ORIGINAL ARTICLE

In vitro Analysis of Antifungal Effects of Acrylic Resin Modified by Zinc Oxide Nanoparticles on *Candida albicans*

Kosar Dadgar[1,2]
Leila Shadan[3]
Maryam Moazeni[4,5]
Pourya Biparva[6]
Jamshid Yazdani Charati[7]
Zahra Ebrahimi[8], Mehdi Aryana[9]

[1] Assistant Professor, Department of Prosthodontics, Dental Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[7] Associate Professor, Department of Biostatistics, Health Sciences Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[8] Dental Surgeon, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[9] Dentistry Student, Student Research Committee, Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 23, 2021 Accepted September 13, 2021)

Abstract

Background and purpose: Removable prostheses made of polymethyl methacrylate are susceptible to *Candida*-dependent denture stomatitis and *Candida albicans* is considered to be the first common cause. The aim of the present study was to investigate the antifungal effect of acrylic resin modified by zinc oxide nanoparticles.

Materials and methods: In this laboratory study, 72 disks (10*4 mm) made of polymethyl methacrylate (Acropars, Marlic, Iran) were divided into three groups (n= 24). Concentrations of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) were 1 (group A), 0.5 (group B), and 0 (group C, control) mg/ml. Samples were studied in laboratory using *Candida albicans* strains (ATCC 10231) according to CLSI M27-A3 and M27-S4 documents. For data analysis, one-way ANOVA and Scheffe's post-test were performed using SPSS V24.

Results: There were significant differences in mean numbers of fungal colonies in study groups. The amount of fungal colonies in group A was lower than those in group B and in group B was lower than those in group C ($P<0.05$).

Conclusion: Considering the limitations of this study, findings showed that zinc oxide nanoparticles have antifungal activity, which increases by increase in concentration of nanoparticles.

Keywords: microbial sensitivity test, zinc oxide, metal nanoparticle

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (201): 28-38 (Persian).

*** Corresponding Author: Kosar Dadgar -** Dental Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: kosar.dadgar@gmail.com)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره ۲۰۱ مهر سال ۱۴۰۰ (۳۸-۲۸)

بررسی آزمایشگاهی اثرات ضد قارچی آکریل رزینی اصلاح شده با نانوذرات اکسید روی بر کاندیدا آلبیکنس

کوثر دادگر[۱،۲]
لیلا شادان[۳]
مریم موذنی[۴،۵]
پوریا بی‌پروا[۶]
جمشید یزدانی چراتی[۷]
زهرا ابراهیمی[۸]
مهدی آریانا[۹]

چکیده

سابقه و هدف: پروتزهای متحرک ساخته شده از پلی‌متیل‌متاکریلات مستعد دنچر استوماتیت وابسته به کاندیدا هستند و *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان عامل اولیه آن در نظر گرفته می شود. این مطالعه با هدف بررسی آزمایشگاهی اثر ضد قارچی آکریل رزینی اصلاح شده با نانوذرات اکسید روی، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ۷۲ دیسک با ابعاد ۱۰×۴ میلی متر از جنس پلی‌متیل‌متاکریلات (Iran، Marlic، Acropars) به سه گروه ۲۴ تایی تقسیم شدند. غلظت نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) در گروه‌های مورد مطالعه، ۱ (گروه A)، ۰/۵ (گروه B) و ۰ (گروه C، کنترل) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نمونه‌ها در محیط آزمایشگاه با استفاده از سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 10231) مطابق با سند توصیه شده استاندارد بالینی و آزمایشگاهی M27-A3 و M27-S4 ارزیابی شدند. آنالیز آماری با استفاده از آزمون‌های ANOVA یک طرفه و Scheffe's post-test در نرم‌افزار SPSS 24 انجام شد.

یافته‌ها: میانگین شمارش کلنی‌های قارچی در گروه‌های مطالعه حاضر متفاوت بود. مقدار کلنی‌های قارچی در گروه B کم‌تر از گروه C و در گروه A کم‌تر از گروه B بود. این تفاوت بین گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

استنتاج: با در نظر گرفتن محدودیت های مطالعه‌ی حاضر، نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید روی دارای فعالیت ضد قارچی هستند که این فعالیت با افزایش غلظت نانوذرات، افزایش می یابد.

