



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 استرپتوکوکوس موتانس شکوفه مذهب جعفری^۱، فاطمه یزدیان^{۱*}، فرزانه حسینی^{۱*}، بهنام راسخ^۲

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 *استرپتوکوکوس 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 *استرپتوکوکوس 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 *استرپتوکوکوس 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*، *استرپتوکوکوس موتانس*، نانوکامپوزیت، بیوفیلم دندان، Jau 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 دندان می کنند (۲). در پلاک دندان 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). کربن کوانتوم دات (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 کوانتوم دات 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 میکروارگانیسم‌ها است. طبق تحقیقات اکثر باکتری‌های جداسازی شده متعلق به جنس */ستریتوکوکوس* بوده و */ستریتوکوکوس موتانس* عامل اصلی در پوسیدگی دندان است (۴). عوامل اصلی پاتوژنی */ستریتوکوکوس 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 */ستریتوکوکوس موتانس* است، زیرا */ستریتوکوکوس موتانس* توانایی متابولیسم ساکاروز را بهتر از سایر باکتری‌های موجود در دهان دارا بوده و ساکاروز را به اسید لاکتیک و گلوکان نامحلول در آب تبدیل می‌کند. گلوکان نامحلول از عوامل اصلی اتصال باکتری به دندان و ایجاد پلاک‌دندانی می‌باشد و به‌وسیله گلیکوزیل-ترانسفرازها^۱ (*gtf*) از ساکاروز سنتز می‌گردد. این فرآیند بیوشیمیایی منجر به ثابت شدن */ستریتوکوکوس موتانس* به سطح دندان و ایجاد پلاک‌دندان است. */ستریتوکوکوس 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 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 */ستریتوکوکوس 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 */ستریتوکوکوس موتانس* به‌دلیل افزایش

^۲ Carbon quantum dots^۳ *Trachyspermum*^۱ Glycosyltransferase (*gtf*)

مواد و روش ها

استرپتوکوکوس موتانس ATCC 35668 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (IROST) خریداری شد. کیتوزان (low M_w)، دی آمونیوم هیدروژن سیترات از شرکت مرک تهیه شدند. دندان های سالم از دانشکده دندان پزشکی دانشگاه تهران تهیه و توسط دستگاه برش Mecatome مدل Presi فرانسه به اندازه های برابر (۳ میلی متر) برش داده شد.

جهت تعیین خصوصیات ساختاری و مورفولوژی نانوکامپوزیت، اندازه گیری متوسط سایز ذرات از دستگاه های FT-IR مدل ۱۰، ۰۳، ۰۶، شرکت Perkin Elmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل KYKY_EM۲۲۰۰، اسپکتروفوتومتر مدل PG Instrument، دستگاه انکوباتور مدل Binder و شیکرانکوباتور مدل IKA و دستگاه سانتریفیوژ مدل Sigma استفاده شد.

آماده سازی نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل-نشاسته

نشاسته طی فرآیند اتری شدن در ایزوپروپانول/آب به کربوکسی متیل نشاسته تبدیل شد (۲۱). نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل نشاسته با استفاده از روش ژلاتین یونی تهیه شدند. رقت های مختلف کربوکسی متیل نشاسته (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ وزنی٪) با حل کردن پودر کربوکسی متیل نشاسته در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه دمای 50°C توسط هم زن مغناطیسی (۵۰۰ rpm) تهیه شد؛ رقت های مختلف کیتوزان (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ وزنی٪) با انحلال پودر کیتوزان در ۱۰ میلی لیتر محلول اسید استیک ۰/۵٪ (حجمی/حجمی) در دمای اتاق توسط هم زن مغناطیسی (۷۰۰ rpm) تهیه شد. محلول کیتوزان توسط سدیم هیدروکسید با رقت ۱ مولار تا pH ۵ تنظیم شد، ۱۰ میکرو لیتر توئین ۲۰ به محلول ها به عنوان 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 دی آمونیوم هیدروژن سیترات به عنوان منبع کربن به وسیله آب مقطر در حجم ۷۵ میلی لیتر در دمای 25°C به صورت کامل حل شد، سپس ۱ گرم MgCl_2 به عنوان منبع فلزی اضافه نموده تا به صورت کامل حل شود. مقداری سدیم هیدروکسید به عنوان پایدار کننده به محلول فوق افزوده تا محلول همگن به دست 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 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. جهت پودر کردن نمونه از فریزدرایر استفاده گردید.

