

Evaluation of the anti-viral effects of combinations of cetylpyridinium chloride and nano-silver colloid on herpes simplex virus type 1

Reza Eftekhari Ashtiani¹, Yasgol Kalbasi², Mojtaba Hamidi-Fard³, Elaheh Beyabanaki^{4*}

1- Assistant Professor, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Dentist, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Virology Research Group, Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 7 Oct 2025
Accepted: 21 Jan 2026
Published: 27 Jan 2026

Corresponding Author:
Elaheh Beyabanaki

Department of Prosthodontics,
School of Dentistry, Shahid Beheshti
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran

(Email: e.beyabanaki@gmail.com)

Abstract

Background and Aims: Despite documentation on the antiviral effects of cetylpyridinium chloride (CPC) and nano-silver colloid (Ag) on herpes simplex virus type 1, the synergistic effect of these two materials at different concentrations is unknown. This study aimed to evaluate the antiviral effect of various concentration combinations of cetylpyridinium chloride and nano-silver colloid on herpes simplex virus type 1.

Materials and Methods: This laboratory study conducted at the molecular virology department of Iran Pasteur Institute in the year 1400. After testing the cytotoxicity of different concentrations of CPC and Ag, the disinfecting effect of safe concentrations of each substance individually and also in the form of three compounds, was examined on the cells infected with herpes simplex virus type 1. The study groups included groups 1 to 6 with 0.01 µg/ml to 1000 µg/ml of Ag, groups 7 to 12 with 0.1 µg/ml to 10000 µg/ml of CPC, and combination groups of Ag 10 µg/ml + CPC 10 µg/ml (G13), Ag 10 µg/ml + CPC 1 µg/ml (G14), and Ag 1 µg/ml + CPC 10 µg/ml (G15). Data were analyzed using One-Way ANOVA and Games-Howell and Tukey HSD pair comparison tests at a significance level of 0.05.

Results: Based on the MTT test and the cell viability exposed to herpes simplex virus type 1, the highest number of living cells belonged to the 10 µg/ml Ag group, followed by 10 µg/ml CPC, 10 µg/ml Ag + 10 µg/ml CPC, 1 µg/ml Ag + 10 µg/ml CPC, and 10 µg/ml Ag + 1 µg/ml CPC groups. In terms of antiviral effect, there was a significant difference between group 1 and groups 3, 4, 5, 6, and 10 ($P < 0.001$), between groups 2 and 3 ($P = 0.40$), between groups 2 and 4 ($P = 0.041$), between group 2 and groups 5 and 6 ($P = 0.035$), between group 7 and groups 10, 11, and 12 ($P < 0.001$), between group 8 and groups 10, 11, and 12 ($P < 0.001$), and between group 9 and groups 10, 11, and 12 ($P < 0.001$). Among combination groups, the most antiviral effect and the least cell toxicity was found in the 10 µg/ml Ag + 10 µg/ml CPC group, while the least antiviral effect was observed in the Ag 10 µg/ml + CPC 1 µg/ml group.

Conclusion: The highest cell viability rate belonged to the 10 µg/ml Ag group, followed by the 10 µg/ml CPC group, and their combination resulted in a reduction of its effect in this area. The antiviral effect of these materials individually was greater than in their combined state. Additionally, the most antiviral effect and the least cell toxicity was found in the 10 µg/ml Ag + 10 µg/ml CPC group among the combination groups.

Keywords: Cetylpyridinium chloride, Colloidal silver, Herpes simplex virus type 1

Cite this article as: Eftekhari Ashtiani R, Kalbasi Y, Hamidi-Fard M, Beyabanaki E. Evaluation of the anti-viral effects of combinations of cetylpyridinium chloride and nano-silver colloid on herpes simplex virus type 1. J Dent Med-TUMS. 2026;39:4. [Persian]



بررسی اثرات ضد ویروسی ترکیبات ستیل پیریدینیوم کلراید و کلوتید نانو نقره روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱

رضا افتخار آشتیانی^۱، یاس گل کلباسی^۲، مجتبی حمیدی فرد^۳، الهه بیابانکی^{۴*}

۱- استادیار گروه آموزشی پروتزه‌های دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استادیار گروه تحقیقات ویروس شناسی، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار گروه آموزشی پروتزه‌های دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
زمینه و هدف: علی رغم وجود مستندات اثر ضد ویروسی مواد ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC) و کلوتید نانو نقره (Ag) بر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱، تأثیر ترکیب این دو ماده از نظر احتمال اثر سینرژسمی در غلظت‌های مختلف در این زمینه نامشخص است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد ویروسی ترکیب غلظت‌های مختلف دو ماده ستیل پیریدینیوم کلراید و کلوتید نانو نقره بر روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ بود. روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۴۰۰ در بخش ویروس شناسی مولکولی انستیتو پاستور ایران انجام شد، پس از تست سمیت سلولی غلظت‌های مختلف CPC و Ag، اثر ضد عفونی کنندگی غلظت‌های ایمن به صورت تکی و ترکیبی روی سلول‌های آلوده به ویروس هرپس نوع ۱ مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌های مورد مطالعه در تست‌های مورد بررسی عبارت بودند از گروه‌های ۱ تا ۶ شامل غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰۰ µg/ml Ag، گروه‌های ۷ تا ۱۲ شامل غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰۰ µg/ml CPC و گروه‌های ترکیبی (G13) ۱۰ µg/ml CPC + ۱۰ µg/ml Ag، (G14) ۱۰ µg/ml CPC + ۱۰ µg/ml Ag و (G15) ۱۰ µg/ml CPC + ۱۰ µg/ml Ag. بررسی نتایج با آزمون One-Way ANOVA و آزمون تعقیبی Games-Howell و Tukey HSD با سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام شد. یافته‌ها: بر اساس میانگین نتایج تست MTT و میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از مواجهه با ویروس هرپس نوع ۱، بیشترین سلول زنده مربوط به گروه ۱۰ µg/ml Ag و بعد از آن به ترتیب متعلق به گروه‌های ۱۰ µg/ml CPC، ۱۰ µg/ml Ag + ۱۰ µg/ml CPC، ۱۰ µg/ml Ag + ۱۰ µg/ml CPC و ۱۰ µg/ml Ag + ۱۰ µg/ml CPC بود. از نظر غیر فعال سازی ویروس هرپس نوع ۱ و اثر ضد ویروسی آن‌ها طبق نتایج به دست آمده تفاوت آماری معنی داری بین گروه‌های ۱ تا ۴، ۵، ۶، ۱۰ (P<۰/۰۰۱)، ۲ تا ۴ (P=۰/۴۰)، ۳ تا ۴ (P=۰/۴۰)، ۴ تا ۵ (P=۰/۰۴۱)، ۵ تا ۶ (P=۰/۰۳۵)، ۶ تا ۷ (P=۰/۰۳۵)، ۷ تا ۱۱ و ۱۲ (P<۰/۰۰۱)، ۸ تا ۱۰ (P<۰/۰۰۱)، ۱۱ و ۱۲ (P<۰/۰۰۱) و ۹ تا ۱۰ (P<۰/۰۰۱) و ۱۱ و ۱۲ (P<۰/۰۰۱) مشاهده شد. از میان گروه‌های ترکیبی بیشترین تأثیر ضد ویروسی و کمترین سمیت سلولی مربوط به ۱۰ µg/ml CPC + ۱۰ µg/ml Ag بود. همچنین کمترین اثر ضد ویروسی در گروه‌های ترکیبی در گروه ۱۰ µg/ml CPC + ۱۰ µg/ml Ag مشاهده شد. نتیجه گیری: بیشترین سلول زنده مربوط به گروه ۱۰ µg/ml Ag و سپس ۱۰ µg/ml CPC بود و ترکیب دو ماده باعث کاهش اثر در این زمینه شد. اثر ضد ویروسی مواد به تنهایی نسبت به حالت ترکیبی بیشتر بود. از طرفی از بین گروه‌های ترکیبی بیشترین اثر ضد ویروسی و کمترین سمیت سلولی در ترکیب ۱۰ µg/ml CPC + ۱۰ µg/ml Ag مشاهده شد. کلید واژه‌ها: ستیل پیریدینیوم کلراید، کلوتید نقره، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱	نوع مقاله: مقاله پژوهشی دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۱ انتشار: ۱۴۰۴/۱۱/۰۷ نویسنده مسؤول: الهه بیابانکی گروه آموزشی پروتزه‌های دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (Email: e.beyabanaki@gmail.com)

