



Scan online to view this article

Evaluation of the effect of carbon-based nanocomposites containing Trachyspermum on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans*

Shokofeh Mazhab jafari¹, Fatemeh Yazdian^{1,2*},
Farzaneh Hosseini¹, Behnam Rasekh³

1. Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

3. Director Environment & Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: The bacterium *Streptococcus mutans* is the main cause of dental caries. The formation of biofilms of this bacterium depends on the presence of the enzyme glucosyltransferase, which is encoded by the *gtf* gene. The aim of this study was evaluated the effect of polysaccharide nanocomposites of Chitosan(Cs)/Carboxymethyl Starch(CMS) /CQD.Mg /Trachyspermum on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans* using Real Time-PCR method in the formation of dental biofilm.

Materials and Methods: After preparation of Chitosan(Cs)/Carboxymethyl Starch(CMS) /CQD.Mg /Trachyspermum nanocomposite, its antimicrobial effect on *Streptococcus mutans* ATCC 35668 was investigated by microdilution method. The morphology and structural properties of the nanocomposite were investigated by FTIR and SEM analysis. The expression of *gtfD*, *gtfC*, *gtfB* genes was examined by Real Time-PCR technique. Data analysis was performed by SPSS₂₂ software and the means were compared based on ANOVA at the level of 0.05.

Results: The particle size of Chitosan(Cs)/Carboxymethyl Starch(CMS)/CQD.Mg/Trachyspermum nanocomposite was obtained in the range of 36-40 nm. The results of FTIR spectrum indicate the formation of a bond between carbon-quantum materials-magnesium and Trachyspermum essential oil in the nanocomposite. The antimicrobial effect of Cs/CMS/CQD.Mg/Trachyspermum (0.168 mg/ ml) was obtained. RT-PCR results showed that *gtfC* gene expression was significantly reduced ($P=0.049$) in nanocomposite-treated cells, indicating the strong effect of Cs/CMS/CQD.Mg/Trachyspermum nanocomposite suppresses *gtfC* gene and reduces biofilm formation. No significant relationship was observed in the expression of *gtfB* and *gtfD* genes in nanocomposite-treated cells compared to the control group ($P = 0.067$, $P = 0.187$).

Conclusion: According to the results, the expression of *gtfC* gene in cells treated with nanocomposite containing Trachyspermum has decreased and nanocomposite has a strong effect in suppressing genes and reducing the formation of microbial biofilm of teeth.

Keywords: Gene expression, *Streptococcus mutans*, Polysaccharide, Dental biofilm, Iau Science.

Corresponding author:

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

Email: yazdian@ut.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ارزیابی تأثیر نانوکامپوزیت مبتنی بر کربن کوانتوم دات حاوی زنیان بر بیان ژن *gtf* در استریپتوکوکوس موتانس

شکوفه مذهب جعفری^۱، فاطمه یزدیان^{۱*}، فرزانه حسینی^{۱*}، بهنام راسخ^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. رئیس پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *استریپتوکوکوس موتانس* عامل اصلی ایجاد پوسیدگی دندان است. ایجاد بیوفیلم های باکتری مذکور منوط به حضور آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز است که توسط ژن *Glycosyltransferase (gtf)* کدگذاری می شود. هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر نانوکامپوزیت پلی ساکارییدی زیستی زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم (Trachyspermum-Cs-CMS-CQD.Mg) بر میزان بیان ژن های *gtfD*، *gtfC*، *gtfB* در *استریپتوکوکوس موتانس* با استفاده از روش Real Time-PCR در تشکیل بیوفیلم دندان است.

مواد و روش ها: پس از تهیه نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم، اثر ضد میکروبی آن روی باکتری *استریپتوکوکوس موتانس* ATCC 35668 با روش میکروداپلوشن بررسی گردید. مورفولوژی و خصوصیات ساختاری نانوکامپوزیت توسط طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی گردید. بیان ژن های *gtfD*، *gtfC*، *gtfB* با تکنیک Real time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل داده ها با نرم افزار SPSS²² و مقایسه میانگین ها براساس ANOVA در سطح اطمینان ۰/۰۵ انجام شد.

یافته ها: اندازه ذرات نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم در محدوده ۴۰-۳۶ نانومتر به دست آمد. نتایج طیف FTIR نشان دهنده تشکیل پیوند بین کربن کوانتوم-دات-منیزیم و اسانس زنیان در نانوکامپوزیت است. اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم (۰/۱۶۸ میلی گرم بر میلی لیتر) به دست آمد. نتایج RT-PCR نشان داد، بیان ژن *gtfC* به طور معناداری ($P=0/049$) در سلول های تیمار شده با نانوکامپوزیت کاهش یافته، که نشان دهنده اثر قوی نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل-نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم در سرکوب ژن *gtfC* و کاهش تشکیل بیوفیلم است. ارتباط معناداری در بیان ژن های *gtfD* و *gtfB* در سلول های تیمار شده با نانوکامپوزیت نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($P=0/187$ ، $P=0/067$).

نتیجه گیری: طبق نتایج میزان بیان ژن *gtfC* در سلول های تحت درمان با نانوکامپوزیت حاوی زنیان کاهش داشته و نانوکامپوزیت داری اثر قوی در سرکوب ژن ها و کاهش تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است.

واژه های کلیدی: ژن *gtf*، *استریپتوکوکوس موتانس*، نانوکامپوزیت، بیوفیلم دندان، Iau Science.

مقدمه

پوسیدگی و بیماری های عفونی شایع ترین بیماری های دهان و دندان در انسان هستند (۱). پوسیدگی دندان ناشی از رشد بیش از حد گروه خاصی از میکروارگانیسم ها در سطح دندان است که تولید پلاک های دندانی می کنند (۲). در پلاک دندانی حدود هفت صد گونه باکتریایی گزارش شده، در مرحله اول تشکیل پلاک، با تولید ترکیب های بیوشیمیایی مؤثر اتصال اولیه رخ داده و کلونی اولیه تشکیل می شود. در مرحله دوم باکتری ها قادر به

نویسنده مسئول:

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: yazdian@ut.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۳