سنتز نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم

ابتدا ۰/۱۵ گرم کربن کوانتوم دات-منیزیم به دست آمده، در بشر ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۳۰ میلی لیتر آب دیونیزه در حال هم زدن، پخش شد. نسبت ۳:۱ از محلول های نانوذرات کیتوزان و کربوکسی متیل نشاسته 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 سانتریفوژ شد، و توسط آب دیونیزه 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.

اسانس گیری گیاه زنیان

اسانس روغنی نمونه گیاه خشک به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر (مدل laborota 4003 شرکت Heidolph آلمان) جداسازی شد. در هر بار اسانس گیری، ۱۰۰ گرم بخش های هوایی گیاه به صورت پودر شده در بالن ۱۰۰۰ میلی لیتر 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، جمع آوری شد و پس از آب گیری با سولفات سدیم و حل شدن در حلال دی متیل سولفوکسید اسانس گیاه مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

سنتز نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل-نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم

اسانس زنیان به مقدار ۰/۵٪ به محلول پایه نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/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

تعامل 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-سنگ 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 $4000-450\text{ cm}^{-1}$ مشاهده شد. ویژگیهای مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت فریزدرای شده با استفاده از SEM با قدرت ۱۰۰ وات بررسی گردید (۲۵).

کشت میکروارگانیزم

چند کلنی از رشد یک روزه 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 ۱۵۰ rpm 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} (۰/۵-۰/۶) قرار گیرند. مقدار ۱۵ میلی لیتر محیط را مدت ۱۸ دقیقه در دمای 4°C و ۴۰۰۰ rpm 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 ۱۵۰ rpm 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، همچنین 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} کمتر 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^۴ 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 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:

$ODc = \text{چاهکهای کنترل منفی } OD \text{ میانگین} + (3 \times \text{انحراف معیار چاهکهای کنترل منفی})$
بعد از محاسبه ODc یا کات اف، OD چاهکهای مورد مطالعه طبق موارد زیر دسته بندی شد.

⁴ Tryptic soy broth

$OD > 4 \times OD_c$	بیوفیلیم قوی
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	بیوفیلیم متوسط
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	بیوفیلیم ضعیف
$OD \leq OD_c$	بیوفیلیم منفی

طیف سنجی 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 / کربوکسی متیل

نشاسته / کربن کوانتوم دات-منیزیم مطابق شکل ۱، پیک جذبی در محدوده 3446 cm^{-1} به ارتعاش کششی گروه O-H اشاره دارد. پیک جذبی گسترده در محدوده $3500-3200 \text{ cm}^{-1}$ 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 می شود (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 /

کربوکسی متیل نشاسته / کربن کوانتوم دات-منیزیم بر اساس شکل ۲ پیک جذبی 3557 cm^{-1} نشان دهنده ارتعاش کششی گروه O-H است. پیک های موجود در طول موج $3900-600 \text{ cm}^{-1}$ نشان از وجود گروه های عاملی متصل به ترکیب های شیمیایی عصاره متانولی زنیان هستند. پیک در طول موج 1075 cm^{-1} گروه عاملی O-H متصل به ترکیب های الکلی (نوع اول) فنلی را نشان می دهد (۳۰). پیک در ناحیه 1548 cm^{-1} به ارتعاش خمشی NH (آمید) کیتوزان و C=O موجود در زنیان اختصاص داده می شود (۳۱، ۲۹).

مورفولوژی نانوکامپوزیت

شکل ۳ تصویر SEM نانوکامپوزیت زنیان / کیتوزان / کربوکسی متیل نشاسته / کربن کوانتوم دات-منیزیم را نشان می دهد. با توجه به این تصویر، نانوکامپوزیت دارای ساختار متراکم جامد است. سطح نانوکامپوزیت همگن به نظر می رسد، که نشان دهنده سازگاری خوب بین کیتوزان، کربوکسی متیل نشاسته، کربن کوانتوم دات-منیزیم و اسانس زنیان است. قطر متوسط نانوکامپوزیت در محدوده $36/35-40/43$ نانومتر به دست آمد.