مقدمه

هنگام سرفه، عطسه و صحبت کردن، ذرات معلق در هوا در اندازه‌های بزرگ (قطر < 5 میکرومتر) و کوچک (قطر ≥ 5 میکرومتر) تولید می‌شود. به دلیل نیروی جاذبه، قطرات بزرگتر به سرعت روی زمین نشست می‌کنند. از این رو، انتقال این قطرات مستلزم نزدیکی فیزیکی بین فرد آلوده و فرد مستعد است. با این حال، قطرات کوچک ممکن است برای زمان بیشتری در هوا باقی مانده و مسافت بیشتری جابجا شوند (۱). در دندانپزشکی هنگام استفاده از هندپیس با سرعت بالا و نیز دستگاه‌های جرم‌گیر اولتراسونیک جهت حذف جرم‌های دندان، آب جریان یافته در لوله‌های یونیت دندانپزشکی و دهان بیمار با میکروارگانیسم‌های مختلف آلوده شده و می‌تواند باعث گسترش آلودگی در فضای محیط درمانی شود (۲-۴). آئروسول‌ها علاوه بر داشتن باکتری‌های رایج دهانی، ممکن است حاوی ویروس‌هایی مانند ایدز، هپاتیت B، هپاتیت C، هرپس سیمپلکس، آنفولانزا، رینوویروس، کرونا و دیگر عوامل عفونی باشند (۵-۸). یکی از شایع‌ترین ویروس‌های بیماری‌زا در درمان‌های دندانپزشکی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) است که یک ویروس پوشش دار حاوی DNA با تکثیر هسته‌ای است که معمولاً از طریق تماس مستقیم با ضایعات عفونی یا مایعات بدن (معمولاً بزاق) منتقل می‌شود. مکانیسم ورود ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) به سلول شامل ادغام پوشش ویرونی با یک غشای سلولی و تحویل پروتئین‌ها به سیتوپلاسم است (۹). بیشتر عفونت‌های اولیه HSV دهان و صورت، توسط HSV-1 ایجاد می‌شود.

امروزه روش‌های گوناگونی به هدف کاهش انتقال عفونت‌ها از طریق آئروسول‌های ایجاد شده در دندانپزشکی استفاده می‌شود که از آن‌ها می‌توان به ضد عفونی سطوح محیطی، به کار بردن تجهیزات حفاظت فردی، حذف یا فیلتر هوای آلوده و ضد عفونی سطوح محیطی با مواد مختلف اشاره کرد (۱۰). به علاوه، شستشوی دهان با دهانشویه پیش از کار (۱۱، ۱۲) شامل کلروهگزیدین و ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC) به ترتیب منجر به کاهش ۷۰٪ و ۶۸٪ واحدهای تشکیل دهنده کلونی در آئروسول‌های تولید شده حین جرم گیری با دستگاه التراسونیک می‌شود (۱۳). CPC یک ترکیب آمونیوم چهارتایی کاتیونی است و به دلیل خواص ضد عفونی‌کنندگی، ضد میکروبی، ضد پلاک و التهاب لثه و ضد خونریزی آن به تنهایی یا به صورت ترکیب با دیگر مواد در دهان

شویه، خمیردندان‌ها، قرص و محلول‌های تمیز کننده استفاده می‌شود (۱۴-۱۷). محدوده غلظت مؤثر برای CPC در دهانشویه ۰/۵ تا ۰/۱٪ بوده و همراه با روی و قلع، می‌تواند تعداد ویروس کرونا را تا ۹۹/۹٪ کاهش دهد (۱۸، ۱۹). بویژه برای بیمارانی که دچار تحریک مخاط یا تغییر رنگ ناشی از دهانشویه کلروهگزیدین ۰/۱۲٪ می‌شوند، CPC ۰/۵٪ می‌تواند جایگزین مناسبی باشد (۱۱).

از طرفی استفاده از تکنولوژی نانو در حیطه ضد عفونی به دلیل واکنش پذیری بالای ذرات کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر به علت نسبت سطح به حجم زیاد ذرات، اجازه تماس بیشتر با سلول‌های باکتریایی را داده و دارای قابلیت نفوذ بالای نانوذرات به باکتری و انحلال سریع، واکنش پذیری بالا و جذب قوی هستند (۲۰، ۲۱). برای مثال نانو امولسیون‌های شامل نانو نقره، ضد عفونی کننده‌های منحصر به فردی با جمعیت یکنواخت از قطرات با انرژی زیاد هستند (۲۲) که دارای فعالیت بیوشیمیایی در برابر ویروس‌های پوشش دار، اسپورها، قارچ‌ها و باکتری‌ها با ایجاد اختلال در غشاهای بیرونی آن‌ها هستند (۲۳). کاهش قابل توجه باکتری‌های زنده مشاهده شده در لوله‌های آب یونیت دندانپزشکی که تحت اثر مواد ضد عفونی کننده حاوی نانو نقره قرار گرفتند نشان داده است که نانو نقره بطور مؤثر جوامع میکروبی داخل لوله‌ها را کاهش می‌دهد (۲۰). همچنین این مواد بر ویروس ایدز (۲۴)، HIV-1، ویروس هپاتیت B (۲۵)، ویروس syncytial respiratory (۲۶) و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (۲۷) مؤثر هستند. به علاوه، دهانشویه نانو نقره خاصیت ضد التهاب لثه‌ای و ضد پوسیدگی قوی دارد (۲۸-۳۰). فرمولاسیون نانو امولسیون همچنین می‌تواند حاوی ماده ستیل پیریدینیوم کلراید باشد که امکان ضد عفونی کردن آب جریان یافته در لوله‌های یونیت دندانپزشکی را ایجاد می‌کند (۲۰).

یک ماده ضد ویروسی ایده آل باید بتواند اثر سریع و مؤثری در جلوگیری از آلودگی سلول میزبان توسط ویروس داشته باشد. این مواد باید مستقیماً در مراحل تکثیر ویروس و قبل از آن، جهت جلوگیری از ادغام DNA پروویروسی با DNA سلول میزبان عمل کند. همچنین باید قابلیت جذب توسط سلول‌های غیر عفونی را داشته باشد و در غلظت‌های غیر سمی به اندازه کافی مؤثر واقع شود (۳۱). با توجه به خاصیت ضد ویروسی اثبات شده ستیل پیریدینیوم کلراید و نقره به صورت جداگانه روی ویروس هرپس سیمپلکس ۱، استفاده هم زمان از این دو ماده با دو

مکانیسم مختلف می‌تواند تأثیر فزاینده‌ای در روند جلوگیری از آلودگی با این ویروس داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی حداقل دوز مؤثر و فاقد سمیت بافتی محلول حاوی ترکیب دو ماده فوق، جهت کاهش لود ویروس هرپس سیمپلکس ۱ است. طبق فرضیه صفر این مطالعه تفاوت معنی داری بین اثر ضد ویروسی مواد ضد عفونی کننده CPC و نانو نقره و ترکیب شان روی ویروس HSV-1 وجود ندارد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی که سال ۱۴۰۰ در بخش ویروس شناسی مولکولی انستیتو پاستور ایران انجام شد، جامعه مورد بررسی شامل سلول‌های Vero (CCL-81) (اپیتلیال کلیه میمون سبز آفریقایی) خریداری شده از بانک سلولی ایران در دو حالت غیر آلوده و آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ بود. با توجه به هدف بررسی اثر ضد ویروسی سه ترکیب از غلظت‌های مختلف دو ماده کلونید نانو نقره و ستیل پیریدینیوم کلراید بر سلول‌های آلوده به ویروس HSV-1، تعداد نمونه هریک از غلظت‌های مورد بررسی ۶ عدد محاسبه گردید. با توجه به وجود دو نوع ماده و سه نوع تست، ۶ غلظت اولیه از هر ماده در تست اول، ۴ غلظت از نانو نقره و ۳ غلظت از CPC در تست دوم و ۳ ترکیب از دو ماده در تست سوم، $132 = (3+3+4+6+6) \times 6$ نمونه محاسبه گردید گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از:

Ag 1000 µg/ml (G1), Ag 100 µg/ml (G2), Ag 10 µg/ml (G3), Ag 1 µg/ml (G4), Ag 0.1 µg/ml (G5), Ag 0.01 µg/ml (G6), CPC 10000 µg/ml (G7), CPC 1000 µg/ml (G8), CPC 100 µg/ml (G9), CPC 10 µg/ml (G10), CPC 1 µg/ml (G11), CPC 0.1 µg/ml (G12), CPC 0.01 µg/ml + CPC 10 µg/ml (G13), CPC 1 µg/ml + CPC 10 µg/ml (G15) و CPC 1 µg/ml (G14). این مطالعه دارای تأییدیه به شماره (IR.SBMU.DRC.REC.1399.154) از کمیته اخلاق دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

در شهر تهران می‌باشد.

ابتدا تهیه، کشت و تکثیر سلول‌های سالم و آلوده انجام شد. در اتاق تمیز (محیطی ایزوله و جدا از محیط آزمایشگاه)، رده سلولی Vero در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium حاوی مقدار بالای گلوکز (۴/۵ µg/ml)، ۱۵ میلی مولار هیدروکسیل-پیرازین اتان سولفوریک اسید، ال-گلوتامین، پیروات، بی کربنات سدیم و اتان سولفوریک اسید، (Bioidea Company, Iran) Phenol Red در ۳ فلاسک کشت بافت ۷۵ cm² قرار داده شد (جدول ۱). برای هر دو گروه سلول‌های سالم و آلوده هر ۳ الی ۴ روز یک بار پاساژ سلولی انجام شد.

ویروس HSV-1 از بانک ویروس بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای تکثیر و افزایش تیترو ویروسی، این ویروس به کشت سلول Vero که از قبل آماده شده بود، تلقیح شد. برای این منظور یک فلاسک ۷۵ cm² حاوی سلول انتخاب شد و بعد از تخلیه محیط کشت آن، دو بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد. سپس تعداد ۱۰ ویروس به ازای هر سلول، به سلول‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. در مرحله آخر، محیط کشت فاقد سرم به فلاسک اضافه و تا پدیدار شدن اثرات سایتوپاتیک، در انکوباتور کشت سلول قرار داده شد. به طول معمول پس از ۴۸ ساعت، این اثرات در ۹۰٪ سلول‌ها مشاهده می‌گردد. در این حالت ویروس‌های تکثیر شده در سوپ سلولی تجمع یافته و به عنوان بذر ویروسی برای مراحل بعدی جمع‌آوری شد.

پروتکل پاساژ سلولی:

۱- با استفاده از تکنیک‌های ضد عفونی و استفاده از بافر فسفات سالین، سلول‌ها ۳ بار شستشو شد تا باقیمانده محیط کشت و سرم جنین گاوی موجود در محیط کشت به طور کامل از فلاسک کشت سلول تخلیه شود.

۲- با استفاده از پی پت ۰.۲٪ (DNAbiotech) Trypsin EDTA اضافه شد تا سلول‌های کف فلاسک را بپوشاند.

جدول ۱- اطلاعات سلول‌های اولیه مورد استفاده در مطالعه

Cell line (Growing virus stocks and titting)	ATCC	Growth conditions
Vero (African Green Monkey Kidney Cells)	#81-CCL	DMEM containing serum, passage every 3-4 days, 37°C, 5% CO2

- ۳- برای اطمینان از تماس تریپسین با تمام سلول‌ها، فلاسک به آرامی چرخانده و سپس در انکوباتور 37°C قرار داده شد. رده‌های سلولی مختلف به زمان تریپسینیزاسیون متفاوت (۵ تا ۱۰ دقیقه) نیاز دارند. برای جلوگیری از تریپسینیزاسیون بیش از حد که می‌تواند به سلول‌ها آسیب وارد کند، هر چند دقیقه یک بار فلاسک‌ها بررسی شد.
- ۴- به محض جدا شدن سلول‌ها، برای خنثی کردن تریپسین مقداری از محیط کشت کامل به داخل فلاسک اضافه شد.
- ۵- پس از انجام سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه، رسوب سلولی مشاهده و مایع رویی دور ریخته شد.
- ۶- رسوب سلولی با محیط کشت کامل به حجم رسانده و با پیتاژ معلق شد.
- ۷- محیط مورد نظر که اکنون دارای سلول بود به دو فلاسک انتقال و سپس در انکوباتور قرار داده شد.
- تهیه و آماده سازی مواد ضد عفونی کننده
- برای آماده سازی مواد ضد عفونی، ابتدا پودر ستیل پیریدینیوم کلراید (جدول ۲) در ۶ لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات سالین در مقادیر ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر حل شد. سپس کلوتید نانو نقره ۱۰۰۰ ppm در آب مقطر (جدول ۲) با استفاده از روش تهیه رقت سریالی، در رقت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در چهار تکرار تهیه شد. بدین منظور شش لوله آزمایش استریل با ۹ میلی لیتر رقیق کننده استریل (آب مقطر) پر شد. سپس با استفاده از پی پت پاستور، ۱ میلی لیتر از نمونه مکش شد و درون لوله اول ریخته و با آب مقطر موجود در لوله مخلوط شد. اطمینان حاصل شد که در حین انتقال، نوک پی پت پاستور به دیواره لوله آزمایش تماس پیدا نکند یا هیچ مقدار از نمونه در آن باقی نماند. در ادامه با استفاده از پی پت پاستور ۱ میلی لیتر از نمونه‌ی موجود در لوله اول به لوله دوم منتقل شد. این مراحل برای ۴ لوله باقی مانده تکرار شد (۳۲).
- تیتراسیون ویروس‌ها
- پس از پاساژ سلولی و تکثیر مقدار کافی از سلول‌های سالم و آلوده و انتقال آن‌ها به پلیت‌های ۶ و ۲۴ خانه، تیتراسیون ویروس‌ها انجام شد. بدین منظور پروتکل سنجش تیتراسیون پلاک ویروسی به روش زیر انجام شد:
- ۱- سلول‌های میزبان در چاهک‌هایی با محیط رشد ذکر شده رشد داده شد تا سلول‌ها به تالاقی مناسب برسند.
 - ۲- محیط رشد با سرم نمکی بافر فسفات Dulbecco شسته شد. سپس ویروس رقیق شده به هر چاهک اضافه و از چندین چاهک برای هر رقت استفاده شد.
 - ۳- ظروف به مدت ۲-۱ ساعت انکوبه شد تا جذب ویروس کامل شود.
 - ۴- ماده تلقیحی برداشته و با محیط پایه شستشو داده شد.
 - ۵- سلول‌ها با محیط پوششی پوشانده و برای مدت زمان مناسب جهت ایجاد عفونت انکوبه شد.
 - ۶- تک لایه‌های سلولی هر روز از نظر وجود کانون یا پلاک ویروسی مشاهده شد.
 - ۷- به منظور تعیین تیترو ویروس، پلاک‌ها شمارش شدند. یک افت log بین رقت‌های متوالی ذکر شد و بسته به اندازه پلیت، با یک کنترل منفی به عنوان مرجع، بین ۵ تا ۱۰۰ پلاک شمارش شد. از نظر آماری، نمونه‌ها به ازای هر ۱۰۰ پلاک شمارش شده در هنگام مقایسه تکرارهای نمونه، ۱۰ درصد متفاوت بود.
 - ۸- تیترو ویروسی از طریق شمارش تعداد پلاک‌های ایزوله شده محاسبه شد. سپس از فرمول زیر برای تعیین تیترو ذخیره ویروس (pfu/ml) استفاده شد:
- $$(D \times V) = \text{pfu/ml}$$
- ضریب رقت = D
- حجم ویروس / چاه رقیق شده = V

جدول ۲- اطلاعات مواد ضد عفونی کننده مورد استفاده در مطالعه

شماره CAS	شرکت سازنده	ترکیبات	ماده
6004-24-6	Merk KGaA	cetylpyridiniumchloridmonohydrate	Cetylpyridinium chloride monohydrate
7440-22-4	Armina Engineering Company	Silver nano particles with concentration of 1000 ppm and functionalized with PVP	Silver nanocolloid

زمانی که مقدار ویروس به اندازه کافی یعنی 3×10^9 /ml (میزان کافی برای تأمین ۱۰ ویروس به ازای هر سلول Vero) رسید، تست‌های MTT انجام شد (۳۱).