واژه های کلیدی: تست حساسیت میکروبی، اکسید روی، نانوذرات فلزی

مقدمه

اگر چه ایمپلنت های دندانی به‌طور فزاینده‌ای در بازسازی دهان بیماران بی‌دندان مورد استفاده قرار می گیرد، اما همچنان شایع‌ترین درمان استفاده از پروتزهای متحرک ساخته شده از پلی‌متیل‌متاکریلات

مولف مسئول: کوثر دادگر- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران،دانشکده دندانپزشکی E-mail: kosar.dadgar@gmail.com
۱. استادیار، گروه پروتز های دندانی، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۷. دانشیار، گروه آمار زیستی، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، پژوهشکده اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۸. دندانپزشک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۹. دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۰/۳/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۴۰۰/۳/۸ تاریخ تصویب : ۱۴۰۰/۶/۲۲

(Poly Methyl Methacrylate یا به اختصار PMMA) است(۳ - ۱). این ماده به علت داشتن ضعف‌هایی مانند خشونت سطحی، تخلخل ظاهری و وجود ترک، به عنوان مخزنی برای میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کند(۶-۴). در ۶۰ درصد از افرادی که از پروتز متحرک استفاده می‌کنند دنچراستوماتیت دیده می‌شود که اتیولوژی مولتی فاکتوریال دارد و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* یکی از مهم‌ترین آن‌هاست(۷). اتصال اولیه و چسبندگی *کاندیدا آلبیکنس* به سطح بافتی بیس دنچر و کلونیزاسیون آن منجر به دنچراستوماتیت می‌شوند(۸). در افرادی که از دنچر استفاده می‌کنند، مسواک زدن روزانه برای کاهش میکروارگانیسم‌هایی که به سطح دنچر می‌چسبند توصیه می شود(۹). البته روش‌های تمیز کردن مکانیکی به تنهایی برای کاهش سطح میکروارگانیسم ها در دنچر کافی نیستند(۸).

درمان دنچر استوماتیت به دلیل ضد عفونی شدن ناقص سطح آکریل و کلونیزه شدن مجدد سریع میکروبیال دشوار است(۳). با وجود استفاده از داروهای ضد قارچ برای درمان دنچراستوماتیت، عفونت اغلب ادامه می‌یابد و مقاومت علیه بیوفیلم کاندیدا ایجاد می‌شود(۱۰). بنابراین تلاش‌های بسیاری در این زمینه انجام شده تا چسبندگی *کاندیدا آلبیکنس* و متعاقب آن کلونیزاسیون روی بیس دنچر از طریق استفاده از عوامل ضد قارچی را کاهش دهند(۱۱،۵). اخیراً نانوذرات زیست‌کش (biocidal) توجهات زیادی را برای کنترل رشد بیوفیلم برانگیخته‌اند(۱۲). در میان نانوذرات، اکسیدهای فلزی به دلیل طیف گسترده‌ای از خواص فیزیکی و شیمیایی و اثر ضد باکتریایی خود مورد توجه قرار گرفته‌اند(۸). اکسید روی (ZnO) یک ترکیب غیر آلی محلول در آب است و خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی آن ثابت شده است(۱۳). مکانیسم‌های مختلفی برای اثرات ضد باکتریایی نانومواد حاوی Zn وجود دارد که مهم‌ترین آن مسمومیت ناشی از تولید ROS (Reactive Oxygen Species) و آزادسازی Zn^{2+} است. ROS مثل آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسید می‌تواند به لیپیدها و پروتئین های داخل غشاء سلولی باکتری آسیب بزند و Zn^{2+} آزاد شده از نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) مسیرهای متابولیکی مهم را مختل می‌کند. نانوذرات ZnO، زیست سازگار (biocompatible) و زیست تخریب‌پذیر (biodegradable) هستند(۱۴). اثر این نانوذرات بر *کاندیدا آلبیکنس* وابسته به غلظت است. هر چه غلظت ZnO NPs بیش‌تر باشد خواص ضد قارچی آن بیش‌تر است(۱۵،۱). انجمن غذا و دارو آمریکا ZnO را به عنوان ماده‌ای ایمن اعلام کرده است که این معیار با ویژگی‌های فوتوکاتالیستی و فتواکسیدکنندگی علیه مواد بیوشیمیایی مشخص می‌شود. هیچ گزارشی از سرطان‌زایی، سمیت ژنتیکی و سمیت تولیدمثل ZnO در انسان نشان داده نشده است(۱۷،۱۶). با توجه به این خصوصیات، پیش‌بینی می‌شود بیس دنچر اصلاح شده با ZnONPs می‌تواند نقش پیشگیری‌کننده را در افراد مستعد ابتلا به عفونت قارچی ایفا کند(۱). در این مطالعه به بررسی اثر ضد قارچی ZnO NPs روی بیس آکریلی دنچر به صورت آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی مازندران و پژوهشکده مهندسی مواد مازندران و پس از تصویب در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و تأیید کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی (کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.1398.180) و با رعایت اصول اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی انجام شد. حجم نمونه با الفا ۰/۰۵ و توان آزمون ۸۰ درصد و با انحراف معیار ۰/۲ برای هر گروه ۲۴ عدد در نظر گرفته شد که در مجموع ۷۲ دیسک آکریلی با غلظت های ۱ mg/ml (گروه A) و ۰/۵ mg/ml (گروه B) از نانوذرات ZnO و فاقد نانوذرات اکسید روی (گروه C، کنترل) ساخته

