرات} \times 100 = \frac{\text{مقدار کل کارکامین}}{\text{رهایش (\%)}}$$

منحنی استاندارد کالیبراسیون کارکامین

محلول استوک کارکامین (۱۰۰ μg/mL)، با حل کردن دقیق مقدار ۱۰ mg کارکامین در مقدار کافی از اتانول و سپس به حجم رساندن آن با اتانول تا ۱۰۰ mL تهیه شد. در ادامه نیز سری‌های رقیق‌سازی آماده گردید. برای تهیه سری‌های رقیق‌سازی، فلاسک‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری انتخاب شد و مقادیر مناسبی از محلول استاندارد برداشته شد و تا حجم ۱۰ mL با اتانول مطلق رقیق گردید. جذب نوری در ۴۲۲ nm اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

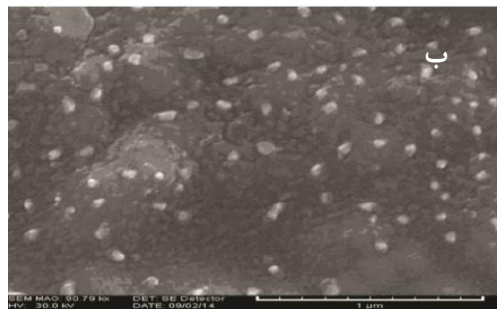
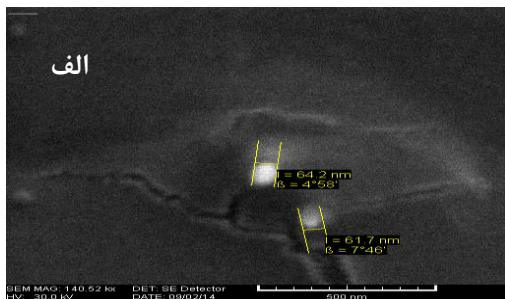
کلیه آزمایشات حداقل ۳ تا ۵ بار تکرار گردید و میانگین آنها ارائه شد. در نهایت بازه پاسخ به‌صورت خط بار بر اساس انحراف استاندارد از میانگین محاسبه گردید.

کارکامین ایجاد می‌کند که باعث افزایش انحلال کارکامین در آب می‌شود. افزایش قابلیت انحلال کارکامین در محیط آبی هم‌چنین می‌تواند به ابعاد نانویی و ناحیه سطح ویژه وسیع آن‌ها نسبت داده شود (۱۴).

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، اندازه نانوذرات سنتز شده در این پژوهش ۷۰-۵۰ nm می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده از DLS مطابقت دارد. هم‌چنین تصاویر SEM به‌طور مشخص نشان می‌دهد ذرات دارای ظاهری تقریباً کروی می‌باشند و توزیع یکنواختی دارند. آنالیز نمونه توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی دانشکده فنی-دانشگاه تهران انجام شد. از طرفی ساک فون چین و همکاران در سال ۲۰۱۴، نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین به روش رسوب‌گذاری نانویی سنتز کردند؛ نتایج تصاویر Transmission Electron Microscope TEM پژوهش آن‌ها، نانوذراتی با اندازه ۵۰-۸۰ nm را نشان داد (۶).

سوک فون چین و همکاران در سال ۲۰۱۴ سنتز نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین را با روش رسوب‌گذاری نانویی و میکرومولسیون آب در روغن Nanoprecipitation method and water-in-oil microemulsion system دادند که میانگین اندازه ذرات تولید شده آن‌ها ۸۷ nm بود (۶). در رابطه با پتانسیل زتا نیز گفته شده که نانوذرات با بار منفی نسبت به نانوذرات با بار مثبت سمیت سلولی کمتری ایجاد می‌کنند و مورد تأیید FDA هستند. البته هم نانوذرات با بار مثبت و هم با بار منفی مزایای خاص خود را دارند و باید چگالی بار سطحی نانوذرات به گونه‌ای بهینه شود که کمترین سمیت و مؤثرترین رسانش داخل سلولی را دارا باشند (۱۳). به دلیل ماهیت پلی‌فنولی بودن کارکامین، این مولکول می‌تواند با ماکرومولکول‌های زیستی نظیر پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها از طریق پیوندهای هیدروژنی به‌شدت برهمکنش نماید. لذا بارگذاری کارکامین در داخل نشاسته قابل حل در آب، به دلیل چنین برهمکنش‌های هیدروژنی گسترده بین نشاسته و کارکامین، تغییرات قابل توجهی را در ریزمحیط مولکول‌های

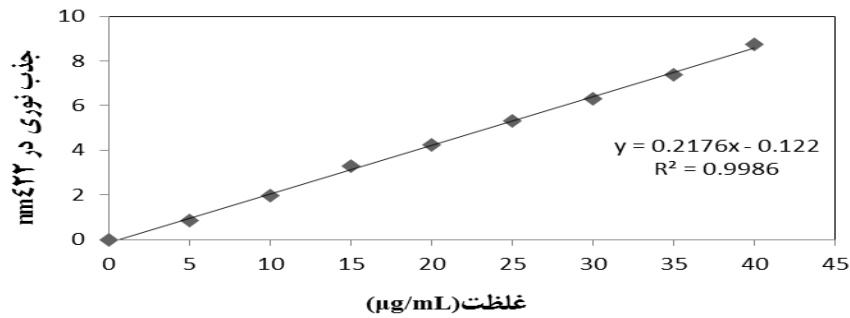


شکل ۴: تصاویر SEM نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین (الف) بزرگنمایی ۱۰۰ نانومتر (ب) بزرگنمایی ۱۰۰۰ نانومتر

رابطه خطی بین غلظت‌های مختلف تهیه شده از محلول استاندارد کارکامین (محور x) و جذب نوری (محور y) به‌صورت ترسیمی ارائه گردید. شیب (m)، عرض از مبدأ (b) و ضریب هم‌بستگی (R^2) از رابطه خطی ($Y=mx+b$) به‌وسیله رگرسیون محاسبه شد. شکل ۵ منحنی کالیبراسیون کارکامین را که با استفاده از طیف‌سنجی نوری اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد.