تست سمیت سلولی مواد اولیه (MTT) (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT Assay)

پس از تکثیر مقادیر کافی سلول‌های Vero سالم، به ازای هر غلظت از مواد مورد مطالعه، سلول‌های سالم به ۶ چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه تست MTT منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت $50 \mu\text{l}$ از غلظت هر ماده به چاهک‌های آزمایش اضافه و پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت رویی دور ریخته و به هر چاهک $200 \mu\text{l}$ محیط کشت حاوی 0.5 mg در میلی لیتر محلول MTT اضافه و برای ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور دی اکسیدکربن در 37°C قرار داده شد. در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز، احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه باعث تولید کریستال‌های بنفش-آبی رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند (سلول‌های زنده)، رابطه مستقیم دارد. در این مرحله برای شمارش سلول‌های زنده باقی مانده از دستگاه Elisa Reader استفاده شد که یک اسپکتروفتومتر اختصاصی است. نتایج به صورت اعداد در واحد OD گزارش و پس از مقایسه، از هر ماده ۳-۴ غلظت ایمن و غیرسمی برای سلول‌های Vero جهت استفاده در مرحله بعدی انتخاب گردید (۳۳).

تست MTT جهت بررسی اثر ضد ویروسی CPC و نانو نقره ابتدا اثر کشندگی ویروس بدون دخالت مواد ضد عفونی کننده سنجیده شد. به ۱۲ چاهک از سلول‌های سالم، مقدار کافی یعنی ۱۰ عدد ویروس اضافه شد. همزمان با این پروسه، غلظت‌های انتخاب شده از تست سمیت، CPC و نانو نقره نیز در پلیت‌های ۹۶ خانه مجزا به سلول‌های آلوده به ویروس اضافه شدند. مشابه روند توضیح داده شده در مرحله قبل، تست MTT انجام شد و نتایج OD چاهک‌ها گزارش و با هم مقایسه شد.

سه ترکیب زیر از غلظت‌های مؤثرتر هر دو ماده به شرح زیر تهیه شد (گروه‌های ۱۳ تا ۱۵).

گروه ۱۳ - $10 \mu\text{g/ml}$ CPC + $10 \mu\text{g/ml}$ Ag
گروه ۱۴ - $1 \mu\text{g/ml}$ CPC + $10 \mu\text{g/ml}$ Ag
گروه ۱۵ - $10 \mu\text{g/ml}$ CPC + $1 \mu\text{g/ml}$ Ag

برای تست MTT نهایی به ازای هر ترکیب، ۶ چاهک حاوی سلول‌های آلوده به ویروس پس از اضافه کردن ترکیبات و تست MTT، نتایج آنالیز و مقایسه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تحلیل‌ها به کمک نرم افزار SPSS21 انجام گرفت. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها، آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد استفاده قرار گرفت. بررسی اثر متغیرهای مستقل شامل ماده ضد ویروسی، غلظت ماده ضد ویروسی و محیط کشت به صورت جداگانه بر متغیر وابسته یعنی چگالی نوری سلول‌ها در محیط کشت به کمک آزمون One-Way ANOVA بدون وجود اثرات متقابل (Interaction Effects) انجام گرفت. به علت برابر نبودن واریانس جوامع مورد مطالعه طبق تست Levene، از آزمون پارامتریک تحلیل واریانس Welch استفاده شد. آزمون تعقیبی به روش Games-Howell و Tukey HSD برای مقایسه‌های دو به دو با در نظر گرفتن سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام شد.

یافته‌ها

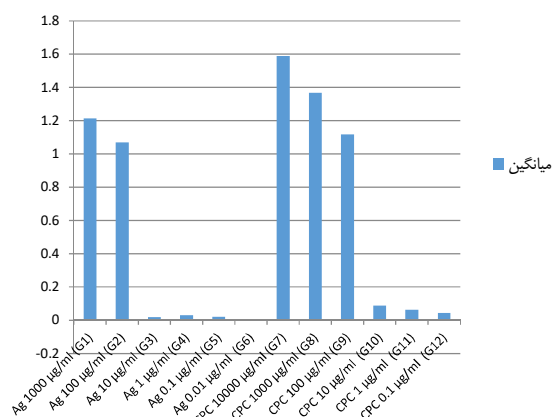
۱- انتخاب غلظت غیر سمی و ضد ویروسی CPC و نانو نقره

میانگین و انحراف معیار به دست آمده از مقادیر سمیت سلولی برای هر یک از گروه‌های مداخله در نمودار ۱ خلاصه شده است. در رابطه با میانگین نتایج غلظت‌های دو ماده CPC و نانو نقره پس از افزودن ویروس هرپس نوع ۱ که بیانگر میزان اثر ضد ویروسی هر غلظت می‌باشد، با توجه به نتایج حاصل از تست سمیت سنجی، میانگین گزارش شده برای هر غلظت نشان دهنده ی اختلاف OD سلول‌ها در هر چاهک، قبل و بعد از اکسپوز شدن مواد است. عدد میانگین کمتر نشان دهنده ی سمیت کمتر و به عبارتی زنده ماندن تعداد بیشتری سلول Vero می‌باشد به صورتیکه بیشترین میانگین مربوط به $1000 \mu\text{g/ml}$ CPC و کمترین

تست MTT جهت بررسی اثر ضد ویروسی CPC و نانو نقره

ابتدا اثر کشندگی ویروس بدون دخالت مواد ضد عفونی کننده سنجیده شد. به ۱۲ چاهک از سلول‌های سالم، مقدار کافی یعنی ۱۰ عدد ویروس اضافه شد. همزمان با این پروسه، غلظت‌های انتخاب شده از تست سمیت، CPC و نانو نقره نیز در پلیت‌های ۹۶ خانه مجزا به سلول‌های آلوده به ویروس اضافه شدند. مشابه روند توضیح داده شده در مرحله قبل، تست MTT انجام شد و نتایج OD چاهک‌ها گزارش و با هم مقایسه شد.