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.201.15.3]

شد(۱۸). برای تهیه نمونه ها، نانوذرات ZnO (شرکت پیشگامان تولید نانو مواد ایران) با سایز ۱۰ تا ۳۰ نانومتر به جزء مایع آکریل (Acropars, Marlic, Iran) اضافه شد و سپس برای ۴ بار به مدت ۱۵ دقیقه تحت اولتراسونیک قرار گرفت تا به صورت یکنواخت داخل مایع آکریل پخش و هموژن شود. محلول استوک ZnO (محلول مادر با غلظت بیش‌تر) تهیه شد و در مراحل بعدی برای به دست آوردن غلظت‌های ۰/۵ mg/ml و ۱ mg/ml از نانو ذرات ZnO، با مایع آکریل رقیق شد. برای تهیه دیسک‌های آکریلی مشابه، ابتدا گچ (Moldano, Stone, Iran) و آب طبق دستور کارخانه مخلوط شده و تا ۱۰ mm لبه فوقانی قسمت تحتانی مفل ریخته شد. بعد از ست‌شدن گچ، پوتی (Speedex, Coltene whaledent, Swiss) به ضخامت ۱۰ mm روی آن قرار داده شد. در حالی که پوتی در حال ست شدن بود، استوانه‌های فلزی (به قطر ۱۰ mm و ضخامت ۴ mm) درون پوتی قرار داده شد. سپس قسمت فوقانی مفل روی قسمت تحتانی گذاشته شد و زیر دستگاه پرس هیدرولیک قرارگرفت و بعد از ۳ ساعت، استوانه‌های فلزی بیرون آورده شد. به این ترتیب فضای خالی با ابعاد مشخص ایجاد شد(۱۹). برای تهیه خمیرآکریلی، مایع مونومر ترکیب شده با ZnO NPs با پودرآکریل طبق دستور کارخانه مخلوط شد. هنگامی که مخلوط در مرحله خمیری بود، درون فضاهای خالی تعبیه شده داخل پوتی قرار داده شد. نهایتاً مفل زیر دستگاه پرس و سپس درون حمام آب گرم با دمای $۷۲^{\circ}c$ به مدت ۶ ساعت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، مفل باز شد و نمونه‌ها از درون گچ در آورده شدند. توسط فرز آکریل، اضافات تراشیده و درون سرم فیزیولوژی قرار داده شد(۱۹).

بررسی میکروسکوپی نمونه ها

از آنالیز FE-SEM [1]، EDX [2] و MAP برای شناسایی مورفولوژی و پراکنش و درصد اجزای دیسک‌های آکریل رزینی اصلاح شده با نانوذرات اکسید روی استفاده شد(۱۸،۲۰). میکروسکوپ الکترونی نشر میدانی یا همان FE-SEM مدل MIRA3 (TSCAN Co., Czech Republic) دارای قدرت تفکیک در حد ۱/۵ نانومتر در ولتاژ ۱۵ KV می‌باشد و به‌طور کلی جهت بررسی توپوگرافی سطحی، مورفولوژی نمونه و بررسی سطوح شکست نمونه‌ها استفاده می‌شود. آنالیزگر EDX که بر روی این دستگاه نصب شده است جهت آنالیز نیمه کمی برای عناصر بالاتر از بور(B) در نمونه‌ها می‌باشد. یعنی تعیین ترکیب شیمیایی زمینه به صورت عنصری را انجام می‌دهد. همچنین آنالیز MAP یا همان آنالیز صفحه‌ای چگونگی پراکندگی عناصر در صفحه، توسط تجهیزات EDS انجام می‌پذیرد. آماده‌سازی نمونه‌ها برای آنالیز جزو پروتکل‌های دستگاه بوده و هر سه آنالیز تماماً توسط اپراتور دستگاه در مرکز پژوهش متالورژی رازی مازندران (پژوهشکده مهندسی مواد) انجام شد. نمونه‌ها به صورت پودر و صفحات ۱ cm* ۱ cmتحویل اپراتور برای آنالیز داده شد.