مقاوت آنتی‌بیوتیکی و مشکلات تغییر رنگ دندان به‌طور معمول فقط در درمان‌های کوتاه مدت استفاده می‌شوند (۷). بر این اساس، تحقیقات حاضر روی توسعه عوامل جدید آنتی‌باکتریال که بتوانند بر این مقاومت غلبه کنند صورت می‌پذیرد (۸). یک گام اساسی برای رسیدن به این هدف توسعه روش‌های ضد میکروبی با نفوذ راحت در ساختارهای بیوفیلم است (۹). نانوذرات پلیمرهای طبیعی به‌نظر می‌رسد در درمان و کنترل بیماری‌های دهان و دندان و حامل‌های بیولوژیکی برای نقل و انتقال مواد به بیوفیلم مطلوب باشند (۱). کیتوزان قابلیت استفاده به‌عنوان یک ماتریکس به‌منظور دارورسانی و طیف وسیعی از کاربرد در بیودنتال را دارد (۱۰). نشاسته پلی‌ساکارید طبیعی ارزان قیمت، زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر و غیرسمی است (۱۱). نشاسته کربوکسی‌متیل، به شکل تجربی به‌عنوان انتقال دهنده کارآمد دارو استفاده شده است (۱۲). به‌تازگی، نانومواد کربنی به‌عنوان ترکیب‌های آنتی‌باکتریایی استفاده می‌شود. از میان این مواد، کربن‌دات‌ها (CDS) پتانسیل بالایی در کاربردهای زیست‌پزشکی دارند (۱۳، ۱۴). کربن‌کوانتوم‌دات (CQD)^۲ یکی از مناسب‌ترین نانومواد کربنی است که به‌دلیل داشتن نسبت بالای سطح به حجم، داشتن گروه کربوکسیل که باعث حل شدن در آب می‌شود و سازگاری با محیط زیست، کاربرد فراوان دارد (۱۵، ۱۶). اسانس گیاهان و ترکیب‌های عمده شیمیایی آن‌ها کاندیدای بالقوه به‌عنوان عوامل ضد میکروبی هستند (۱۷). زنیان^۳ یک سرده از تیره چتریان شامل گیاهان یک ساله با برگ‌های شانه‌ای مرکب و گلبرگ‌های سفید است. زنیان به‌دلیل ترکیب‌های منحصربه‌فرد، فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی از جمله خواص ضدباکتری از خود نشان می‌دهد. بخشی که برای این گیاه و میوه آن استفاده شده دارای مقدار زیادی تیمول است که دارای خواص ضد باکتری مربوط به این قسمت است (۱۸، ۱۹). ترکیب‌های فرار موجود در اسانس روغنی به عوامل محیطی نور و حرارت به‌شدت حساس هستند، لذا به‌منظور کنترل عوامل خارجی، انکپسولاسیون در نانوکامپوزیت‌های پلی‌ساکاریدی پیشنهاد می‌شود (۲۰). در پژوهش حاضر نانوکامپوزیت-زنیان/کیتوزان/کربوکسی‌متیل نشاسته/منیزیم. کربن-کوانتوم‌دات ساخته شد و مورفولوژی، خصوصیات ساختاری و فعالیت ضد میکروبی آن بررسی گردید، سپس با روش RT-PCR بیان ژن‌های *gtfB*، *gtfC*، *gtfD* توسط سه نانوکامپوزیت ارزیابی شد.

اتصال به کلونی اولیه، تشکیل یک ساختار منحصر به‌فرد را داده و موجب مقاوم شدن آن‌ها به عوامل ضد میکروبی می‌گردند. به این ساختارهای ثانویه شامل چندگونه باکتریایی، بیوفیلم گفته می‌شود (۳). از دلایل اصلی پوسیدگی دندان، تخمیر کربوهیدرات‌ها به‌دلیل فعالیت میکروارگانیزم‌ها است. طبق تحقیقات اکثر باکتری‌های جداسازی شده متعلق به جنس *استرپتوکوکوس* بوده و *استرپتوکوکوس موتانس* عامل اصلی در پوسیدگی دندان است (۴). عوامل اصلی پاتوژنی *استرپتوکوکوس موتانس* که باعث تشکیل بیوفیلم موفق باکتری در دهان می‌گردند چسبندگی، توانایی تولید اسید و تحمل اسید است. رژیم غذایی حاوی میزان بالای ساکاروز عاملی مثبت برای رشد و تشکیل بیوفیلم‌های *استرپتوکوکوس موتانس* است، زیرا *استرپتوکوکوس موتانس* توانایی متابولیسم ساکاروز را بهتر از سایر باکتری‌های موجود در دهان دارا بوده و ساکاروز را به اسیدلاکتیک و گلوکان نامحلول در آب تبدیل می‌کند. و ایجاد پلاک‌دندانی می‌باشد و به‌وسیله گلیکوزیل-ترانسفرازها^۱ (*gtf*) از ساکاروز سنتز می‌گردد. این فرآیند بیوشیمیایی منجر به ثابت شدن *استرپتوکوکوس موتانس* به سطح دندان و ایجاد پلاک‌دندان است. *استرپتوکوکوس موتانس* حداقل سه نوع ژنوتیپ جداگانه *gtf* تولید می‌کند: *gtfB* - ۱ گلوکان نامحلول در آب با پیوندهای ۱-۳ α تولید می‌کند. *GtfC* - ۲ دو نوع گلوکان محلول و نامحلول با پیوندهای ۱-۶ β تولید می‌کند. *gtfD* - ۳ به‌صورت غالب تر گلوکان نامحلول با پیوندهای ۱-۶ α تولید می‌کند. هر یک از انواع *gtf* ها نقش مجزا دارند اما دارای هم‌پوشانی هستند. *gtfC* تمایل به اتصال به بزاق پوشیده شده با هیدروکسی آپاتیت دارد. این اتصال باعث افزایش توانایی اتصال باکتری به سطح دندان می‌گردد. *gtfB* با تولید گلوکان نامحلول و اتصال محکم به باکتری‌ها باعث خوشه‌بندی سلول‌ها شده و انعطاف‌پذیری پلاک را به‌شدت افزایش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد *gtfD* نقش غالب را در تولید گلوکان نامحلول در مراحل بعدی به‌عهده دارد (۵). در واقع، حذف ژن‌های *gtf C, B, D* در *استرپتوکوکوس موتانس* منجر به کاهش تشکیل بیوفیلم با حداقل تراکم باکتری‌ها و پلی‌ساکاریدها داخل بدن می‌شود (۶). این امر نشان می‌دهد سرکوب ژن‌های *gtf* یک روش جایگزین برای مختل شدن فرایند تشکیل بیوفیلم است. روند تحقیقات اخیر به پیشگیری و کنترل فرایند تشکیل بیوفیلم اختصاص یافته است. داروهای انتخابی درمان عفونت‌های دهانی حاصل از *استرپتوکوکوس موتانس* به‌دلیل افزایش

² Carbon quantum dots

³ *Trachyspermum*

¹ Glycosyltransferase (*gtf*)

مواد و روش‌ها

استرپتوکوکوس موتانس ATCC 35668 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) خریداری شد. کیتوزان (low M_w)، دی‌آمونیم هیدروژن سترات از شرکت مرک تهیه شدند. دندان‌های سالم از دانشکده دندان‌پزشکی دانشگاه تهران تهیه و توسط دستگاه برش Mecatome مدل Presi فرانسه به اندازه‌های برابر (۳ میلی‌متر) برش داده شد.

جهت تعیین خصوصیات ساختاری و مورفولوژی نانوکامپوزیت، اندازه‌گیری متوسط سایز ذرات از دستگاه‌های FT-IR مدل ۱۰، ۰۳، ۰۶، شرکت Perkin Elmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل KYKY_EM۳۲۰۰، اسپکتروفوتومتر مدل PG Instrument، دستگاه انکوباتور مدل Binder و شیکرانکوباتور مدل IKA و دستگاه سانتریفیوژ مدل Sigma استفاده شد.