بررسی بیان ژن ها به روش Real-time PCR

ژن ها در باکتری / استرپتوکوکوس موناس، ژن اختصاصی گونه بوده و بیان ژن های *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* با واکنش زنجیره ای پلی مراز RT-PCR بررسی شد. از ژن sRNA ۱۶ به منظور کنترل داخلی واکنش های 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 اندازه گیری شد. RNA های استخراج شده در نمونه ها نشان داد نسبت جذب نوری $280/260$ در تمامی نمونه های تیمار شده و شاهد بالای $1/95$ با حداقل غلظت ۵۰۰ 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، نمونه های cDNA به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شدند. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR شامل این موارد است: نمونه های 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 سه بعدی آغازگرها با نرم افزار ژن رانر ۵ بررسی شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژن های مورد نظر مطابق جدول ۱ است.

تحلیل آماری

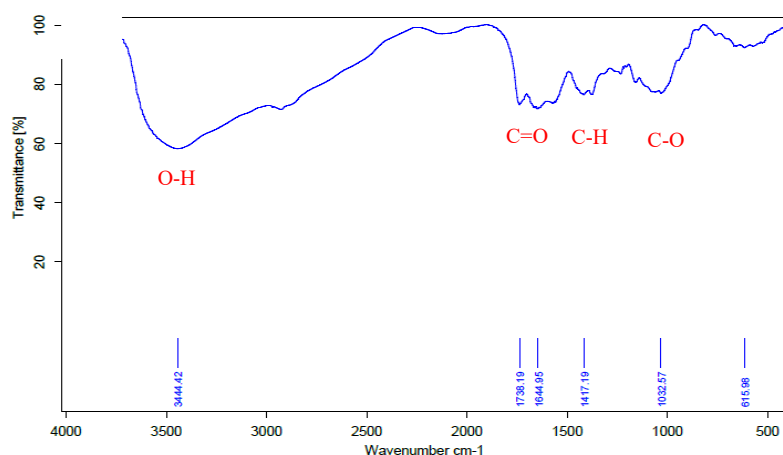
تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS²² صورت گرفت. ارزیابی تفاوت گروه های مورد آزمایش و شاهد توسط Graph pad Prism^{6,01} انجام شد. مقایسه تفاوت معنی دار بین مقادیر به دست آمده از بیان ژن های مورد نظر در سطح آماری ۰/۰۵ توسط آزمون آماری ANOVA ارزیابی شد و مقادیر $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

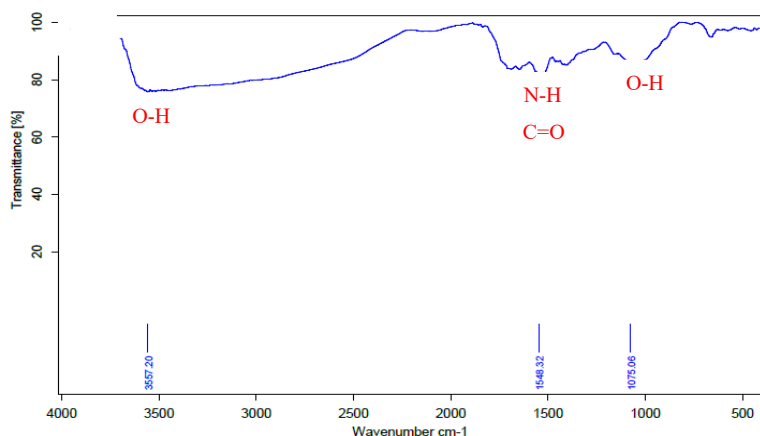
مشخصه یابی نانوکامپوزیت

جدول ۱. توالی پرایمرها برای بررسی ژن‌ها در استرپتوکوکوس موناس

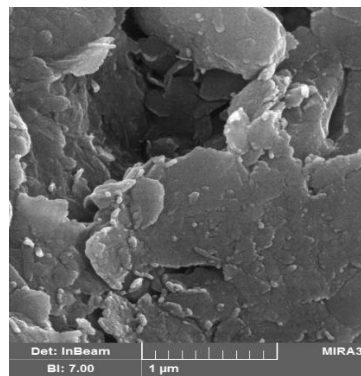
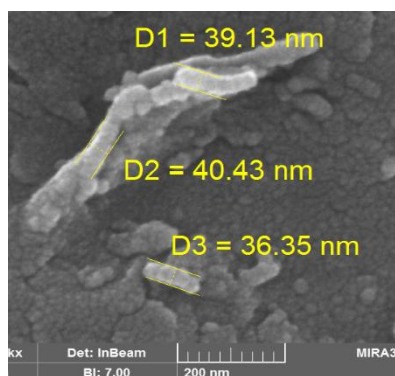
Name	Forward or Reverse	Sequence (5' → 3')	طول محصول PCR
<i>gtfB</i>	F	AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT	۹۶
	R	ACGAACCTTGCCGTTATTGTCA	
<i>gtfC</i>	F	GGTTTAACGTCAAAATTAGCTGTATTAGC	۹۱
	R	CTCAACCAACCGCCACTGTT	
<i>gtfD</i>	F	ACAGCAGACAGCAGCCAAGA	۹۴
	R	ACTGGGTTTGCTGCGTTTG	
<i>recA</i>	F	GCGTGCCTTGAAGTTTATTCTTC	۱۰۱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