تعیین منحنی کالیبراسیون کارکامین

برای تعیین منحنی کالیبراسیون کارکامین مجموعه‌ای از فلاسک‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری انتخاب شد و مقادیر مناسبی از محلول استاندارد کارکامین تهیه شد و با اتانول مطلق به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. جذب نوری در بیشینه جذب کارکامین یعنی در ۴۲۲ nm و بر ضد محلول شاهد اتانول که فاقد کارکامین بود؛ اندازه‌گیری شد. به‌جز غلظت اول (غلظت صفر) بقیه غلظت‌های تهیه شده ۱۰ برابر رقیق شدند.



شکل ۵: منحنی کالیبراسیون کارکامین با استفاده از طیف‌سنجی نوری در ۴۲۲ nm.

در پژوهش حاضر میزان بازده بارگذاری برای نانوذرات نشاسته در محیط اتانولی ۱۴/۳٪ (وزن کل دارو ۲/۴۶ mg، میزان بارگذاری ۲۴/۵۹٪) به دست آمد. برای اندازه‌گیری میزان بارگذاری، پس از سنتز نانوذره در شرایط بهینه و سپس خالص کردن و خشک کردن انجمادی آن‌ها، ظرفیت بارگذاری هر نانوسامانه تعیین گردید. شکل ۶ پودر نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده با کارکامین را که با روش خشک کردن انجمادی تهیه شده‌اند را نشان می‌دهد.

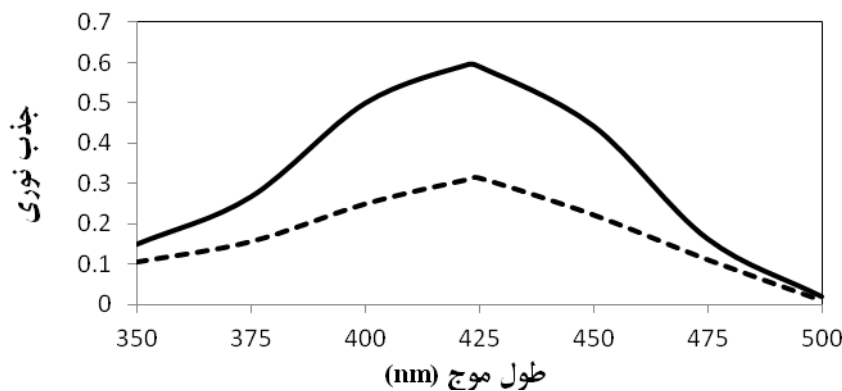
اندازه‌گیری میزان بارگذاری کارکامین در نانوذرات پلی‌ساکاریدی سوک فان چین و همکاران (۲۰۱۴)، نانوذرات نشاسته را به روش میکروامولسیون آب در روغن و در محیط‌های واکنش مختلف تولید کردند. در محیط اتانولی، میزان بازده بارگذاری کارکامین ۱۳٪ بود. همچنین ظرفیت بارگذاری با توجه به اثر غلظت کارکامین بررسی گردید. با افزایش غلظت کارکامین از ۰/۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم/لیتر، ظرفیت بارگذاری از ۰/۲ تا ۲ میلی‌گرم/میلی‌گرم افزایش یافت. حداکثر ظرفیت بارگذاری (۲ mg/mg)، در غلظت کارکامین ۲/۵ mg/L به دست آمد (۶).



شکل ۶: پودر نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده با کارکامین تهیه شده با روش خشک کردن انجمادی.

همان غلظت تهیه شد. همان‌طور که در شکل ۷ دیده می‌شود، پیک جذب کارکامین در ۴۲۲ nm و پیک‌های جذب نانوذرات نشاسته حل شده در آب در ۴۲۵ nm واقع شده‌اند. شیفت ایجاد شده در پیک جذب نانوذرات بارگذاری شده نسبت به پیک جذب کارکامین ممکن است به دلیل تشکیل اتصالات هیدروژنی بین مولکولی میان کارکامین و نانوذرات باشد (۶).

بررسی پیک‌های جذب نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده با کارکامین به منظور بررسی پیک‌های جذب نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده با کارکامین و مقایسه آن‌ها با پیک محلول کارکامین خالص، غلظت ۰/۵ mg/mL از نانوذرات در آب حل شد. همچنین محلول کارکامین خالص حل شده در اتانول نیز با



شکل ۷: پیک‌های جذبی به‌دست آمده از نانوذرات پلی‌نشاسته‌ای (خط چین) و کارکامین خالص (خط پیوسته) با روش طیف‌سنجی نوری UV-Visible.