آماده‌سازی نانوذرات کیتوزان و کربوکسی‌متیل‌نشاسته

نشاسته طی فرآیند اتری شدن در ایزوپروپانول/آب به کربوکسی‌متیل‌نشاسته تبدیل شد (۲۱). نانوذرات کیتوزان و کربوکسی‌متیل‌نشاسته با استفاده از روش ژلاتین یونی تهیه شدند. رقت‌های مختلف کربوکسی‌متیل‌نشاسته (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ وزنی٪) با حل کردن پودر کربوکسی‌متیل‌نشاسته در ۱۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه دمای 50°C توسط هم‌زن مغناطیسی (۵۰۰ rpm) تهیه شد؛ رقت‌های مختلف کیتوزان (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ وزنی٪) با انحلال پودر کیتوزان در ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۰/۵٪ (حجمی/حجمی) در دمای اتاق توسط هم‌زن مغناطیسی (۷۰۰ rpm) تهیه شد. محلول کیتوزان توسط سدیم هیدروکسید با رقت ۱ مولار تا pH ۵ تنظیم شد، ۱۰ میکرولیتر توئین ۲۰ به محلول‌ها به‌عنوان عامل امولسیون اضافه شد تا محلول با پراکندگی یکنواخت و بدون تراکم حاصل شود (۲۲).

تهیه کربن کوانتوم دات-منیزیم به روش هیدروترمال

ابتدا ۲ گرم دی‌آمونیم هیدروژن سترات به‌عنوان منبع کربن به‌وسیله آب مقطر در حجم ۷۵ میلی‌لیتر در دمای 25°C به‌صورت کامل حل شد، سپس ۱ گرم MgCl_2 به‌عنوان منبع فلزی اضافه نموده تا به‌صورت کامل حل شود. مقداری سدیم هیدروکسید به‌عنوان پایدارکننده به محلول فوق افزوده تا محلول همگن به‌دست آید، این محلول

همگن درون بمب هیدروترمال ریخته و بمب هیدروترمال به مدت ۲۴ ساعت درون آون دمای 150°C قرار داده شد تا کربن کوانتوم دات-منیزیم تشکیل شود. کربن کوانتوم-دات-منیزیم با غلظت نهایی ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. جهت پودر کردن نمونه از فریزدرایر استفاده گردید.

سنتز نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم

ابتدا ۰/۱۵ گرم کربن کوانتوم دات-منیزیم به‌دست آمده، در بشر ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۳۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه در حال هم‌زدن، پخش شد. نسبت ۳:۱ از محلول‌های نانوذرات کیتوزان و کربوکسی‌متیل‌نشاسته به آرامی و در دستگاه التراسوند (Hilscher UP200H, Germany) تحت سونیکیت مدت ۵۰ دقیقه اضافه شد. چندین بار سوسپانسیون حاصل ۲ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، و توسط آب دی‌یونیزه و اتانول شسته شد. نانوکامپوزیت حاصل مدت ۵ دقیقه در نیتروژن مایع ذخیره شد، سپس به دستگاه انجماد خشک انتقال یافت. ارزیابی کیفیت و مورفولوژی نانوکامپوزیت توسط SEM صورت پذیرفت.

اسانس‌گیری گیاه زنیان

اسانس روغنی نمونه گیاه خشک به‌روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر (مدل laborota 4003 شرکت Heidolph آلمان) جداسازی شد. در هر بار اسانس‌گیری، ۱۰۰ گرم بخش‌های هوایی گیاه به‌صورت پودر شده در بالن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر دستگاه ریخته شد و مقداری آب معادل ۴ تا ۶ برابر وزن گیاه، جهت نرم شدن بافت گیاه به آن اضافه گردید. عمل استخراج مدت ۵ ساعت انجام پذیرفت و اسانس حاصله بعد از تقطیر، جمع‌آوری شد و پس از آب‌گیری با سولفات سدیم و حل شدن در حلال دی‌متیل سولفوکسید اسانس گیاه مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

سنتز نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم

اسانس زنیان به‌مقدار ۰/۵٪ به محلول پایه نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل‌نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم اضافه شد و محلول نهایی مدت ۵ دقیقه در فرکانس ۴۰ KHz دستگاه اولتراسوند (Hilscher UP200H, Germany) سونیکیت شد (۲۴).

تعیین خصوصیات نانوکامپوزیت

عامل بالقوه بین ترکیبها در سیستم نانوکامپوزیتی و بررسی گروههای عاملی توسط FT-IR در دمای اتاق صورت پذیرفت. طیف FT-IR نانوکامپوزیت ساخته شده بر روی نمونههای لیوفیلیزه با استفاده از دستگاه طیف-سنج ثبت شد. میزان ۱ mg از نانوکامپوزیت در هاون همراه با KBr پودر شد و با ضخامت ۰/۱ سانتی متر روی صفحه قرار گرفت. طیف در محدوده $4500-400\text{Cm}^{-1}$ مشاهده شد. ویژگیهای مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت فریزدرای شده با استفاده از SEM با قدرت ۱۰۰ وات بررسی گردید (۲۵).

کشت میکروارگانسیم

چند کلنی از رشد یکروزه باکتری *استریپتوکوکوس موتانس* در محیط کشت بلاد آگار به ۱۵ میلی لیتر محیط کشت مایع BHI منتقل و ۲۴ ساعت در دمای 37°C و 150rpm کشت داده شد؛ سپس ۵۰۰ میکرولیتر از این کشت به ۲۰ میلی لیتر محیط BHI تازه اضافه و به شیکر انکوباتور منتقل گردید تا باکتریها در فاز میانی رشد لگاریتمی خود OD_{600} (۰/۱-۵/۶) قرار گیرند. مقدار ۱۵ میلی لیتر محیط را مدت ۱۸ دقیقه در دمای 4°C و 4000rpm سانتریفوژ کرده تا محیط کشت از سلولهای باکتری جدا شود (۲۶).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)

نانوکامپوزیت روی باکتری *استریپتوکوکوس موتانس* جهت تعیین MIC نانوکامپوزیت روی باکتری *موتانس*، کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط کشت BHI دمای 37°C و 150rpm تهیه شد. جذب نوری، OD_{600} ماده تلقیح توسط BHI تازه روی ۰/۱ تنظیم گردید. برای تعیین MIC نانوکامپوزیت در پلیت ۹۶ چاهکی، در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ماده تلقیح و حجمهای ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ میکرولیتر از محلول نانوکامپوزیت (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) (با سه تکرار) اضافه شد، هم چنین برای اسانس زنیان و نانوکامپوزیت بدون اسانس این مراحل در همان پلیت انجام شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C ، رشد باکتری با ثبت OD_{600} توسط ELISA اندازه گیری شد. MIC نانوکامپوزیت برابر با کمترین غلظت است که منجر به OD_{600} کم تر یا مساوی ۰/۰۵ شود (۲۷).