تست حساسیت ضد قارچی

تست حساسیت ضد قارچی طبق دستورالعمل‌های استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، M27-A3 و M27-S4 بر روی ۲۴ سویه از *کاندیدا آلبیکنس* (ACCT 10231) که از سازمان تحقیقات علم و تکنولوژی ایران (IROST) خریداری شد، و با کمی اصلاحات انجام شد(۲۱). سویه‌های کاندیدا در محیط استاندارد RPMI 1640 (Sigma chemical Co.) که با استفاده از ۰/۱۶۵ 3-(N-Morpholino) پروپانسولفونیک اسید (MOPS, sigmachemical Co.) با l-گلوتامین بدون بیکربنات، تا pH=۷/۰ بافر شده بود، کشت داده شدند. سپس دیسک‌های گروه‌های A، B و C در ۲۴ چاهک (well) پلیت‌های میکرودایلوشن (Nunc, UK) قرار گرفتند. سوسپانسیون‌های مخمر از ایزوله‌هایی که به مدت ۲۴-۷۲ ساعت رشد کرده

1. Field Emission Scanning Electron Microscope
2. Energy-dispersive X-ray spectroscopy

بودند، تهیه شدند. سپس این سوسپانسیون‌ها در یک محلول سالین استریل معلق شده و با اندازه‌گیری‌های اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۳۰ نانومتر، در درصد عبور ۷۵-۷۷ تنظیم شدند. سوسپانسیون مورد نیاز آزمایش (working suspension) با رقت ۱:۱۰ و سوسپانسیون استوک (stock suspension) با محیط کشت RPMI 1640 با رقت ۱:۱۰۰ تهیه شد که منجر به CFU/ml ۲/۵-۵x۱۰^{۳} شد. چاهک‌های بدون دارو و بدون مخمر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. پلیت‌های میکرودایلوشن در دمای ۳۵°c انکوبه شده و بعد از ۲۴ ساعت مورد بررسی بصری قرار گرفتند.

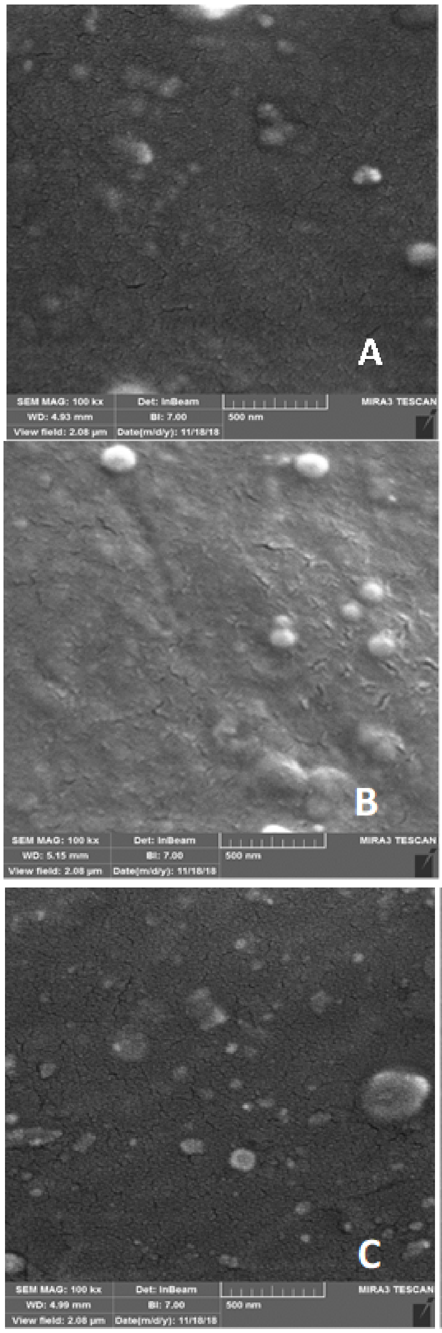
تعیین CFU/ml

برای کمی‌سازی نتایج از CFU/ml استفاده شد. جهت تعیین CFU/ml از متد Miles استفاده شد(۲۲). یک کشت از رقت ۱/۱۰۰۰ از هر چاهک در نظر گرفته شد. در هر محیط کشت (سابورودکستروزآگار همراه با پن استرپ) به میزان ۲۰ µl (۰/۰۲ ml) از هر نمونه کشت داده شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵°c خوانده شد و CFU/ml با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید و سپس تحت آنالیز قرار گرفت.