تعیین بیشینه بازده بارگذاری نانوذرات بر اساس وزن خشک با استفاده از روش وزن خشک و هم‌چنین مشخص نمودن بازه‌ای از حجم محلول اتانولی که دارای بیشینه بازده بارگذاری می‌باشد، حجم‌های مختلفی از محلول اتانولی حاوی کارکامین انتخاب شد و به‌محلول نشاسته‌ای اضافه شد. از روی نتایج به‌دست آمده مشخص گردید که بازه‌ای با حجم‌های ۱ تا ۳ میلی‌لیتر از محلول اتانولی حاوی کارکامین دارای بیشترین بازده بارگذاری است. از طرفی مشخص گردید که بیشترین بازدهی حدود ۱۸/۴۸٪ بوده که مربوط به حجم ۲ میلی‌لیتری محلول اتانولی است (جدول ۱).

هدف اصلی بررسی پیک‌های جذبی نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده با کارکامین، تست اولیه تأیید تشکیل نانوذرات حاوی کارکامین می‌باشد. با توجه به این‌که پیک جذبی کارکامین با ۳ نانومتر شیفت قرمز در نانوذرات پلی‌ساکاریدی نیز دیده می‌شود، نشان دهنده حضور کارکامین در نانوذرات نشاسته‌ای می‌باشد. با توجه به این‌که غلظت کارکامین در هر دو محلول مورد طیف‌سنجی یکسان است، شیفت قرمز و هیپوکرومیسیته مشاهده شده، می‌تواند حاکی از ایجاد اتصالات غیر کووالان پلی‌ساکارید و کارکامین می‌باشد که این پدیده می‌تواند در رهایش دارو موثر باشد. بنابراین لزوم بررسی تست‌های رهایش دارو از نانوذرات مطرح می‌گردد.

جدول ۱: بیشینه بازده بارگذاری نانوذرات بر اساس وزن خشک.

بازده (%)	وزن ثانویه قالب (g)	وزن اولیه قالب (g)	حجم محلول اتانولی حاوی کارکامین (mL)
۱۴/۱۳	۱/۶۶۳۶	۱/۶۴۷۷	۱
۱۸/۴۸	۱/۹۹۱۵	۱/۹۷۰۷	۲
۷/۸۲	۲/۷۳۴۵	۲/۷۲۵۷	۳
۴	۱/۸۰۶۰	۱/۸۰۲۲	۴
۳/۵	۱/۷۹۳۲	۱/۷۸۹۲	۵

نانوذرات بارگذاری شده با کارکامین قادر می‌باشند که به‌طور کامل رشد باکتری مورد آزمایش را مهار کنند (OD₆₀₀ کمتر از ۰/۰۵)، گزارش شد. مشخص گردید که MIC کارکامین خالص ۰/۴۳۸ mg/mL می‌باشد که بیشتر از MIC نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده با کارکامین بود. برای محاسبه MIC از فرمول زیر استفاده شد:

حجم کل محیط/غلظت نانوذره × حجم نانوذره = MIC نانوذرات

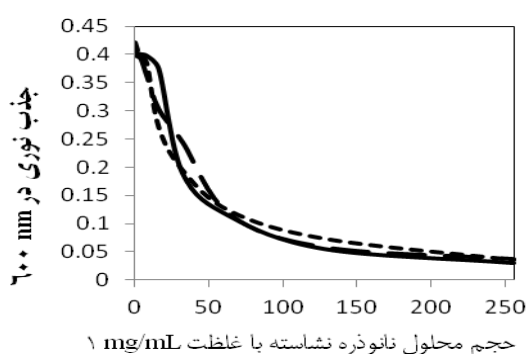
خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نشاسته‌ای حاوی کارکامین نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات نشاسته‌ای حاوی کارکامین هم‌چنین حداقل غلظت بازدارندگی کارکامین خالص بر باکتری بیماری‌زای مولد پوسیدگی دندان، استرپتوکوکوس موتانس، در جدول ۲ و شکل ۸ نشان داده شده است. آزمایش بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات در سه تکرار انجام شد. MIC به‌عنوان کمترین غلظتی که در آن

کل آزمایش عدد ثابت ۱ mg/mL در نظر گرفته شد، در فرمول ضرب گردید. عدد به دست آمده تقسیم بر حجم کل حاصل از افزودن نانوذره به محیط کشت گردید و به عنوان MIC مطرح گردید.

در این فرمول، کمترین حجم نانوذرات که در آن نانوذرات بارگذاری شده با کارکامین قادر می‌باشند که به طور کامل رشد باکتری مورد آزمایش را مهار کنند، به عنوان حجم نانوذره در فرمول قرار داده شد، سپس غلظت نانوذره که در

جدول ۲: فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نشاسته ای بارگذاری شده با کارکامین، MIC نانوذرات (mg/mL).

کارکامین خالص MIC	نانوذره نشاسته MIC	باکتری
۰/۴۳۸	۰/۲۰۴	<i>Streptococcus mutans</i>



شکل ۸: نمودارهای MIC نانوذرات نشاسته ای حاوی کارکامین با سه بار تکرار و MIC محلول کارکامین خالص در باکتری استرپتوکوکوس موتانس در طول موج ۶۰۰ nm.