تعیین اثر نانوکامپوزیت روی تولید بیوفیلم باکتری *استریپتوکوکوس موتانس*

جهت تعیین اثر نانوکامپوزیت روی تولید بیوفیلم باکتری *استریپتوکوکوس موتانس* ابتدا محیط کشت TSB^4 حاوی ۲٪ گلوکز تهیه و استریل شد. جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، *استریپتوکوکوس موتانس* در مقداری از همین محیط به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد. در انتها در یک پلیت ۹۶ خانه U شکل (کره-SPL) به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری تهیه شده در محیط TSB و یک قطعه از مینای دندان اضافه گردید. پلیت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در این روش، ۳ چاهک کنترل منفی (عدم رشد باکتری در نتیجه عدم تشکیل بیوفیلم) و ۳ چاهک کنترل مثبت (رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم) در یک پلیت باید اختصاص داشته باشد. پس از ۲۴ ساعت، جهت مطالعه بیوفیلم طبق روش رنگ آمیزی، ابتدا محیط کشتها از چاهکها حذف گردید و چاهکها و قطعه مینای دندان ۱-۲ بار با بافر PBS سترون با حجم ۲۰۰ میکرولیتر شسته شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول هر نانوکامپوزیت (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) در حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در محلول بافر فسفات (pH)های ۵ و ۷) به چاهکهای مربوطه منتقل شد و مدت ۳۰ دقیقه در 37°C انکوبه گردید. مرحله بعد محلول نانوکامپوزیت حذف شد چاهک و مینای دندان ۳ بار با پیپت کردن ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS سترون شستشو داده شد. به منظور فیکس کردن بیوفیلم، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر متانول مطلق افزوده شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از ۱۵ دقیقه متانول حذف و چاهکها در معرض هوا خشک شدند. پس از خشک شدن مینای دندان، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ اضافه و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از ۵ دقیقه کریستال ویوله حذف گردید و چاهک و مینای دندان ۵ بار با پیپت کردن ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS سترون شستشو داده شد. در آخر به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ v/v اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. برای بررسی نتایج از روش Optical density cut-off (ODc) استفاده شد. به منظور بررسی ابتدا انحراف معیار و میانگین OD چاهکهای کنترل منفی محاسبه سپس طبق فرمول زیر محاسبه انجام شد (۳۶ و ۳۷). معادله ۱:

$$\text{ODc} = \text{چاهکهای کنترل منفی OD میانگین} + (3) \times \text{انحراف معیار چاهکهای کنترل منفی}$$

بعد از محاسبه ODc یا کات اف، OD چاهکهای مورد مطالعه طبق موارد زیر دسته بندی شد.

⁴ Tryptic soy broth

| | |
|---------------------------------------|----------------|
| $OD > 4 \times ODc$ | بیوفیلیم قوی |
| $2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$ | بیوفیلیم متوسط |
| $ODc < OD \leq 2 \times ODc$ | بیوفیلیم ضعیف |
| $OD \leq ODc$ | بیوفیلیم منفی |

طیف‌سنجی مادون قرمز (FT.IR)

از FT.IR برای بررسی تعامل اسانس زنیان و نانوحامل پلی- ساکارییدی استفاده شد. طیف FT.IR نانوکامپوزیت حاوی عصاره زنیان توضیح داده شده است.

طیف FTIR نانوکامپوزیت کیتوزان / کربوکسی‌متیل

نشاسته / کربن کوانتوم‌دات-منیزیم

مطابق شکل ۱، پیک جذبی در محدوده 3446 cm^{-1} به ارتعاش کششی گروه O-H اشاره دارد. پیک جذبی گسترده در محدوده $3500-3444 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن NH_2 و پیوند هیدروژنی گروه O-H اشاره دارد، ارتعاشات در ناحیه 1738 cm^{-1} به گروه کربونیل (کربوکسیلیک اسید موجود در سطح CQD) اختصاص دارد (۲۸). پیک ظاهر شده در 1644 cm^{-1} ، به ارتعاش کششی گروه کربوکسیل (آمید) کیتوزان نسبت داده می‌شود (۲۹). پیک موجود در 1417 cm^{-1} به ارتعاشات کششی C-H اختصاص دارد. پیک جذبی در 1032 cm^{-1} به ارتعاشات کششی C-O اختصاص دارد.

طیف FTIR نانوکامپوزیت زنیان / کیتوزان /

کربوکسی‌متیل نشاسته / کربن کوانتوم‌دات-منیزیم

بر اساس شکل ۲ پیک جذبی 3557 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش کششی گروه O-H است. پیک‌های موجود در طول موج $3900-600 \text{ cm}^{-1}$ نشان از وجود گروه‌های عاملی متصل به ترکیب‌های شیمیایی عصاره متانولی زنیان هستند. پیک در طول موج 1075 cm^{-1} گروه عاملی O-H متصل به ترکیب‌های الکلی (نوع اول) فنلی را نشان می‌دهد (۳۰). پیک در ناحیه 1548 cm^{-1} به ارتعاش خمشی NH (آمید) کیتوزان و C=O موجود در زنیان اختصاص داده می‌شود (۲۹، ۳۱).

مورفولوژی نانوکامپوزیت

شکل ۳ تصویر SEM نانوکامپوزیت زنیان / کیتوزان / کربوکسی‌متیل نشاسته / کربن کوانتوم‌دات-منیزیم را نشان می‌دهد. با توجه به این تصویر، نانوکامپوزیت دارای ساختار متراکم جامد است. سطح نانوکامپوزیت همگن به نظر می‌رسد، که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین کیتوزان، کربوکسی‌متیل نشاسته، کربن کوانتوم‌دات-منیزیم و اسانس زنیان است. قطر متوسط نانوکامپوزیت در محدوده $40/43-36/35$ نانومتر به دست آمد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش Real-time PCR

ژن‌ها در باکتری استریپتوکوکوس موتانس، ژن اختصاصی گونه بوده و بیان ژن‌های *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* با واکنش زنجیره-ای پلی‌مراز RT-PCR بررسی شد. از ژن sRNA ۱۶ به-منظور کنترل داخلی واکنش‌های PCR استفاده گردید. RNA از سلول با روش RNX-PLUS استخراج شد (Invitrogen, Korea). غلظت RNA با روش تعیین دانسیته نوری توسط دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. RNAهای استخراج شده در نمونه‌ها نشان داد نسبت جذب نوری $280/260$ در تمامی نمونه‌های تیمار شده و شاهد بالای $1/95$ با حداقل غلظت 500 نانوگرم بر میکرولیتر بوده و برای ادامه مراحل سنتز cDNA و Real time PCR مناسب هستند. برای ساخت cDNA از پروتکل سازنده کیت bio Fact (Korea bio Fact) استفاده شد. واکنش qPCR برای تجزیه و تحلیل کمی بیان ژن به روش سایبرگرین با دستگاه Corbett انجام گرفت. جهت انجام واکنش PCR، نمونه‌های cDNA به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شدند. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR شامل این موارد است: نمونه‌های cDNA الگو، DNA ase و RNA ase free، Taq DNA Polymerase Master Mix RED، Water Reverse Primer، Forward Primer. (Amplicon) و cDNA الگو استفاده شد. استفاده شد. طراحی آغازگر با استفاده از برنامه پرایمر ۳ انجام شد. خصوصیات ترمودینامیکی و شکل سه‌بعدی آغازگرها با نرم‌افزار ژن رانر ۵ بررسی شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد نظر مطابق جدول ۱ است.