سه ترکیب زیر از غلظت‌های مؤثرتر هر دو ماده به شرح زیر تهیه



نمودار ۱- میانگین کاهش زنده ماندن سلولی در مقابل غلظت‌های مختلف ستیل پیریدینیوم کلراید و نانو نقره به صورت جداگانه

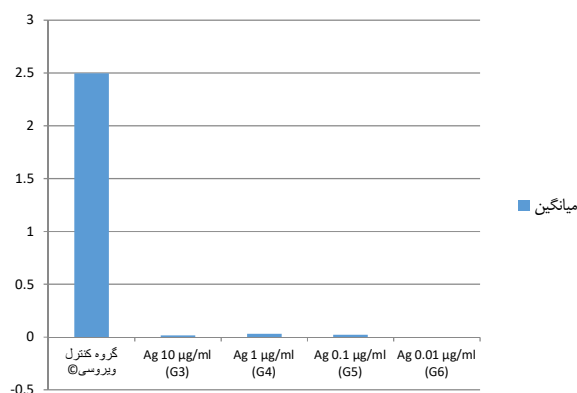
میانگین مربوط به $Ag \ 0.1 \ \mu g/ml$ بود. میانگین سایر غلظت‌ها، به ترتیب از زیاد به کم برای CPC مربوط به غلظت‌های $1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 \ \mu g/ml$ بود و برای Ag مربوط به غلظت‌های $1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 \ \mu g/ml$ بود. طبق نتایج به دست آمده تفاوت آماری معنی داری بین گروه‌های ۱ با ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۰ ($P < 0.001$)، ۲ با ۳ ($P = 0.040$)، ۲ با ۴ ($P = 0.041$)، ۲ با ۵ و ۶ ($P = 0.035$)، ۷ با ۹ ($P = 0.053$)، ۷ با ۱۰، ۱۱ و ۱۲ ($P < 0.001$)، ۱۲ با ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ ($P < 0.001$) و ۹ با ۱۰، ۱۱ و ۱۲ ($P < 0.001$) مشاهده شد (جدول ۳). پس از مقایسه میانگین نتایج در هر گروه (ماده)، گروه‌هایی که میانگین کمتر و نزدیک به هم داشتند، به عنوان غلظت‌های ایمن برای ادامه مطالعه انتخاب شدند. از ماده نانو نقره غلظت‌های $0.1, 0.01, 1, 10 \ \mu g/ml$ و از ماده CPC غلظت‌های $0.1, 1, 10 \ \mu g/ml$ انتخاب شدند.

جدول ۳- مقایسه نتایج تست MTT گروه‌ها به روش آزمون AMES-HOWELL

گروه‌های مورد مقایسه	اختلاف میانگین	خطای معیار	P-value
G1 G2	0.14367	0.20059	0.999
G3	1.19500	0.05781	0.000
G4	1.18167	0.06706	0.000
G5	1.19167	0.10311	0.000
G6	1.21667	0.07003	0.000
G2 G3	1.05133	0.19814	0.040
G4	1.03000	0.20103	0.041
G5	1.04800	0.21575	0.035
G6	1.07300	0.20204	0.035
G3 G4	-0.01333	0.05932	1.000
G5	-0.00333	0.08825	1.000
G6	0.0216	0.06266	1.000
G4 G5	0.01000	0.10397	1.000
G6	0.03500	0.07129	1.000
G5 G6	0.02500	0.10591	1.000
G7 G8	0.22133	0.07537	0.255
G9	0.47017	0.07613	0.003
G10	1.49900	0.09063	0.000
G11	1.52450	0.09209	0.000
G12	1.54400	0.09786	0.000
G8 G9	0.24883	0.07287	0.135
G10	1.27767	0.08792	0.000
G11	1.30317	0.08942	0.000
G12	1.32267	0.09534	0.000
G9 G10	1.02883	0.08857	0.000
G11	1.05433	0.09007	0.000
G12	1.07383	0.09595	0.000
G10 G11	0.25500	0.10262	1.000
G12	0.45000	0.10782	1.000
G11 G12	0.19500	0.10905	1.000

۲- بررسی اثر ضد ویروسی محلول‌های نانو نقره

نتایج به دست آمده از تست MTT پس از اکسپوز ویروس HSV-1 به تنهایی در ۶ چاهک حاوی سلول‌های سالم Vero در نمودار ۲ گزارش شده است. برای بررسی اثر متغیرهای ویروس و غلظت نانو نقره بر چگالی نوری سلول‌ها در محیط کشت، به علت همگن بودن واریانس جوامع مورد مطالعه، از آزمون پارامتریک تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد.

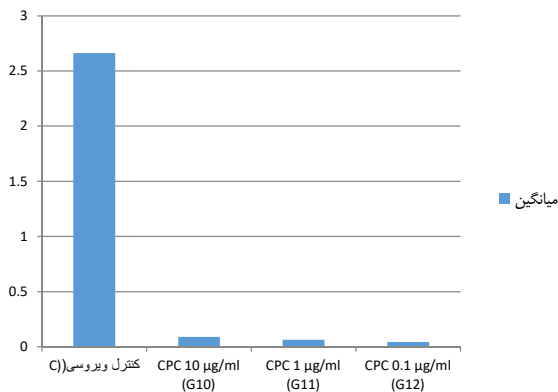


نمودار ۲- میانگین کاهش زنده ماندن سلول‌های آلوده به ویروس و سلول‌های آلوده تحت تأثیر 3 غلظت AG

به دنبال اضافه شدن ویروس به سلول‌ها و گذشتن ۴۸ ساعت جهت اعمال اثر، بیش از ۹۰٪ سلول‌ها نابود شدند. با بررسی اختلاف چگالی نوری سلول‌ها قبل و بعد از تأثیر ویروس و مقایسه این نتایج با اعداد حاصل از تأثیر ماده نانو نقره در ۴ غلظت منتخب بر سلول‌های آلوده به ویروس، اثر ضد ویروسی هریک از این غلظت‌ها مشخص گردید. آزمون تعقیبی به روش Tukey HSD برای مقایسه‌های دو به دو انجام شد

(جدول ۴) و بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل ویروس (C) اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P < 0.001$).

۳- بررسی اثر ضد ویروسی محلول‌های CPC مشابه بررسی غلظت‌های نانو نقره، برای بررسی اثر متغیرهای ویروس و غلظت CPC بر چگالی نوری سلول‌ها در محیط کشت، به علت همگن بودن واریانس جوامع مورد مطالعه، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد (نمودار ۳). با بررسی اختلاف چگالی نوری سلول‌ها قبل و بعد از تأثیر ویروس و مقایسه این نتایج با اعداد حاصل از تأثیر ماده CPC در ۳ غلظت منتخب بر سلول‌های آلوده به ویروس، اثر ضد ویروسی هریک از این غلظت‌ها مشخص گردید. آزمون تعقیبی به روش Tukey HSD برای مقایسه‌های دو به دو انجام شد (جدول ۵). بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل ویروس اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P < 0.001$).



نمودار ۳- میانگین کاهش زنده ماندن سلول‌های آلوده به ویروس و سلول‌های آلوده تحت تأثیر 3 غلظت CPC

جدول ۴- مقایسه نتایج تست MTT گروه کنترل ویروسی با غلظت‌های منتخب نانو نقره به روش Tukey HSD

گروه‌های مورد مقایسه	اختلاف میانگین	خطای معیار	P-value
C G3	۲/۴۷۹۳۳	۰/۰۷۹۷۱	۰/۰۰۰
G4	۲/۴۶۶۰۰	۰/۰۷۹۷۱	۰/۰۰۰
G5	۲/۴۷۶۰۰	۰/۰۷۹۷۱	۰/۰۰۰
G6	۲/۵۰۱۰۰	۰/۰۷۹۷۱	۰/۰۰۰

جدول ۵- مقایسه ی نتایج تست MTT گروه کنترل ویروسی با غلظت های منتخب CPC به روش TUKEY HSD

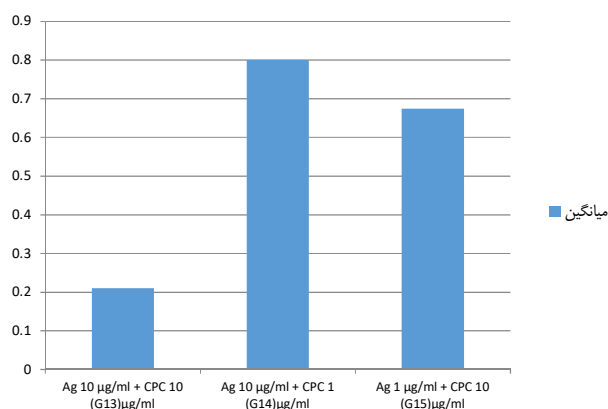
گروه های مورد مقایسه	اختلاف میانگین	خطای معیار	P-value
C G10	۲/۵۷۳۵۰	۰/۰۹۸۱۲	۰/۰۰۰
G11	۲/۵۹۹۰۰	۰/۰۹۸۱۲	۰/۰۰۰
G12	۲/۶۱۸۵۰	۰/۰۹۸۱۲	۰/۰۰۰