به عنوان عامل ضد باکتریایی افزایش می‌دهد. مطالعات در حال انجام مربوط به ویژگی‌های کامل سم‌شناسی نانوذرات کارکامین در حال پیشرفت است و می‌تواند برای مشاهده اثر کاهش ذرات روی سمیت ریزسازواره‌ها جالب باشد. با این وجود، شواهد به دست آمده از مقالات نشان داده که نانوذرات کارکامین کپسوله شده در حامل‌های نانویی مثل Eudragit S100 و هیدروژل‌ها، برای مصرف خوراکی به صورت کوتاه و همچنین بلند مدت مطمئن هستند (۱۵). سازوکار کاهش یا مهار تکثیر سلولی باکتری به این صورت است که نانوذرات به دیواره سلولی باکتری متصل شده، لایه پپتیدوگلیکان را شکسته و به داخل سلول نفوذ می‌کنند، در نتیجه باعث اختلال ساختار اندامک‌های سلولی و کاهش تکثیر یا مرگ سلول از طریق لیز کردن آن می‌شوند. مطالعات قبلی که روی باسیلوس سوبتیلیس (گرم مثبت) انجام شده است نشان داده که سازوکار فعالیت ضدباکتریایی کارکامین شامل مختل کردن فعالیت GTPase

شکل ۸ روند تغییرات میزان جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر (نشاندنده حیات باکتریایی) را بر علیه غلظت‌های مختلف نانوذره نشان می‌دهد. با توجه به این که نانوذره ابتدا به صورت استوک در غلظت ثابت ۱ mL/mg تهیه شده بود، بر داشتن حجم‌های بیشتر از استوک اولیه نشان دهنده افزایش غلظت نانوذره در محلول نهایی می‌باشد. در این شکل به خوبی دیده می‌شود که با افزایش غلظت نانوذره میزان حیات باکتریایی کاهش می‌یابد و در غلظت ۰/۲۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر، میزان حیات به کمترین میزان خود کاهش می‌یابد. نکته مهم در این است که زمانی که اندازه کارکامین به گونه‌ای کاهش می‌یابد که خیلی کمتر از اندازه ذرات کارکامین حل شده در اتانول می‌شود، این امر باعث نفوذ بهتر و جذب بالاتر آن توسط سلول یا باکتری می‌گردد. همچنین سنجش‌های زیستی آزمایشگاهی به روشنی نشان داده که تبدیل شدن به فرم نانویی تا حدود زیادی انحلال‌پذیری در آب و کارایی کارکامین را

تعیین میزان بازدارندگی تشکیل بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس

نتایج حاصل از اثر بازدارندگی نانوذرات نشاسته‌ای بارگذاری شده و کارکامین خالص بر روی میزان تولید بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس بر روی مدل دندان در جدول ۳ نشان داده شده است. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و جذب‌ها در طول موج ۵۵۰nm قرائت گردید. به ازای هر pH، یک محلول شاهد (بدون باکتری)، یک محلول کنترل (بدون نانوذره)، یک محلول نانوذره (در حداقل غلظت بازدارندگی، با سه تکرار) و محلولی از کارکامین خالص (حاوی میانگین مقدار کارکامین در نانوذرات) در نظر گرفته شد. برای به دست آوردن میانگین مقدار کارکامین در نانوذرات، غلظت کارکامین در درصد بارگذاری نانوذره ضرب شد و میانگین آن‌ها به عنوان مقدار کارکامین خالص در نظر گرفته شد. از طرفی با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده گردید که در هر دو ۷ و ۵ pH اثر بازدارندگی نانوذرات بارگذاری شده نسبت به کارکامین خالص بیشتر بود. دلیل اساسی برای فعالیت قوی‌تر کارکامین بارگذاری شده در نانوذرات پلی‌ساکاریدی حل شده در بافر فسفات با ۷ و ۵ pH نسبت به کارکامین در اتانول مربوط به اندازه ذره است. در واقع به دلیل کوچکتر شدن سایز ذرات کارکامین، قابلیت نفوذ آن به درون سلول‌های باکتریایی افزایش یافته، و اثرات آنتی باکتریال آن تقویت می‌گردد. همچنین انتظار می‌رود در صورتی که تغییر اسیدیته باعث هیدرولیز و تخریب سامانه‌های نانوذره‌ای شود؛ افزایش سایز در نمونه‌ها مشاهده گردد.

این امر به دلیل هیدروفوبیسیته بالای کارکامین می‌باشد، که با جدایی از سامانه، قابلیت انحلال خود را باید از دست بدهند و تجمعات مولکولی با سایزهای بیش از ۵۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر را ایجاد نمایند. در حالی که اندازه‌گیری سایز نمونه‌ها بعد از تغییر pH چنین افزایش سایزی را نشان نمی‌داد که این مطلب بیان‌گر پایداری نانو سامانه در pH مورد بررسی می‌باشد. نکته مهم این است که زمانی که کارکامین به شکل نانوذره درمی‌آید، اندازه آن به حدود ۴۰-۲۰ nm کاهش می‌یابد، که خیلی کمتر از اندازه ذرات کارکامین حل شده در آب یا اتانول