تحلیل آماری

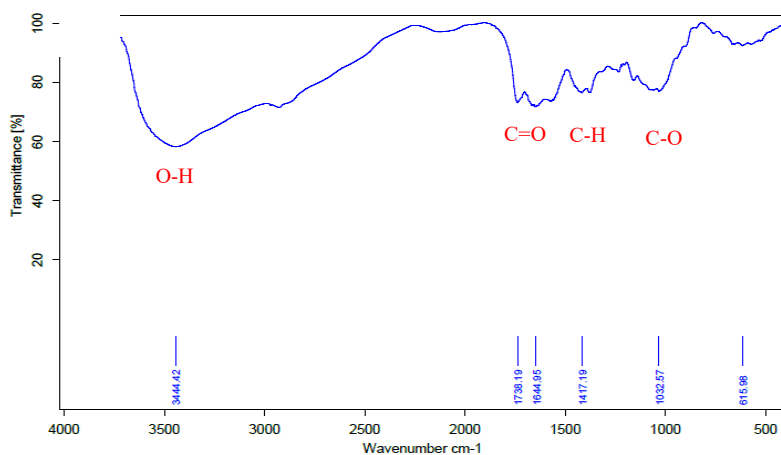
تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS²² صورت گرفت. ارزیابی تفاوت گروه‌های مورد آزمایش و شاهد توسط Graph pad Prism^{6,01} انجام شد. مقایسه تفاوت معنی‌دار بین مقادیر به دست آمده از بیان ژن‌های مورد نظر در سطح آماری $0/05$ توسط آزمون آماری ANOVA ارزیابی شد و مقادیر $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

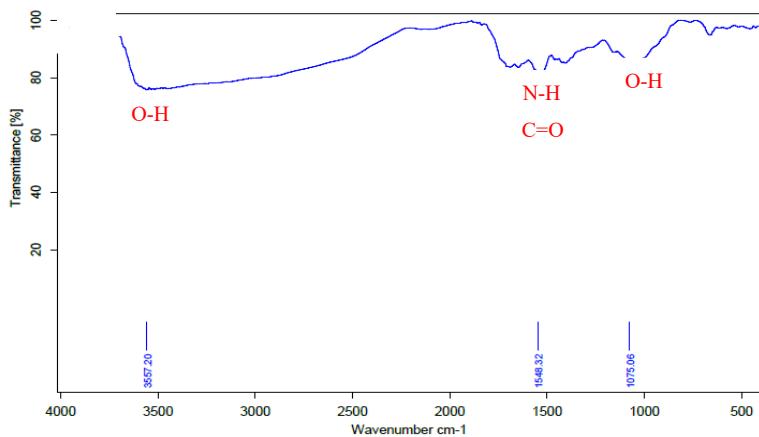
مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت

جدول ۱. توالی پرایمرها برای بررسی ژن‌ها در استرپتوکوکوس موتانس

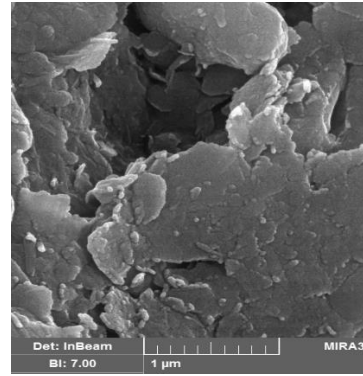
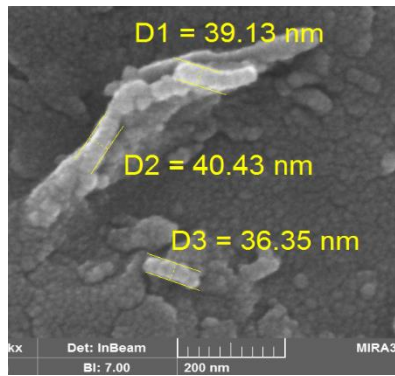
| Name | Forward or Reverse | Sequence (5' → 3') | طول محصول PCR |
|-----------------|--------------------|------------------------------|---------------|
| <i>gtfB</i> | F | AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT | ۹۶ |
| | R | ACGAACCTTGCCGTTATTGTCA | |
| <i>gtfC</i> | F | GGTTTAACGTCAAATTAGCTGTATTAGC | ۹۱ |
| | R | CTCAACCAACCGCCACTGTT | |
| <i>gtfD</i> | F | ACAGCAGACAGCAGCCAAGA | ۹۴ |
| | R | ACTGGGTTTGCTGCGTTTG | |
| <i>recA</i> | F | GCGTGCCTTGAAGTTTTATTCTTC | ۱۰۱ |
| | R | TGTTCCCCGGTTCCTTAAATT | |
| <i>16S rRNA</i> | F | CCTACGGGAGGCAGCAGTAG | ۷۵ |
| | R | CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA | |



شکل ۱. طیف FTIR نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکی متیل نشاسته/کربن کوانتوم‌دات-منیزیم



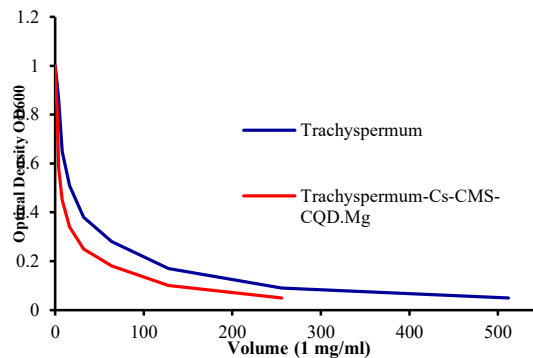
شکل ۲. طیف FTIR نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکی متیل نشاسته/کربن کوانتوم‌دات-منیزیم



شکل ۳. تصویر SEM نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم

نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم و اسانس زنیان در برابر باکتری بیماری زایی مولد پوسیدگی دندان، به ترتیب برابر ۰/۲۰۳ و ۰/۶۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر (شکل ۴) به دست آمد. جهت محاسبه MIC از فرمول زیر استفاده شد (۳۶):

$$\text{حجم کل محیط/غلظت نانوکامپوزیت} \times \text{زن نانوکامپوزیت} = \text{MIC}$$



شکل ۴. نمودار OD نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم و اسانس زنیان

نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم کاهش داشته (شکل ۵ ب)، که نشان دهنده اثر قوی این نانوکامپوزیت در سرکوب ژن *gtfC* و کاهش تشکیل بیوفیلم با حداقل تراکم باکتری ها داخل بدن است. می توان بیان کرد سرکوب ژن های *gtf* ممکن است یک روش جایگزین برای مختل شدن فرایند تشکیل بیوفیلم باشد. میزان بیان ژن های *gtfB*، *gtfD* در حضور نانو کامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته (شکل ۵ الف و ج) و نشان دهنده اثر منفی نانوکامپوزیت بر سلول های تحت درمان است. ارتباط معناداری در بیان ژن های *gtfB* و *gtfD* بین گروه های تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($P=0.187$, $gtfB$; $P=0.067$, $gtfD$).