شکل ۱. طیف FTIR نانوکامپوزیت کیتوزان/کربو کسی متیل نشاسته/ کربن کوانتوم دات-منیزیم



شکل ۲. طیف FTIR نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربو کسی متیل نشاسته/ کربن کوانتوم دات-منیزیم



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

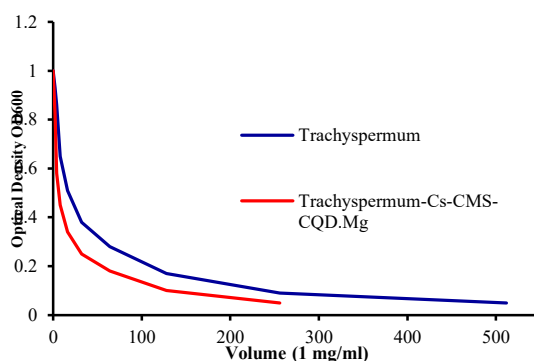
نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم و اسانس زنیان در برابر باکتری بیماری زایی مولد پوسیدگی دندان، به ترتیب برابر ۰/۲۰۳ و ۰/۶۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر (شکل ۴) به دست آمد. جهت محاسبه MIC از فرمول زیر استفاده شد (۳۶):

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

بررسی خاصیت ضد میکروبی با تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) نانوکامپوزیت روی باکتری

استرپتوکوکوس موتانس

MIC کمترین غلظتی است که در آن نانوکامپوزیت به طور کامل رشد باکتری مورد آزمایش را مهار کند. نتایج حاصل از بررسی MIC نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل-



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 ($P=0.187$ for *gtfB*; $P=0.067$ for *gtfD*).

تعیین میزان بازدارندگی نانوکامپوزیت روی تولید بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس

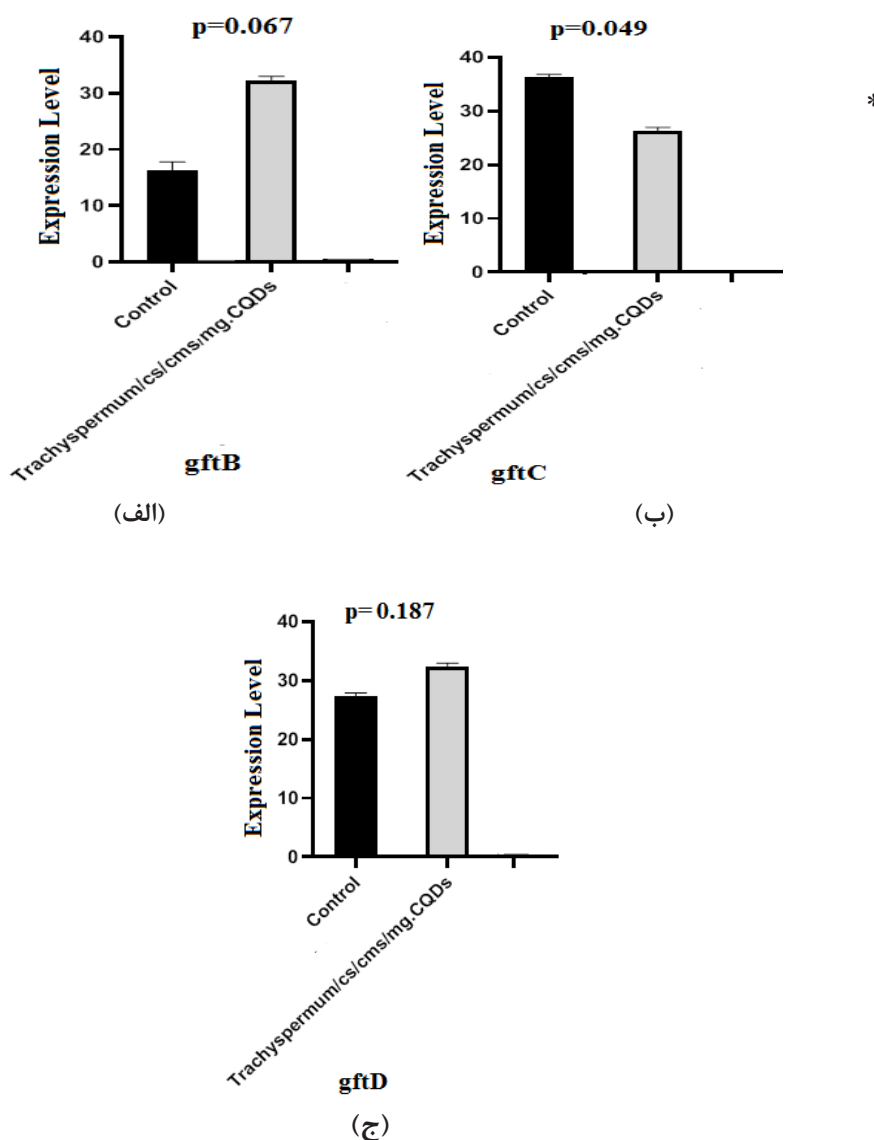
با خوانش پلیت توسط الیزا (3-Cytation-Biotek-آمریکا) OD های به دست آمده در معادله ۱ قرار داده شد و نتایج حاصل از اثر بازدارندگی نانوکامپوزیت زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم و اسانس زنیان روی میزان تولید بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس روی مدل دندان در جدول ۲ نشان داده شده 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 (۳۲، ۲۷).

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 سویه های استریتوکوکوس 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 معنی داری در بیان ژن های *gftD* و *gftB* نشان ندادند ($P=0.187$, $P=0.067$).

بر اساس نتایج، از بین ۳ ژن تحت مطالعه، فقط ژن *gftC* میزان بیان ژن را در سلول های تحت درمان با نانوکامپوزیت با تفاوت معنی داری نشان داد که نشان دهنده اثر قوی نانوکامپوزیت در کاهش میزان بیان ژن *gftC* در تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است. در حالی که تیمار با

بحث

به طور کلی در مسیر پیشرفت های جدید برای شناخت کامل پوسیدگی دندان و ریشه کنی کامل آن، یافتن راهکار های جدید جهت کاهش پلاک های دندان و عوامل ایجاد کننده آن ها ضرورت دارد. ثابت شده است عوامل ضد میکروبی در برابر تشکیل بیوفیلم / استرپتوکوکوس موتانس راهبردهای کارآمدی هستند. ژن های *GTF* در تولید پلیمرهای گلوکان و اتصال باکتری ها به سطوح دارای اهمیت زیادی می باشند (۳۳). افزایش مقدار بیان آن ها در حالت بیوفیلم نسبت به فرم پلانکتونی این موضوع را تایید می کند. یوشیدا و همکاران در مطالعه ای نشان دادند میزان بیان ژن *gtfB* در حالت بیوفیلم چهار برابر نسبت به حالت پلانکتونیک افزایش می یابد (۳۴). استفاده از فناوری نانو در انتقال دارو به سلول ها می تواند برخی مشکلات پیشروی رسانش داروی گیاهی از جمله غیرهذفمند بودن و اکسید پذیری بالا را برطرف نماید. طبق تحقیقات فعالیت ضد میکروبی و سایر فعالیت های بیولوژیکی اسانس زنیان کپسوله شده در نانوکامپوزیت با حضور اجزای فرار زیست فعال آن ارتباط مستقیم دارد (۳۵). در این تحقیق، MIC نانوکامپوزیت کیتوزان/کربوکسی متیل-نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم ۰/۳۰۳ میلی گرم بر میلی-لیتر، زنیان/کیتوزان/کربوکسی متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم ۰/۱۶۸ میلی گرم بر میلی لیتر و اسانس زنیان خالص ۰/۶۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. به دلیل فرار و ناپایداری اسانس ها تحت شرایط محیطی، کپسوله کردن اسانس می تواند کارایی این ترکیبات را بهبود دهد. در واقع اسانس کپسوله شده در نانوکامپوزیت باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی زنیان/کیتوزان/کربوکسی-متیل نشاسته/کربن کوانتوم دات-منیزیم نسبت به نانو کامپوزیت فاقد اسانس و اسانس زنیان خالص شد. دو ماده کیتوزان و زنیان از خصوصیات ضد باکتری برخوردارند، اما استفاده هم زمان آن ها به صورت کپسول های نانومتری موجب شده اثر این مواد افزایش یافته و در جلوگیری از ایجاد، رشد و تکثیر عوامل بیماری زا بهبود یابد (۳۶). در مطالعه حسینی و همکاران تاثیر نانوذرات دی اکسید سیلیکون (SiO_2) و نانوکامپوزیت اکسیدروی / زئولیت ($\text{ZnO}/\text{Zeolite}$) بر بیان ژن های *ftf*، *gtfB*، *vicR* و *gbpB* در 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 می توانند به عنوان عامل ضد باکتری جهت استفاده بالینی ایجاد شوند (۳۷).