پروتوفیلامنت‌های FtsZ است که در مرگ سلول باکتریایی نقش حیاتی ایفا می‌کنند. این اختلال برای باکتری‌ها کشنده بوده و تکثیر سلولی باکتری را از طریق مهار تجمع دینامیک FtsZ ها در Z ring ممانعت می‌کند. با این حال مشخص گردیده که ساختار غشای باکتری‌ها به هیچ وجه توسط کارکامین مختل نمی‌شود (۱۶). در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شد که کارکامین آنزیم sortase A پروتئین سطح باکتری‌ها را مهار می‌کند و از چسبندگی سلول به فیبرونکتین جلوگیری می‌کند، در نتیجه به عنوان یک عامل ضدباکتریایی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) عمل می‌کند (۱۷). گزارش شده که کارکامین در شرایط آزمایشگاهی فعالیت sortase A در استافیلوکوکوس اورئوس را مهار می‌کند. گروه‌های حفاظت شده سیستئین ۱۸۴ و هیستیدین ۱۲۰ که برای فعالیت آنزیم sortase A در استافیلوکوکوس اورئوس ضروری هستند، در sortase A استرپتوکوکوس موتانس نیز یافت شدند. لذا مشاهده شد که کارکامین می‌تواند sortase A را نیز در سلول‌های استرپتوکوکوس موتانس مهار کند. هنگامی که $15 \mu\text{mol/L}$ کارکامین به محیط کشت اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردید، Pac به داخل محلول روئی انتشار یافت. علاوه بر این، $15 \mu\text{mol/L}$ کارکامین به طور قابل ملاحظه‌ای تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس را کاهش داد. با این حال، سازوکار ضد میکروبی کارکامین ممکن است که با کاهش پروتئین سطحی Pac استرپتوکوکوس موتانس پیش برود (۱). سونگ و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضد چسبندگی بالقوه کارکامین بر روی استرپتوکوکوس موتانس را در تشکیل شبکه‌های خارج سلولی و سطوح دندان گزارش کردند. مشخص شد که کارکامین تشکیل بیوفیلم را از طریق کاهش Pac بوسیله مهار واکنش sorting کاتالیز شده توسط sortase A کاهش می‌دهد (۱۸). باوانا و همکاران (۲۰۱۱) نیز اثبات کردند سازوکاری که از طریق آن نانوذرات کارکامین خواص ضد باکتریایی را نشان می‌دهند از طریق اتصال (لنگر انداختن) به دیواره سلولی باکتری‌ها، شکستن آن‌ها، سپس نفوذ به داخل سلول و اختلال در ساختار اندامک‌های سلولی است (۱۵).

است (800-500 nm)؛ در نتیجه باعث نفوذ بهتر و جذب بالاتر پپتیدوگلیکان و مرگ سلول باکتریایی را در پی خواهد آن توسط سلول‌ها می‌شود و متعاقباً شکستن دیواره داشت (۱۵).

جدول ۳: بازدارندگی نانوذرات پلی‌ساکاریدی بارگذاری شده با کارکامین بر روی تولید بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس در pHهای مختلف (۵ و ۷) با استفاده از چگالی نوری در طول موج ۵۵۰ nm.

چگالی نوری ناشسته بارگذاری شده	چگالی نوری محلول کارکامین خالص	چگالی نوری شاهد	آزمایش
۰/۰۹۸	۰/۳۰۴	۰/۹۳۳	۵pH
۰/۰۵۰	۰/۳۰۹	۰/۷۷۲	۷pH

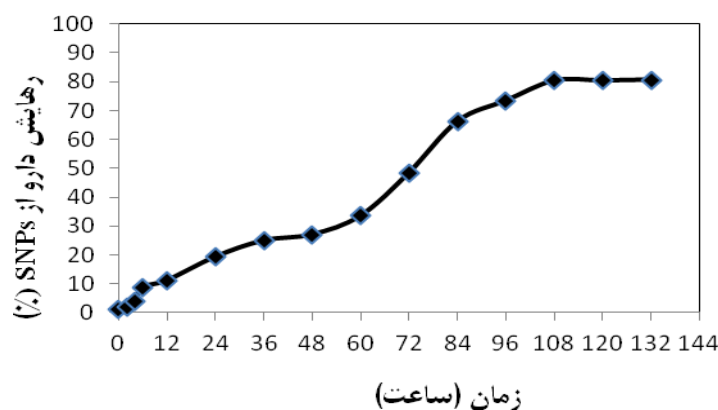
بارگذاری شدند. اساساً، کاربردهای موضعی نانوذرات بارگذاری شده با فARNسول، می‌تواند بیوفیلم‌های استرپتوکوکوس موتانس را ۴ برابر مؤثرتر از فARNسول آزاد تخریب کند. پایداری مکانیکی بیوفیلم‌های تیمار شده با نانوذرات بارگذاری شده با دارو در معرض خطر قرار گرفت و در نتیجه باعث افزایش حذف بیوفیلم، تحت تنش برشی Shear stress به میزان بیش از دو برابر، در مقایسه با فARNسول آزاد و کنترل شد. نانوذرات بارگذاری شده با فARNسول به طور مؤثری بیماریزایی بیوفیلم را در شرایط درون‌تنی با استفاده از یک رژیم درمانی موضعی (۲× روز) در مدل بیماری پوسیدگی دندان موش (جانورجونده) کاهش دادند. درمان با نانوذرات بارگذاری شده با فARNسول هم تعداد و هم شدت ضایعات پوسیدگی را کاهش داد، در حالی‌که فARNسول آزاد اثری نداشت. نانوذرات از طریق اتصالات با چندین هدف دارو Multi-targeted binding و رهایش دارو وابسته به pH با توجه به محرک‌های ریزمحیطی، توانایی بسیار خوبی برای افزایش اثر عوامل ضد بیوفیلم دارند (۱۹). نتایج پژوهش حاضر در این زمینه در جدول ۴ خلاصه شده است.