تعیین میزان بازدارندگی نانوکامپوزیت روی تولید بیوفیلم باکتری استریپتوکوکوس موتانس

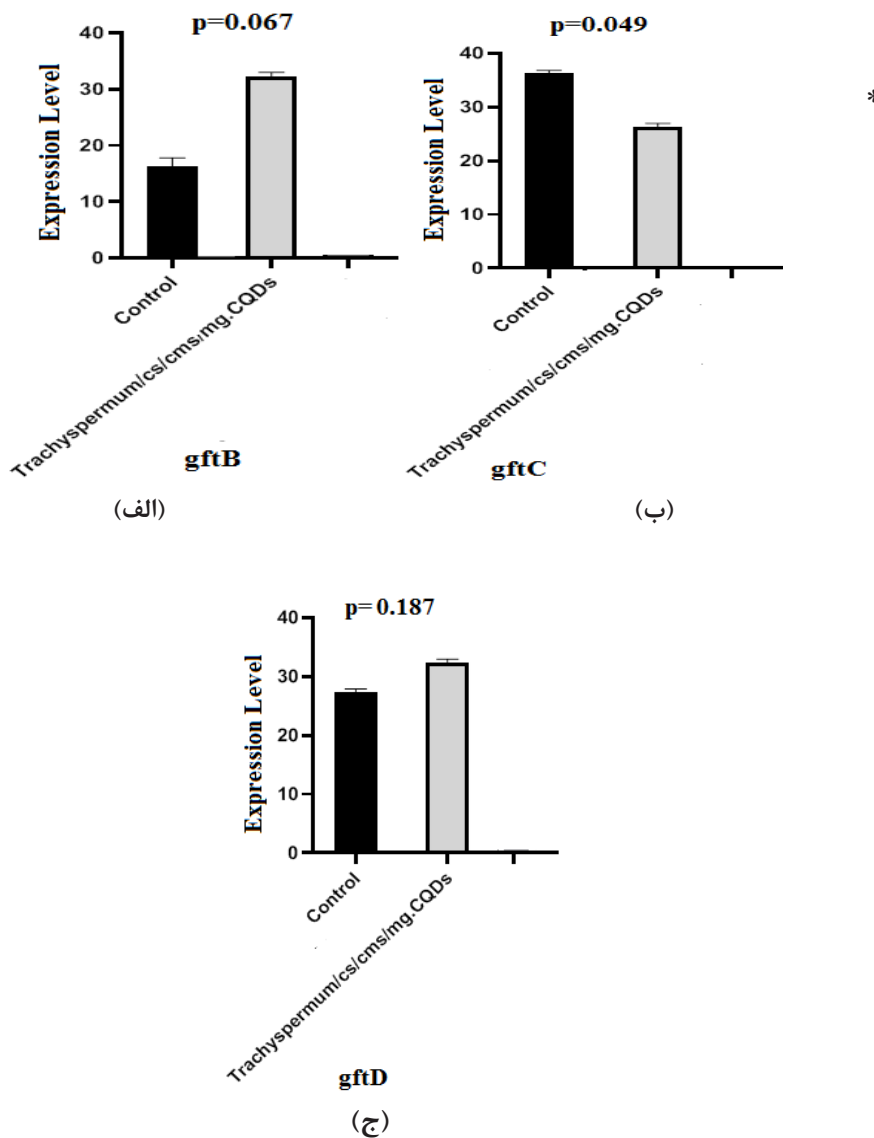
با خوانش پلیت توسط الیزا (Biotek-Cytation3-آمریکا) OD های به دست آمده در معادله ۱ قرار داده شد و نتایج حاصل از اثر بازدارندگی نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم و اسانس زنیان روی میزان تولید بیوفیلم باکتری استریپتوکوکوس موتانس روی مدل دندان در جدول ۲ نشان داده شده است. آزمایش ها در سه تکرار انجام شد و جذب ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. با توجه به نتایج مشاهده گردید اثر بازدارندگی نانوکامپوزیت نسبت به اسانس زنیان بیش تر بود (۲۷، ۳۲).

بررسی بیان ژن های *gtfB*، *gtfC*، *gtfD*

یافته های این تحقیق نشان داد ارتباط معناداری در بیان ژن *gtfC* بین گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P=0.049$). بیان ژن *gtfC* در سلول های تحت درمان با زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل-

جدول ۲. بازدارندگی نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم و اسانس زنیان

| نوع بیوفیلم | غلظت (میلی گرم بر میلی-لیتر) | نانوکامپوزیت |
|-------------|------------------------------|---|
| منفی | ۴ | زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل-نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم |
| قوی | ۲ | |
| قوی | ۱ | |
| قوی | ۰/۵ | |
| متوسط | ۴ | اسانس زنیان |
| قوی | ۲ | |
| قوی | ۱ | |
| قوی | ۰/۵ | |



شکل ۵. بررسی ارتباط معناداری: (الف) ژن *gftB*، (ب) ژن *gftC*، (ج) ژن *gftD* در بین سویه‌های استریپتوکوکوس موتانس تیمار شده با نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم.

نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن-کوانتوم دات-منیزیم تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های *gftD* و *gftB* نشان ندادند ($P=0.187$, $P=0.067$).

بر اساس نتایج، از بین ۳ ژن تحت مطالعه، فقط ژن *gftC* بر میزان بیان ژن را در سلول‌های تحت درمان با نانوکامپوزیت با تفاوت معنی‌داری نشان داد که نشان‌دهنده اثر قوی نانوکامپوزیت در کاهش میزان بیان ژن *gftC* در تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است. در حالی‌که تیمار با

بحث

به‌طور کلی در مسیر پیشرفت‌های جدید برای شناخت کامل پوسیدگی‌های دندانی و ریشه‌کنی کامل آن، یافتن راهکار-های جدید جهت کاهش پلاک‌های دندانی و عوامل ایجادکننده آن‌ها ضرورت دارد. ثابت شده است عوامل ضد میکروبی در برابر تشکیل بیوفیلم / استرپتوکوکوس موتانس راهبردهای کارآمدی هستند. ژن‌های *GTF* در تولید پلیمرهای گلوکان و اتصال باکتری‌ها به سطوح دارای اهمیت زیادی می‌باشند (۳۳). افزایش مقدار بیان آن‌ها در حالت بیوفیلم نسبت به فرم پلانکتونی این موضوع را تایید می‌کند. یوشیدا و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند میزان بیان ژن *gtfB* در حالت بیوفیلم چهار برابر نسبت به حالت پلانکتونیک افزایش می‌یابد (۳۴). استفاده از فناوری‌نانو در انتقال دارو به سلول‌ها می‌تواند برخی مشکلات پیشروی رسانش داروی گیاهی از جمله غیره‌دفع‌مند بودن و اکسیدپذیری بالا را برطرف نماید. طبق تحقیقات فعالیت ضد میکروبی و سایر فعالیت‌های بیولوژیکی اسانس زنیان کپسوله شده در نانوکامپوزیت با حضور اجزای فرار زیست فعال آن ارتباط مستقیم دارد (۳۵). در این تحقیق، MIC نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی‌متیل-نشاسته/کربن کوانتوم‌دات-منیزیم ۰/۳۰۳ میلی‌گرم بر میلی-لیتر، زنیان/کیتوزان/کربوکسی‌متیل نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم ۰/۱۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و اسانس زنیان خالص ۰/۶۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. به دلیل فرارپذیری و ناپایداری اسانس‌ها تحت شرایط محیطی، کپسوله کردن اسانس می‌تواند کارایی این ترکیبات را بهبود دهد. در واقع اسانس کپسوله شده در نانوکامپوزیت باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی زنیان/کیتوزان/کربوکسی-متیل نشاسته/کربن کوانتوم‌دات-منیزیم نسبت به نانو کامپوزیت فاقد اسانس و اسانس زنیان خالص شد. دو ماده کیتوزان و زنیان از خصوصیات ضدباکتری برخوردارند، اما استفاده هم‌زمان آن‌ها به صورت کپسول‌های نانومتری موجب شده اثر این مواد افزایش یافته و در جلوگیری از ایجاد، رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا بهبود یابد (۳۶). در مطالعه حسینعلی و همکاران تاثیر نانوذرات دی اکسید سیلیکون (SiO_2) و نانوکامپوزیت اکسیدروی / زئولیت ($\text{ZnO}/\text{Zeolite}$) بر بیان ژن‌های *ftf*، *gtfB*، *vicR*، *gbpB* و تشکیل بیوفیلم توسط باکتری استرپتوکوکوس موتانس بررسی گردید. طبق نتایج نانوذرات دی اکسید سیلیکون و نانوکامپوزیت اکسید روی / زئولیت ($\text{ZnO}/\text{Zeolite}$) قادر به مهار تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس بوده و با پتانسیل بالا در sub-MIC برای مهار تشکیل بیوفیلم / استرپتوکوکوس موتانس می‌توانند به عنوان عامل ضدباکتری جهت استفاده بالینی ایجاد شوند (۳۷).