در مطالعه Lapinska و همکاران خواص ضد میکروبی اسانس ترکیبی چند گیاه در برابر عوامل بیماری زای دهان بررسی شد. طبق نتایج این مطالعه زنیان فعالیت ضد باکتری خوبی را ارائه داد که با محتوای سیترونلول آن مرتبط است (۳۸). Oskuee و همکاران تاثیر دانه زنیان را بر باکتری گرم مثبت / استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی / شریشیاکلی بررسی کردند و نتایج اثر مهار کنندگی 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 می باشد. مکانیزم های مختلف از تعامل با باکتری برای کیتوزان ارائه شده است. یک مکانیسم احتمالی می تواند تعامل بین کیتوزان دارای بار مثبت در نانوکامپوزیت و بار منفی غشاء سلول باکتری باشد (۴۰). Koo و همکاران در مطالعه ای 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 ژن های *gtfB* و *gtfC* دخیل در سنتز پلی ساکارید خارج سلولی گزارش کردند (۴۱). Passos و همکاران نیز فعالیت های ضد پوسیدگی *Libidibia ferrea*، گالیک اسید و اتیل گالات علیه استرپتوکوکوس موتانس در مدل بیوفیلم را مورد بررسی نمودند. طبق نتایج، اتیل گالات و گالیک اسید باعث کاهش گلوکان های محلول در قلیایی، سلول های زنده و بیان ژن های *gtfB*، *gtfC* و *gtfD* در بیوفیلم ها شدند (۴۲). از بین ۳ ژن تحت مطالعه، فقط میزان بیان ژن *gtfC* در سلول های تیمار شده با نانوکامپوزیت با تفاوت معنی داری نشان داده شد که بیانگر اثر قوی نانوکامپوزیت در کاهش میزان بیان ژن *gtfC* در تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است. ارتباط معناداری در بیان ژن های *gtfB* و *gtfD*، در سلول های تیمار شده با نانوکامپوزیت نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. در مطالعات متعدد نشان داده شده برخی عصاره های گیاهی اثرات مهار روی تشکیل بیوفیلم توسط سرکوب ژن خانواده *gtf* دارند. نتایج مطالعه Xu و همکاران نشان داد چای کاتیدین اپیکالاکتاجین گالات با سرکوب ژن های *D*، *C*، *gtfB* در مقادیر کمتر از MIC باعث مهار تشکیل بیوفیلم توسط / استرپتوکوکوس موتانس می شود (۴۳). نتایج پژوهش یانو و همکاران نشان داد کریستال فنل حاصل از ویتس کویجنیتا می تواند 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-متیلنشاسته/کربن کوانتوم-دات-منیزیم بر بیان ژن های *gtfD*, *gtfC*, *gtfB* /ستریپتوکوکوس 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-متیلنشاسته/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 دارای اثر قوی در سرکوب ژن *gtfC* و کاهش تشکیل بیوفیلم میکروبی دندان است.

منابع

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 dextranucrase 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, Karuppaiyl 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. Haghiroalsadat 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 (Mitilysin) from *Streptococcus mitis*. *J Bacteriol*. 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 Spectroscopy. Cengage Learning. 2008.
31. Bahreloloum Tabatabai M, Mirjalili M, Yazdian 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 (Pg $_{gtfB}$: 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.