جذب نانوذرات روی هیدروکسی‌آپاتیت در pH های ۵ و ۷ حامل‌های نانوذرات قادر به ایجاد اتصال به ماده معدنی مینای دندان، هیدروکسی‌آپاتیت (HA)، هیدروکسی‌آپاتیت پوشش داده شده با بزاق Saliva-coated HA (SHA) و هیدروکسی‌آپاتیت پوشش داده شده با اگزوپلی‌ساکاریدها با رهایش دارو افزایش یافته در pH اسیدی می‌باشند. بنجامین هورو و همکاران در سال ۲۰۱۵ سامانه نانوذره‌ای از کopolymerهای دو بخشی متشکل از ۲-(دی‌متیل‌آمین) اتیل متآکریلات (DMAEMA)، بوتیل متآکریلات (BMA) و ۲-پروپیل آکرلیک اسید (PAA) (PAA)-b-(DMAEMA) ساختند که به شکل نانوذرات کاتیونی حدود ۲۱ نانومتر خود تجمعی-Self assemble کرد. نانوذرات به علت برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک قوی از طریق آمین‌های نوع سوم چندظرفیتی p(DMAEMA)، تمایل جذب قابل‌توجهی به HA، sHA و هیدروکسی‌آپاتیت پوشش داده شده با اگزوپلی‌ساکارید دارای بار منفی نشان دادند. با توجه به هسته‌های آب‌گریز، نانوذرات با داروی ضدباکتریایی و آب‌گریز فARNسول با غلظتی برابر با ۲۰ w/w٪

جدول ۴: میزان جذب نانوذرات روی هیدروکسی‌آپاتیت.

نانوسامانه حاوی کارکامین	نشاسته
درصد جذب در pH ۵	۲۴/۲ ± ۲/۴
درصد جذب در pH ۷	۵۲/۹ ± ۲/۹

کارکامین در ساعات اولیه دارند. در ۱۲ ساعت اولیه مقدار ۰/۱۱/۱٪، در ۲۴ ساعت ۰/۱۹/۳٪ و در پایان ۹۶ ساعت، ۰/۷۳/۴٪ کارکامین از نانوذرات نشاسته رها شد. لذا با توجه به نرسیدن به مرحله سکون پس از گذشت ۹۶ ساعت، نقاط زمانی دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که با گذشت ۱۰۸ ساعت رهایش هم‌چنان به‌صورت تدریجی و کنترل شده ادامه دارد، اما پس از آن رهایش به‌حالت سکون رسید و در پایان ۱۳۲ ساعت، ۰/۸۱/۶٪ کارکامین از نانوذرات نشاسته آزاد گردید (شکل ۹).



شکل ۹: بررسی رهایش کارکامین از نانوذرات نشاسته (SNPs).

کنترل شده و هدفمند را انجام دهد، تلاش کرده است. مواد آلی مثل لیپوزوم‌ها، هیدروژل‌ها، سورفاکتانت‌ها، مایسل‌های پلیمری به‌عنوان نانوحامل برای کپسوله کردن کارکامین به کار گرفته شده‌اند ولی از این میان نانوذرات پلیمری با دارا بودن هسته آب گریز و پوسته آب دوست، توجه رو به افزایشی را در کپسوله کردن داروهای آب گریز نظیر کارکامین کسب کرده‌اند.

برای سنتز نانوذرات پلی‌ساکاریدی حاوی کارکامین، روش ترسیب و ژل‌سازی یونی انتخاب شد. در حین سنتز برای انحلال نشاسته در آب از دمای °C ۹۰ استفاده شد. محلول اتانولی حاوی کارکامین در دمای °C ۷۰ به‌مدت یک ساعت به‌محلول پلیمری اضافه شد. مشخص شد که برای ساخت نانوذرات نشاسته، حجم اتانول ۱/۳۱ میلی‌لیتر و غلظت کارکامین ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در تولید بهینه نانوذرات بارگذاری شده مؤثر می‌باشند. هم‌چنین اندازه نانوذرات

اندازه‌گیری میزان رهایش دارو

رهایش کارکامین از نانوذرات نشاسته در یک بازه زمانی ۲۴۰ ساعته بررسی شد (۲۰، ۲۱). در ۲۴ ساعت اولیه مقدار ۰/۱۳٪ از کارکامین به‌صورت تدریجی از نانوذرات نشاسته رها شد. پس از گذشت ۲۴۰ ساعت حدود ۰/۹۳٪ کارکامین از نانوذرات نشاسته خارج گردید. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که نشاسته رهایشی تدریجی و هدفمند دارد (۶). نانوذرات نشاسته به علت جذب محلول بافر متورم شدند و کارکامین در بخش متورم شده نانوذرات به‌صورت تدریجی خارج گردید. مشاهده گردید که این نانوذرات رهایشی پایدار بدون رها شدن انفجاری

بحث

به‌دلیل اهمیتی که کارکامین در بخش‌های مختلف دارویی، غذایی و صنایع شیمیایی دارد، تلاش‌های بسیاری برای طراحی فرمولاسیون‌های قابل حل در آب انجام شده است که به دو روش شیمیایی و فیزیکی انجام می‌گیرد. روش‌های فیزیکی شامل توزیع کارکامین در حامل‌های مناسب برای افزایش حلالیت است و روش‌های شیمیایی با تغییر ساختار و یا فرمولاسیون با کمک داروها به کار گرفته می‌شود. یکی از روش‌های فرمولاسیون، نانوفناوری است که با نانوذره کردن کارکامین می‌تواند نسبت مساحت سطح به حجم و شیب غلظت را افزایش دهد که باعث افزایش حلالیت و سینتیک دارویی این ترکیب می‌شود. نانوپزشکی با در نظر گرفتن جنبه‌های مثبت نانوفرمولاسیون کارکامین در دهه‌های اخیر، در گسترش نانومواد می‌تواند هدف‌های دارویی با رهایش