در مطالعه Lapinska و همکاران خواص ضد میکروبی اسانس ترکیبی چند گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای دهان بررسی شد. طبق نتایج این مطالعه زنیان فعالیت ضدباکتری خوبی را ارائه داد که با محتوای سیترونلول آن مرتبط است (۳۸). Oskuee و همکاران تاثیر دانه‌ی زنیان را بر باکتری گرم مثبت / استافیلوکوکوس / اورئوس و باکتری گرم منفی / شریشیاکلی بررسی کردند و نتایج اثر مهارکنندگی گیاه زنیان علیه این دو باکتری و تاثیر بیشتر آن بر جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت را نشان دادند (۳۹). حضور کیتوزان در ترکیب سبب بالاتر رفتن اثر ضد میکروبی کامپوزیت می‌باشد. مکانیزم‌های مختلف از تعامل با باکتری برای کیتوزان ارائه شده است. یک مکانیسم احتمالی می‌تواند تعامل بین کیتوزان دارای بار مثبت در نانوکامپوزیت و بار منفی غشاء سلول باکتری باشد (۴۰). Koo و همکاران در مطالعه‌ای اثر مهار *Apigenin* را روی عدم تشکیل پلاک از طریق مهار ژن-های *gtf* در سویه استرپتوکوکوس موتانس UA159 بررسی کردند و نتایج قابل توجهی از مهار ژن‌های *gtfB* و *gtfC* دخیل در سنتز پلی‌ساکارید خارج سلولی گزارش کردند (۴۱). Passos و همکاران نیز فعالیت‌های ضد پوسیدگی *Libidibia ferrea*، گالیک‌اسید و اتیل‌گالات علیه استرپتوکوکوس موتانس در مدل بیوفیلم را مورد بررسی نمودند. طبق نتایج، اتیل‌گالات و گالیک‌اسید باعث کاهش گلوکان‌های محلول در قلیایی، سلول‌های زنده و بیان ژن‌های *gtfB*، *gtfC* و *gtfD* در بیوفیلم‌ها شدند (۴۲). از بین ۳ ژن تحت مطالعه، فقط میزان بیان ژن *gtfC* در سلول‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت با تفاوت معنی‌داری نشان داده شد که بیانگر اثر قوی نانوکامپوزیت در کاهش میزان بیان ژن *gtfC* در تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است. ارتباط معناداری در بیان ژن‌های *gtfB* و *gtfD*، در سلول‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. در مطالعات متعدد نشان داده شده برخی عصاره‌های گیاهی اثرات مهاری روی تشکیل بیوفیلم توسط سرکوب ژن خانواده *gtf* دارند. نتایج مطالعه Xu و همکاران نشان داد چای کاتیدین اپیکالاکتاجین گالات با سرکوب ژن‌های *C*، *D*، *gtfB* در مقادیر کم‌تر از MIC باعث مهار تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس موتانس می‌شود (۴۳). نتایج پژوهش یانو و همکاران نشان داد کریستال فنل حاصل از وتیس‌کویجنتیا می‌تواند نقش کلیدی در جلوگیری از اتصال استرپتوکوکوس موتانس داشته باشد، همچنین دارای پتانسیل دارویی برای کاهش پوسیدگی دندان به-صورت افزودنی مواد غذایی است (۴۴).

نتیجه گیری

در مطالعه اخیر اثر نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی-متیل نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم بر بیان ژن های *gtfD*, *gtfC*, *gtfB* / استرپتوکوکوس موتانس ارزیابی شد. ابتدا نانوکامپوزیت ساخته شد، سپس مورفولوژی، خصوصیات ساختاری و فعالیت ضد میکروبی آن بررسی گردید. اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت زنیان/ کیتوزان/ کربوکسی-متیل نشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم ۰/۱۶۸ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج بیان ژن ها نشان داد میزان بیان ژن *gtfC* در سلول های تیمار شده با نانوکامپوزیت کاهش داشته است و این نانوکامپوزیت داری اثر قوی در سرکوب ژن *gtfC* و کاهش تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است.

1. Denisa F, Mihai S, Anton F, Ecaterina A, Mehmet Y, Omer BA. Drug Delivery Systems for Dental Applications. *Current Organic Chem.* 2017; 21(1):64-73.
2. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics N.S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature reviews Microbiology.* 2011; 8(7):471-480.
3. Irague R, Tarquis L, André I, Moulis C, Morel S, Monsan P. Combinatorial engineering of dextransucrase specificity. *PloS One.* 2013; 8(10): e77837
4. Biswas S, Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity.* 2005; 73(10): 6923-34.
5. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyl transferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Research.* 2011; 45(1):69-86.
6. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2002; 46(5):1302-1309.
7. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products.* 2014; 62:250-264.
8. Othman AH, Mehdawi N, Abu Taha A, Hamed EM, Al-Nuri MA, Hussein AS. Synthesis and antibacterial activity of novel curcumin derivatives containing heterocyclic moiety. *Iranian journal pharmaceutical research : IJPR.* 2013; 12(1):47-56.
9. Chavez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Anti microbial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms. *Applied and environmental microbiology.* 2011; 77(11):3892-3895.
10. Narang RS, Narang J.K. Nano medicines for dental applications-scope and future perspective. *International journal pharmaceutical investigation.* 2015; 5(3):121-123.
11. ilpizewska K, Antosik AK, Szychaj T. Novel hydrophilic carboxymethyl starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrate polymers.* 2015; 128:82-89.
12. Nabais T, Brouillet F, Kyriacos S, Mroueh M, Amores da Silva P, Bataille B. High-amylose carboxymethyl starch matrices for oral sustained drug-release: in vitro and in vivo evaluation .*European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik.* 2007; eV 65(3): 371-378.
13. Georgakilas V, Perman J, Tucek J, Zboril R. Classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. *Chem Rev.* 2015; 115:4822.
14. Yu J, Zhao Z, Sun J, Geng C, Bu Q, Wu D, et al. Electrospinning Highly Concentrated Sodium Alginate Nanofibres without Surfactants by Adding Fluorescent Carbon Dots. *Nanomaterials.* 2020;10(3):565.
15. Kausar A. Polymer/carbon-based quantum dot nanocomposite: forthcoming materials for technical application. *Journal of Macromolecular Science, Part A, Pure and Applied Chemistry.* 2019, DOI: 10.1080/10601325, 2019, 15786144.
16. Huang C, Dong H, Su Y, Wu Y, Narron R, Yong Q. Synthesis of Carbon Quantum Dot Nanoparticles Derived from Byproducts in Bio-Refinery Process for Cell Imaging and in Vivo Bioimaging. *Nanomaterials.* 2019; 9: 387; doi:10.3390/nano9030387.