جدول ۶- مقایسه ی دو به دو نتایج تست MTT سه ترکیب به روش TUKEY HSD

گروه های مورد مقایسه	اختلاف میانگین	خطای معیار	P-value
G13 G14	-۰/۵۹۰۵۰	۰/۰۶۰۲۷	۰/۰۰۰
G15	-۰/۴۶۴۳۳	۰/۰۶۰۲۷	۰/۰۰۰
G14 G15	-۰/۱۲۶۱۷	۰/۰۶۰۲۷	۰/۱۲۵

جدول ۷- مقایسه نتایج تست MTT بهترین غلظت های نانو نقره و CPC با سه ترکیب نهایی به روش TUKEY HSD

گروه های مورد مقایسه	اختلاف میانگین	خطای معیار	P-value
G3 G10	-۰/۰۷۱۱۷	۰/۰۶۸۵۹	۰/۸۳۶
G13	-۰/۱۹۲۱۷	۰/۰۶۸۵۹	۰/۰۶۷
G14	-۰/۷۸۲۶۷	۰/۰۶۸۵۹	۰/۰۰۰
G15	-۰/۶۵۶۵۰	۰/۰۶۸۵۹	۰/۰۰۰
G10 G13	-۰/۱۲۱۰۰	۰/۰۶۸۵۹	۰/۴۱۶
G14	-۰/۷۱۱۵۰	۰/۰۶۸۵۹	۰/۰۰۰
G15	-۰/۵۸۵۳۳	۰/۰۶۸۵۹	۰/۰۰۰



نمودار ۴- میانگین کاهش زنده ماندن سلولی در مقابل ستیل پیریدینیوم کلراید و نانو نقره به صورت ترکیبی

۴- بررسی اثر ترکیب نانو نقره و CPC

به علت همگن بودن واریانس سه جامعه مورد مطالعه (G14, G13, G15) و از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد (نمودار ۴). آزمون تعقیبی به روش Tukey HSD برای مقایسه های دو به دو انجام شد (جدول ۶). طبق این مقایسه اختلاف معنی داری بین گروه ۱۳ با ۱۴ و گروه ۱۳ با ۱۵ مشاهده شد ($P < 0.001$). کمترین میانگین نتایج بین سه گروه ترکیبی مربوط به گروه (G13) $10 \mu\text{g/ml}$ CPC + $10 \mu\text{g/ml}$ Ag بود که به معنی کمترین میزان مرگ سلولی و بیشترین اثر ضد ویروسی ترکیب می باشد. از نظر تأثیر ضد ویروسی، بهترین گروه، گروه ۱۳ و پس از آن گروه ۱۵ و در نهایت گروه ۱۴ گزارش شد.

۵- مقایسه نهایی و انتخاب بهترین ترکیب

بر اساس میانگین‌های غلظت‌های نانو نقره و CPC (نمودارهای ۲ و ۳)، مؤثرترین غلظت هر ماده ($Ag\ 10\ \mu g/ml$ و $CPC\ 10\ \mu g/ml$) با سه ترکیب نهایی از دو ماده به روش Tukey HSD مقایسه شد (جدول ۷). بین گروه ۳ با ۱۴ و ۱۵ و همچنین بین گروه ۱۰ با ۱۴ و ۱۵ اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P < 0.001$). بر اساس میانگین نتایج تست MTT هر گروه، مؤثرترین گروه، گروه ۳ و بعد از آن به ترتیب گروه‌های ۱۰، ۱۳، ۱۵ و ۱۴ گزارش شد.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر اثر مواد ضدعفونی کننده نانو نقره و CPC با غلظت‌های مختلف به صورت تکی و ترکیبی روی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (ویروس حاوی DNA و پوشش دار) بررسی شد. به علت مشاهده اختلاف معنی دار بین نتایج تست‌های MTT دو ماده CPC و نانو نقره، فرضیه صفر مطالعه رد شد.

طبق نتایج حاصل از تست سمیت سنجی دو ماده در اولین مرحله توسط کیت MTT و طبق میانگین‌های گزارش شده، بیشترین سمیت و کشندگی سلولی مربوط به سلول‌های غیر آلوده به ویروس، متعلق به $Ag\ 10000\ \mu g/ml$ و کمترین سمیت مربوط به $Ag\ 0.1\ \mu g/ml$ بود. در رابطه با ماده CPC، اگرچه در مطالعات گذشته از غلظت ۵۰ تا $100\ \mu g/ml$ به عنوان دهانشویه با هدف کاهش باکتری‌های دهان استفاده شده بود (۱۱)، با توجه به نتایج، غلظت‌هایی با سمیت سلولی کمتر انتخاب شد. در ارتباط با اثر نانو نقره روی ویروس هرپس، غلظت $6/25\ \mu g/ml$ به طور قابل توجهی ویروس را کاهش می‌دهد (۳۴). از طرفی، غلظت $10\ \mu g/ml$ نانو نقره در قالب دهانشویه جهت جلوگیری از رشد و فعالیت باکتری‌های دهانی مورد بررسی قرار گرفته است (۳۵). اگرچه در سایر مطالعات از غلظت‌های ۲۰ یا $200\ \mu g/ml$ استفاده شده است، دارای سمیت سلولی قابل توجهی نسبت به غلظت‌های منتخب این ماده برای این مطالعه بودند.

همچنین در مطالعه Pan و همکاران (۳۶)، ذرات نانو نقره به طور مؤثری باعث کاهش ژنوم این ویروس شد و از سنتز پروتئین جلوگیری کرد. همچنین باعث تغییر شکل ویروس و تداخل با ورود ویروس به سلول‌ها شد. از طرفی ترکیب ذرات نانو نقره با آسپیکلوویر باعث تقویت

اثر مهار کنندگی این دارو نسبت به ویروس HSV-1 شد.

نتایج تست‌های MTT مرحله دوم که به منظور اثبات اثر ضد ویروسی دو ماده در غلظت‌های منتخب انجام شد، حاکی از این بود که هر ۷ غلظت منتخب، اثر ضد ویروسی قابل توجهی از خود نشان دادند. در رابطه با نانو نقره بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل ویروس اختلاف معنی داری مشاهده شد. کاهش مرگ سلولی در سلول‌های آلوده به ویروس در حضور ماده ضد عفونی، نشانگر تأثیر مثبت آن ماده در جلوگیری از نابودی سلول‌ها و فعالیت ویروس HSV-1 است. کمترین میزان مرگ سلولی متعلق به غلظت $0.1\ \mu g/ml$ نانو نقره و پس از آن به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۰، ۱ و $1\ \mu g/ml$ این ماده بود. در تأیید نتایج اثر ضد ویروسی نانو نقره به استناد به مطالعات پیش از این، مشخص شد که این ماده در مقابل ویروس HIV-1 و سایر ویروس‌ها از جمله HSV-1 با مکانیسم غیرفعال کردن مستقیم ویریون مؤثر می‌باشد (۳۲). همچنین نانو نقره در مقابل ویروس آنفولانزا از طریق تعامل با اجزای ویروسی واقع در غشاء اثر بازدارندگی قابل توجهی دارد (۳۷).

برای ماده CPC نیز بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل ویروس اختلاف معنی داری مشاهده شد. به ترتیب کمترین مرگ متعلق به غلظت $1\ \mu g/ml$ و بعد از آن مربوط به غلظت‌های ۱ و $10\ \mu g/ml$ بود. در تأیید این اثر از CPC، در مطالعه ای در مورد اثربخشی این ماده در مقابل ویروس هرپس سیمپلکس، تکثیر ویروس در سلول‌های آلوده ۱۰ دقیقه پس از اضافه شدن CPC مهار گردید (۳۸). همچنین، طبق مطالعه Riveira-Muñoz E و همکاران (۳۹) دهانشویه حاوی CPC برخلاف عدم تأثیر بر ویروس‌های بدون پوشش مثل HPV، اثر ضد ویروسی زیادی در مقابل ویروس‌های پوشش دار مثل HSV-1 دارد.