بررسی قرار گرفت. مشخص شد که با گذشت ۱۰۸ ساعت رهایش هم‌چنان به‌صورت تدریجی و کنترل شده ادامه دارد، اما پس از آن رهایش به‌حالت سکون رسید و در پایان ۱۳۲ ساعت، ۸۱/۶٪ کارکامین از نانوذرات نشاسته آزاد گردید. با توجه به اینکه نانوسامانه‌های نشاسته حاوی کارکامین باعث خصوصیات اتصال کارکامین به‌مینای دندان را افزایش داده و باعث افزایش برهم‌کنش آن با مینای دندان می‌شوند و هم‌چنین مانع از پوسیدگی دندانی ناشی از استرپتوکوکوس موتانس می‌شوند. بنابراین به‌نظر می‌رسد نانوسامانه‌های نشاسته حاوی کارکامین ترکیب مناسبی جهت به‌کارگیری در بهداشت دهان و دندان می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج را این‌گونه می‌توان مطرح نمود که نانوسامانه‌های نشاسته حاوی کارکامین با قطر متوسط ذرات ۶۱/۱ نانومتر و پتانسیل زتای این نانوذرات ۱۴/۷- میلی‌ولت سنتز شد. میزان بارگذاری کارکامین در نانوذرات برابر با ۲۴/۵۹ درصد بود. حداقل غلظت مهارکننده (MIC) علیه استرپتوکوکوس موتانس برای این نانوسامانه و کارکامین خالص به‌ترتیب برابر با ۰/۲۰۴ و ۰/۴۳۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. لذا این طراحی باعث افزایش قابلیت بازدارندگی کارکامین شده است. لذا نانوسامانه طراحی شده در این پروژه قابلیت ارتقاء خصوصیات اتصال و برهم‌کنش با مینای دندان را دارد و از پوسیدگی دندانی ناشی از استرپتوکوکوس موتانس جلوگیری می‌کنند.

سپاس‌گزاری

این پژوهش حاصل پایان‌نامه و تلاش نویسندگان این تحقیق می‌باشد که در دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران انجام شده است. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از آقای پروفیسور محمد حسن شیخ‌ها، استاد ژنتیک مولکولی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به خاطر حمایت‌های مالی و معنوی جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

بارگذاری شده با استفاده از آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی پویشی و روش تفرق پویای نور اندازه‌گیری شد که نتایج هر دو آنالیز با هم مطابقت داشته و برابر با ۶۱/۱ نانومتر بود. هم‌چنین پتانسیل زتای این نانوذرات ۱۴/۷- میلی‌ولت بود که با دستگاه زتا سایزر اندازه‌گیری گردید. میزان بارگذاری در نانوذرات نیز برابر با ۲۴/۵۹ درصد بود که از طریق جذب نوری در دستگاه طیف سنجی نوری UV-visible و از روی منحنی استاندارد کارکامین قرائت شد. از طرفی به‌منظور تعیین خاصیت ضد میکروبی نانوذرات بر ضد باکتری استرپتوکوکوس موتانس، تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) انجام شد. غلظت‌های مختلفی از محلول‌های نانوذره نشاسته به مایه تلقیح یک شبانه روزی باکتری اضافه شد. نتایج نشان داد میزان MIC نانوذرات نشاسته از نظر میزان بازده بارگذاری بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس برابر با ۰/۲۰۴ mg/mL بود. هم‌چنین مشخص گردید که MIC کارکامین خالص ۰/۴۳۸ mg/mL می‌باشد که بیشتر از MIC نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین بود. هم‌چنین میزان بازدارندگی نانوذرات نشاسته بارگذاری شده با کارکامین بر روی تولید بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس در pH های ۵ و ۷ انجام شد. مشاهده گردید که در هر دو pH اثر بازدارندگی نانوذرات بارگذاری شده نسبت به کارکامین خالص بیشتر بود. دلیل اساسی برای فعالیت قوی‌تر نانوکامین بارگذاری شده در نانوذرات نشاسته حل شده در بافر فسفات با ۷ و ۵ pH نسبت به کارکامین در اتانول مربوط به اندازه ذره است.

هم‌چنین آزمایش جذب نانوذرات روی هیدروکسی آپاتیت در pH های ۵ و ۷ انجام گردید. نانوذرات نشاسته به‌علت جذب محلول بافر متورم شدند و کارکامین در بخش متورم شده نانوذرات به‌صورت تدریجی خارج گردید. مشاهده گردید که این نانوذرات رهایشی پایدار بدون رها شدن انفجاری کارکامین در ساعات اولیه دارند. در ۱۲ ساعت اولیه مقدار ۱۱/۱٪، در ۲۴ ساعت ۱۹/۳٪ و در پایان ۹۶ ساعت ۷۳/۴٪ کارکامین از نانوذرات نشاسته رها شد. لذا با توجه به نرسیدن به مرحله سکون پس از گذشت ۹۶ ساعت، نقاط زمانی دیگر نیز مورد

References:

- 1-Hu P, Huang P, Chen MW. *Curcumin reduces Streptococcus mutans biofilm formation by inhibiting sortase A activity*. Arch Oral Biol 2013; 58(10): 1343-48.
- 2-Matthias H, Christian H. *Nanomaterials in preventive dentistry*. Nat Nanotechnol 2010; 5(8): 565-9.
- 3-Chavez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. *Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on Streptococcus mutans Biofilms*. Appl Environ Microbiol 2011; 77(11): 3892-95.
- 4-Bhawana, Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. *Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study*. J Agric Food Chem 2011; 59(5): 2056-61.
- 5-Min S, Xun S, Buyun D, Xiuli H, Xiuju L, Aihua Y, et al. *Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin*. Nanomedicine 2012; 7(7): 1085-100.
- 6-Suk FC, Siti NAY, Suh CP. *Preparation and Characterization of Starch Nanoparticles for Controlled Release of Curcumin*. International J Polymer Sci 2014; 8 pages.
- 7-Mara DG, Soraya DB, Emanuela DC, et al. *The Effect of a Silver Nanoparticle Polysaccharide System on Streptococcal and Saliva-Derived Biofilms*. Int J Mol Sci 2013; 14(7): 13615-625.
- 8-Michal E, Jonathan L, Ehud B, Aharon G. *MgF2 nanoparticle-coated teeth inhibit Streptococcus mutans biofilm formation on a tooth model*. J Material Chem B 2013; 32: 3985-91 .
- 9-Telma BLB, Louis G, Denise PS, Daniel G. *Subinhibitory Concentrations of Triclosan Promote Streptococcus mutans Biofilm Formation and Adherence to Oral Epithelial Cells*. PLoS ONE 2014; 9: 6 pages.
- 10- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation*. J Microbiol Methods 2000; 40(2): 175-79.
- 11- Nguyen S, Hiorth M, Rykke M, Smistad G. *The potential of liposomes as dental drug delivery systems*. Eur J Pharm Biopharm 2011; 77(1): 75-83.
- 12- Das RK, Kasoju N, Bora U. *Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells*. Nanomedicine J 2010; 6: 153-60.
- 13- Honary S, Zahir F. *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems*. Tropical J Pharmaceutical Res 2013; 12(2): 265-273.
- 14- Suh CP, Soon HT, Suk FC. *Facile Synthesis of Curcumin-Loaded Starch-Maleate Nanoparticles*. J Nanomaterials 2004; 7pages.
- 15- Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine RA, et al. *Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent*. J Nanomedicine 2015; 11: 195-206.

- 16- Rai D1, Singh JK, Roy N, Panda D. *Curcumin inhibits FtsZ assembly: An attractive mechanism for its antibacterial activity*. Biochem J 2008; 410: 147-55.
- 17- Park BS, Kim JG, Kim MR, Lee SE, Takeoka GR, Oh KB. *Jeong-Han K, (2005) Curcuma longa L. constituents inhibit sortase A and Staphylococcus aureus cell adhesion to fibronectin*. J Agric Food Chemistry 2005; 53(23): 9005-09.
- 18- Song J, Choi B, Jin EJ, Yoon Y, Choi KH. *Curcumin suppresses Streptococcus mutans adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(7): 1347-52.
- 19- Horev B, Klein MI, Hwang G, Li Y, Kim D, Koo H. *pH-activated Nanoparticles for Controlled Topical Delivery of Farnesol to Disrupt Oral Biofilm Virulence*. ACS Nano 2015; 9(3): 2390-404.
- 20- Jahanizadeh S, Yazdian F, Marjani A, Omidi M, Rashedi H. *Curcumin-loaded chitosan/carboxymethyl starch/montmorillonite bio-nanocomposite for reduction of dental bacterial biofilm formation*. Int J Biol Macromol 2017; 105: 757-63.
- 21- Khezri A, Karimi A, Yazdian F, Jokard M, Rezazadeh Mofradnia S, Rashedi H, et al. *Molecular dynamic of curcumin/chitosan interaction using a computational molecular approach: Emphasis on biofilm reduction*. Int J Biol Macromol 2018; 15: 972-78.

Improvement in curcumin application for preventing dental caries by embedding in nanoparticles

Marzieh Azizi¹, Fatemeh Yazdian ^{*2}, Amir Maghdoudi^{3*}, Leila Ghaderi², Fatemeh Hagirosadat ^{2,4}

Original Article

Introduction: The aim of this research was optimization curcumin characteristics for oral hygiene application. Curcumin-loaded starch nano-particles were developed for enhancing adhesion property with enamel surface and best anti-bacterial effect against *Streptococcus mutans*.

Methods: The study was the experimental one. The nanoparticles synthesis was based on precipitation and ionic gelation method. Nanoparticles characterization was done by scanning electron microscopy, dynamic light scattering and determination of zeta potential. In addition, minimum inhibitory concentration (MIC) was assessed to evaluate the antimicrobial properties of nanoparticles against *Streptococcus mutans*. The binding amount of nanoparticles to hydroxyapatite was evaluated and finally, the curcumin release from the nanoparticles was also assayed.

Results: The average size of optimized starch nanoparticles were 61.1 nm. Also, zeta potential was -14.7, mV. Loading contents of nanoparticles were 24.59% measured by optical density from standard calibration curve of curcumin. In addition, minimum inhibitory concentration (MIC) of nanoparticles against *Streptococcus mutans*, was 0.204 and 0.438 mg/mL for starch nanoparticles and pure curcumin, respectively. It was also found that starch nanoparticles had inhibitory effect on bacterial biofilm.

Conclusion: Curcumin-loaded starch nano-particles improve adhesion properties and interactions with enamel and prevent dental caries of *Streptococcus mutans*.

Keywords: Streptococcus mutans, Curcumin, Dental caries.

Citation: Azizi M, Yazdian F, Maghdoudi A, Ghaderi L Hagirosadat F. **Improvement in curcumin application for preventing dental caries by embedding in nanoparticles.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(3): 1327-45.

¹Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Iran

²Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technology, University of Tehran, Iran

³Department of Industrial Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran PO Box 14965-161, Iran

⁴Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Corresponding Author: Tel. 02186093259; Email: yazdian@ut.a.cir; maghsoudi.a@gmail.com