17. Faleiro ML. The mode of antibacterial action of essential oils, in *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, A. Méndez-Vilas, 2011; Ed., 1143-1156, Brown Walker Press, USA.
18. Zarshenas MM, Moein M, Samani SM, Petramfar P. An Overview on Ajwain (*Trachyspermum ammi*) Pharmacological Effects; Modern and Traditional. *J Nat Remedies*. 2014; 14(1): 95-105.
19. Haghroolsadat BF, Vahidi AR, Azimzadeh M, Kalantar SM, Bernard F, Hokmollahi F. Chemical Assessment of Active Ingredients and Anti-Oxidant Effects of *Trachyspermum Copticum*'s Seeds harvested in Yazd Province. *J Rafsanjan Univ Med Sci*. 2012; 11(3): 197-206
20. Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci*. 2011; 1:1806-1815.
21. Saboktakin MR, Tabatabaie RM, Maharramov A, Ramazanov MA. Synthesis and in vitro evaluation of carboxymethyl starch-chitosan nanoparticles as drug delivery system to the colon. *International j biological macromolecules*. 2011; 48(3): 381-385.
22. Saikia C, Hussain A, Ramteke A, Sharma HK, Maji T.K. Carboxymethyl starch chitosan-coated iron oxide magnetic nanoparticles for controlled delivery of isoniazid. *J microencapsulation*. 2015; 32(1):29-39.
23. Geoffrey A, McKay SB, Francis F, Arhin T, Adam K, Belley G. Time-kill kinetics of oritavancin and comparator agents against *staphylococcus aureus* *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63:1191-1199.
24. Maurya A, Chauhan P, Mishra A, Pandey A.K. Surface Functionalization of TiO₂ with Plant Extracts and their Combined Antimicrobial Activities Against *E. faecalis* and *E. Coli*. *Life science Global*. 2012; 1:43-51.
25. Noorani B, Tabandeh F, Yazdian F, Soheili ZS, Shakibaie M, Rahmani S.h. Thin natural gelatin/chitosan nanofibrous scaffolds for retinal pigment epithelium cells. *Int J Polymeric Mater*. 2018; 67: 754-763.
26. Johanna J, Leena N, Lea-Ann K, Calum J, Andrew S, Tim J. Identification of a Secreted Cholesterol-Dependent Cytolysin (Mitylsin) from *Streptococcus mitis*. *J Bacteriolo*. 2007; 2: 627-632.
27. Telma B, Louis G, Denise P, Daniel G. Subinhibitory Concentrations of Triclosan Promote *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Adherence to Oral Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 2014; 9:1-6.
28. Chandra S, Pradhan S, Mitra Sh, Patra P, Bhattacharya A. a Panchanan Pramanikb and Arunava Goswamia, High throughput electron transfer from carbon dots to chloroplast: a rationale of enhanced photosynthesis. *Nanoscale*. 2014; 6: 3647.
29. Park BS, Kim JG, Kim MR, Lee SE, Takeoka GR, Oh KB. Curcuma longa L. constituents inhibit sortase A and *Staphylococcus aureus* cell adhesion to fibronectin. *J Agricultural Food Chemi*. 2005; 53: 9005-9009.
30. Pavia D, Kriz GS, Vyvyan J.A. *Introduction to Spectoroscopy*. Cengage Learning. 2008.
31. Bahreloloum Tabatabai M, Mirjalili M, Yazdiyan F, Hekmatimoghaddam Sh. Design and Production of A Wound Cover Containing Essence of Ajwain (*Trachyspermum*) by Nanoliposome Technique, and Assessment of Its Physical, Chemical, Antibacterial and Cytotoxicity Properties. *J Arak Univ Med Sci*. 2019; 22(1).
32. 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; 40:175-179.

33. Yano A, Kikuchi S, Takahashi T, Kohama K, Yoshida Y. Inhibitory effects of the phenolic fraction from the pomace of *Vitis coignetiae* on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology*. 2012; 57(6):711-919.
34. Yoshida A, Kuramitsu H. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a *gtfB* promoter-green fluorescent protein (*PgtfB: gfp*) construct to monitor development. *Microbiology*. 2002; 148(Pt 1): 3385-3394.
35. Stojiljkovic J, Trajchev M, Nakov D, Petrovska M. Antibacterial activities of rosemary essential oils and their components against pathogenic bacteria. *Adv Cytol Pathol*. 2018; 3(4):93-96.
36. Hadian M, Rajaei A, Mohsenifar A, Abatabaei M.T. *LWT*. 2017; 84: 394-401.
37. Piri Dogaheh H, Jafari AR, Arzanloo M, Jedi F, Hossein Ali Z. The effect of Silicon dioxide nanoparticle and Zinc dioxide/Zeolite nanocomposite on *ftf*, *gtfB*, *vicR*, *gbpB* genes and biofilms formation by *Streptococcus mutans*, Master (thesis) Ardabil Univ Med Sci. 2021.
38. Lapinska B, Szram A, Zarzycka B, Grzegorzczak J, Hardan L, Sokolowski J, Lukomska-Szymanska M. An in Vitro Study on the Antimicrobial Properties of Essential Oil Modified Resin Composite against Oral Pathogens. *Materials*. 2020; 13: 4383. doi:10.3390/ma13194383.
39. Kazemi Oskuee R, Behravan J, Ramezani M. Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran. *Avicenna J Phytomedicine*. 2011; 1(2):83-90.
40. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2005; 33(4):248-255.
41. Koo H, Seils J, Abranches J, Burne RA, Bowen WH, Quivey RG. Influence of apigenin on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(2):542-546.
42. Passos MR, Almeida R, Oliveira Lima B, Rodrigues JZ, deMacêdo Neres N. *J Ethnopharmacol*. 2021; 274:114059.
43. Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gtf* genes. *Archives of oral biology*. 2012; 57(6):678-683.
44. Yano A, Kikuchi S, Takahashi T, Kohama K, Yoshida Y. Inhibitory effects of the phenolic fraction from the pomace of *Vitis coignetiae* on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology*. 2012; 57(6):711-919.