مؤثرترین گروه از نظر سمیت سلولی، گروه $Ag\ 10\ \mu g/ml$ و بعد از آن به ترتیب گروه‌های $CPC\ 10\ \mu g/ml$ ، $Ag\ 10\ \mu g/ml + CPC\ 10\ \mu g/ml$ (G13) و $Ag\ 1\ \mu g/ml + CPC\ 10\ \mu g/ml$ (G14) گزارش شد. همچنین، در نتیجه تست‌های MTT نهایی که به منظور بررسی اثر ضد ویروسی سه ترکیب انتخابی از دو ماده انجام گرفت، بهترین گروه‌ها از نظر تأثیر ضد ویروسی، گروه $Ag\ 10\ \mu g/ml + CPC\ 10\ \mu g/ml$ (G13) گزارش شد. گروه $Ag\ 10\ \mu g/ml + CPC\ 10\ \mu g/ml$ (G13) کمترین میانگین نتایج بین سه گروه ترکیبی را داشت که به معنی کمترین میزان مرگ سلولی

و بیشترین اثر ضد ویروسی ترکیب در مقایسه با دو ترکیب دیگر می باشد. مطالعه مشابهی که به بررسی اثر ترکیب این دو ماده در مقابل ویروس هرپس نوع ۱ پرداخته باشد موجود نمی باشد. با این حال، به نظر می رسد در صورت ترکیب دو ماده مذکور استفاده از غلظت حداکثر $10 \mu\text{g/ml}$ برای هر دو ماده، در مقایسه با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ اثر بالاتری بدنبال دارد. با این حال باید در نظر داشت طبق نتایج مطالعه حاضر در مقایسه با اثرات هر یک از دو ماده نانو نقره و ستیل پیریدینیوم به صورت جداگانه، ترکیبشان می تواند از نظر خواص فیزیکوشیمیایی بجای خاصیت تقویت کنندگی، خاصیت تضعیف کنندگی در اثر کلی ترکیب نهایی داشته باشد. به عبارتی این تصور که هر گاه دو ماده ضد ویروسی به تنهایی اثر مطلوبی دارند، لزوماً ترکیب آنها نیز همین اثر یا اثر سینرژیستیک بیشتری خواهد داشت، اشتباه است. از آنجایی که تصور می شد تأثیر ضد ویروسی ترکیب دو ماده با مکانیسم اثر متفاوت بر روی ویروس ها، بیشتر از اثر تکی هر کدام باشد، در این مطالعه مشخص شد مواد نانو نقره و CPC به صورت جداگانه فعالیت ضد ویروسی مؤثرتری داشتند. علت این یافته می تواند به تداخل اثر دو ماده به دلیل بر هم کنش فیزیکوشیمیایی بین دو ماده یا بدلیل رقابت در رسیدن به یک هدف مشترک مثل گیرنده سلولی مرتبط باشد. همچنین ترکیب دو ماده می تواند منجر به تغییر در دوز مؤثر هر یک از مواد شود به طوری که دوز یکی از مواد در ترکیب به حدی کاهش یابد که زیر حد مؤثر آن باشد و باعث کاهش تأثیر ترکیب شود. سایر دلایل احتمالی عبارتند از مکانیسم اثر متفاوت دو ماده، مقاومت ویروس به یکی از مواد و ترکیب دو ماده، تغییر شکل یا ساختار یک ماده در ترکیب با ماده دیگر و/ یا به اشباع رسیدن اثر یک ماده و عدم افزایش تأثیر با افزودن ماده دیگر باشد که تأیید این توضیحات احتمالی نیازمند انجام مطالعات آزمایشگاهی بیشتر برای بررسی ماهیت و نحوه تعامل این دو ماده در ترکیب با هم است.

مکانیسم اثر بازدارندگی ترکیبات ضد عفونی کننده مختلف بر روی ویروس ها، به ویژه قبل از ورود به سلول، برای ویروس های مختلف تقریباً یکسان است و DNA یا RNA دار بودن ویروس تفاوتی ایجاد نمی کند.

همچنین بطور کلی ویروسهای پوشش دار و بدون پوشش، رفتارهای فیزیکوشیمیایی مشابه هم دارند. پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی، تأثیر کلینیکی استفاده از دهانشویه حاوی دو ماده ی نانو نقره و ستیل پیریدینیوم کلراید در مؤثرترین ترکیب غلظت یعنی $10 \mu\text{g/ml}$ CPC + $10 \mu\text{g/ml}$ Ag، بر روی افراد مبتلا به بیماری هرپس نوع ۱ بررسی شود. همچنین با توجه به اینکه ویروس هرپس ساختار و مورفولوژی شبیه به ویروس کرونا دارد، پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی تأثیر مواد و غلظت های بررسی شده، بر روی ویروس کرونا نیز مورد مطالعه قرار گیرد. در این مطالعه آزمایشگاهی اثر ترکیب دو ماده مؤثر اصلی بر کشندگی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ به عنوان یک ویروس نسبتاً شایع در دندانپزشکی در کنار سلول های زنده انجام شد تا اثر بخشی این مواد در کنار ایمنی آن یعنی سمیت سلولی مورد بررسی قرار گیرد. یکی از محدودیت های این مطالعه استفاده از ترکیب خالص نانو نقره و ستیل پیریدینیوم بدون سایر ترکیبات موجود در ترکیب معمول دهانشویه ها و عدم بررسی اثر متقابل سایر مواد موجود بر نتیجه نهایی است. مطالعات بعدی می تواند اثر بخشی ترکیبات مؤثرتر دو ماده مذکور طبق نتایج این مطالعه را در قالب دهانشویه مورد ارزیابی قرار دهد.

با توجه به محدودیت های این مطالعه آزمایشگاهی می توان نتیجه گیری کرد که دو ماده نانو نقره و ستیل پیریدینیوم به تنهایی سمیت سلولی کمتر و اثر ضد ویروسی بیشتری نسبت به حالت ترکیب نشان دادند. غلظت های $10 \mu\text{g/ml}$ نانو نقره و سپس $10 \mu\text{g/ml}$ ستیل پیریدینیوم کمترین سمیت سلولی را به دنبال داشتند. همچنین از بین ترکیب غلظت های مختلف این دو ماده بیشترین اثر ضد ویروسی در عین کمترین سمیت سلولی، به ترکیب $10 \mu\text{g/ml}$ CPC + $10 \mu\text{g/ml}$ Ag تعلق داشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ۳۸۵۷ می باشد.

References:

- 1- Organization WH. Infection prevention and control of epidemic-and pandemic-prone acute respiratory infections in health care: World Health Organization; 2014.
- 2- Lal B, Ravindra K, Biswal M. Appraisal of microbial contamination of dental unit water systems and practices of general dental practitioners for risk reduction. Environ Sci Pollut

Res Int. 2018;25(33):33566-33572.

- 3- Ji XY, Fei CN, Zhang Y, Liu J, Liu H, Song J. Three key factors influencing the bacterial contamination of dental unit waterlines: a 6-year survey from 2012 to 2017. Int Dent J. 2019;69(3):192-9.
- 4- Checa J, Carbonell I, Manero N, Martí I. Comparative study

- of Legiolert with ISO 11731-1998 standard method-conclusions from a Public Health Laboratory. *J Microbiol Methods*. 2021;186:106242.
- 5- Zemouri C, de Soet H, Crielaard W, Laheij A. A scoping review on bio-aerosols in healthcare and the dental environment. *PloS one*. 2017;12(5):e0178007.
- 6- Retamal-Valdes B, Soares GM, Stewart B, Figueiredo LC, Faveri M, Miller S, et al. Effectiveness of a pre-procedural mouthwash in reducing bacteria in dental aerosols: randomized clinical trial. *Braz Oral Res*. 2017;31:e21.
- 7- Chen PZ, Bobrovitz N, Premji Z, Koopmans M, Fisman DN, Gu FX. Heterogeneity in transmissibility and shedding SARS-CoV-2 via droplets and aerosols. *Elife*. 2021;10:e65774.
- 8- Wang CC, Prather KA, Sznitman J, Jimenez JL, Lakdawala SS, Tufekci Z, et al. Airborne transmission of respiratory viruses. *Science*. 2021;373(6558):eabd9149.
- 9- Rezazadeh F, Shojaei R, Jamalidoust M, Khosropanah H, Tabesh A, Tayebi Khorami E. Effect of periodontal surgery on the salivary Herpes simplex virus-1 levels-a pilot study. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2023;13(4):482-5.
- 10- Ge ZY, Yang LM, Xia JJ, Fu XH, Zhang YZ. Possible aerosol transmission of COVID-19 and special precautions in dentistry. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2020;21(5):361-8.
- 11- Garcia-Gargallo M, Zurlohe M, Montero E, Alonso B, Serrano J, Sanz M, Herrera D. Evaluation of new chlorhexidine- and cetylpyridinium chloride-based mouthrinse formulations adjunctive to scaling and root planing: pilot study. *Int J Dent Hyg*. 2017;15(4):269-79.
- 12- Lo Giudice R. The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2) in Dentistry. Management of Biological Risk in Dental Practice. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(9):3067.
- 13- Marui VC, Souto MLS, Rovai ES, Romito GA, Chambrone L, Pannuti CM. Efficacy of preprocedural mouthrinses in the reduction of microorganisms in aerosol: A systematic review. *J Am Dent Assoc*. 2019;150(12):1015-26.e1.
- 14- Khan S, Amin F, Amin R, Kumar N. Exploring the Effect of Cetylpyridinium Chloride Addition on the Antibacterial Activity and Surface Hardness of Resin-Based Dental Composites. *Polymers (Basel)*. 2024;16(5):588.
- 15- Ayad F, Hetata M, Ahmed R, Okai T, Govindaraju G, Mateo LR, et al. Antiplatelet And Antigingivitis Effects Of A Novel Oral Care Regimen Featuring Stannous Fluoride Toothpaste, A Unique Toothbrush, And Cetylpyridinium Chloride Mouthwash: A Randomized Clinical Trial. *J Evid Based Dent Pract*. 2025;25(2):102123.
- 16- Mao X, Auer DL, Buchalla W, Hiller KA, Maisch T, Hellwig E, et al. Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(8):e00576-20.
- 17- Rösing CK, Cavagni J, Gaio EJ, Muniz FWMG, Ranzan N, Oballe HJR, et al. Efficacy of two mouthwashes with cetylpyridinium chloride: a controlled randomized clinical trial. *Braz Oral Res*. 2017;31:e47.
- 18- Pramod K, Kotta S, Jijith US, Aravind A, Abu Tahir M, Manju C, Gangadharappa HV. Surfactant-based prophylaxis and therapy against COVID-19: A possibility. *Med Hypotheses*. 2020;143:110081.
- 19- Pérez-Errázuriz S, Velasco-Ortega E, Jiménez-Guerra A, Aguilera-Navarro E. Cetylpyridinium chloride as a tool against COVID-19. *Int J Odontostomat*. 2021;15(1):27-30.
- 20- Paramashivaiah R, Prabhuji MLV, Narayanan R. Dental unit water lines decontamination with the aid of nanotechnology. *Indian J Dent Res*. 2016;27(1):91-9.
- 21- Bishoge OK, Zhang L, Suntu SL, Jin H, Zewde AA, Qi Z. Remediation of water and wastewater by using engineered nanomaterials: A review. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2018;53(6):537-54.
- 22- Changez M, Anwar MF, Alrahbi H. Olive Oil-Based Reverse Microemulsion for Stability and Topical Delivery of Methotrexate: In Vitro. *ACS Omega*. 2024;9(6):7012-21.
- 23- Al-Adham ISI, Jaber N, Al-Remawi M, Al-Akayleh F, Al-Kaissi E, Ali Agha ASA, et al. A review of the antimicrobial activity of thermodynamically stable microemulsions. *Lett Appl Microbiol*. 2022;75(3):537-47.
- 24- Sadeghi-Kiakhani M, Hashemi E, Norouzi MM. Clean synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) on polyamide fabrics by *Verbascum thapsus* L. (mullein) extract: characterization, colorimetric, antibacterial, and colorfastness studies. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2024;31(22):32637-48.
- 25- Hodek J, Zajicová V, Lověťinská-Šlamborová I, Stibor I, Müllerová J, Weber J. Protective hybrid coating containing silver, copper and zinc cations effective against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *BMC Microbiol*. 2016;16 Suppl 1:56.
- 26- Yang XX, Li CM, Huang CZ. Curcumin modified silver nanoparticles for highly efficient inhibition of respiratory syncytial virus infection. *Nanoscale*. 2016;8(5):3040-8.
- 27- Akbarzadeh A, Kafshdooz L, Razban Z, Dastranj Tbrizi A, Rasoulpour S, Khalilov R, et al. An overview application of silver nanoparticles in inhibition of herpes simplex virus. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(2):263-7.
- 28- Ali A, Ismail H, Amin K. Effect of nanosilver mouthwash on prevention of white spot lesions in patients undergoing fixed orthodontic treatment - a randomized double-blind clinical trial. *J Dent Sci*. 2022;17(1):249-55.
- 29- Tirupathi S, Svsg N, Rajasekhar S, Nuvvula S. Comparative cariostatic efficacy of a novel Nano-silver fluoride varnish with 38% silver diamine fluoride varnish a double-blind randomized clinical trial. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(2):e105-e12.
- 30- Liu BM, Mei L, Chu CH, ECM L. Effect of silver fluoride in preventing the formation of artificial dentinal caries lesions in vitro. *Chin J Dent Res*. 2019;22(4):273-80.
- 31- Rai M, Deshmukh SD, Ingle AP, Gupta IR, Galdiero M, Galdiero S. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(1):46-56.
- 32- Shen CF, Burney E, Gilbert R, Elahi SM, Parato K, Loignon M. Development, optimization, and scale-up of suspension Vero cell culture process for high titer production of oncolytic herpes simplex virus-1. *Biotechnol J*. 2024;19(1):e2300244

- 33- van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45.
- 34- Hu RL, Li SR, Kong FJ, Hou R, Guan XL, Guo F. Inhibition effect of silver nanoparticles on herpes simplex virus 2. *Genet Mol Res.* 2014;13(3):7022-8.
- 35- Rabani M, Aref P, Askarizadeh N, Ashrafitamay I. Comparison of the antibacterial effect of nanosilver and chlorhexidine mouthwash on *Streptococcus mutans* (invitro). *Iranian J Pediatric Dent.* 2019;15(1):93-102.
- 36- Pan X, Zhang Y, Zhao Y, Yao S, Guan C, Wang L, Chen L. Inhibitory activity and mechanism of silver nanoparticles against herpes simplex virus type 1. *Arch Virol.* 2022 Aug;167(8):1619-36.
- 37- Park SJ, Ko Y-S, Lee SJ, Lee C, Woo K, Ko G. Inactivation of influenza A virus via exposure to silver nanoparticle-decorated silica hybrid composites. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(27):27021-30.
- 38- Alvarez DM, Duarte LF, Corrales N, Smith PC, González PA. Cetylpyridinium chloride blocks herpes simplex virus replication in gingival fibroblasts. *Antiviral Res.* 2020;179:104818.
- 39- Riveira-Muñoz E, Garcia-Vidal E, Bañó-Polo M, León R, Blanc V, Clotet B, et al. Cetylpyridinium Chloride-Containing Mouthwashes Show Virucidal Activity against Herpes Simplex Virus Type 1. *Viruses.* 2023;15(7):1433.