(Number of colonies * Dilution factor) / Volume of culture plate

یافته ها

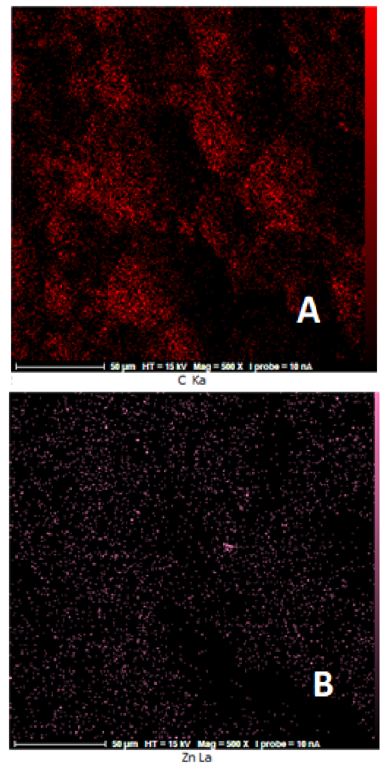
تصویر شماره ۱، مربوط به میکروگراف میکروسکوپ الکترونی است که برای نمونه‌های مختلف انجام شد و حضور نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) را در گروه‌های A و B تایید کرد(۲۳). همچنین با مقایسه گروه کنترل با گروه‌های حاوی ZnO NPs مشاهده شد که افزودن این نانوذرات حفره و ترک را افزایش نداده است.



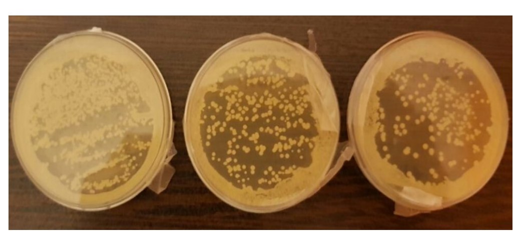
تصویر شماره۱: آنالیز SEM با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰۰ برابر (A: نمونه گروه C، B: نمونه گروه B، C: نمونه گروه A)

تصویر شماره ۲ نیز مربوط به آنالیز میکروگراف MAP برای نمونه گروه A است که پراکندگی کربن که جزء اصلی پلیمر می باشد را نشان می‌دهد و همچنین پراکندگی ZnO NPs را در نمونه مشخص می‌کند که

به صورت یکنواخت پخش شده است. تصویر شماره ۳ نیز مربوط به محیط کشت و کلونی‌های قارچی تشکیل شده در سه گروه مورد مطالعه را نشان می‌دهد. در گروه A با غلظت بالاتر نانو ذرات اکسید روی، تعداد کلنی‌ها کمتر از گروه B بود. در گروه C بیش‌ترین میزان کلنی قارچی مشاهده شد.

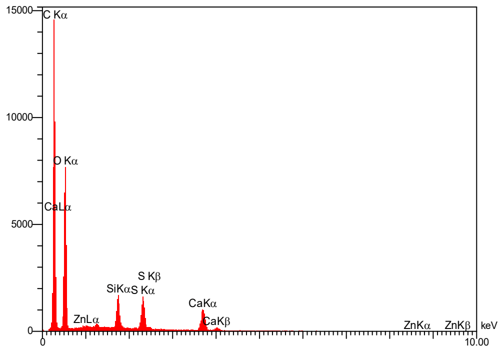


تصویر شماره ۲: تصاویر میکروگراف MAP (A: مربوط به پراکندگی کربن در نمونه گروه A، B: مربوط به پراکندگی ZnO NPs در نمونه گروه A)



تصویر شماره ۳: محیط های کشت و کلنی های قارچی تشکیل شده مربوط به سه نمونه (به ترتیب از سمت راست به چپ: گروه های A، B و C) - کدورت ایجاد شده در اطراف پلیت ها، مربوط به پیچیدن چندین لایه پارافیلم است و نباید با توده مخمری اشتباه گرفته شود.

طیف نشان داده شده در نمودار شماره ۱ مربوط به آنالیز عنصری پراش پرتو ایکس (EDX) مربوط به نمونه گروه A است که حضور ZnO NPs و سایر عناصر سازنده پلیمر شامل گوگرد، سیلیس، کربن، کلسیم و مقادیر آن‌ها را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۱: طیف عنصری پراش پرتو ایکس

جدول شماره ۱ مربوط به آنالیز EDX برای گروه A است که درصد وزنی اجزاء پلیمر و ذرات Zn را نشان می‌دهد. میانگین لگاریتم کلنی های قارچی در گروه‌های مورد بررسی در جدول شماره ۲ گزارش شد. برای مقایسه میان گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ از SPSS 24 استفاده شد. با در نظر گرفتن میزان اطمینان ۹۵ درصد، مقدار $P<۰/۰۵$ محاسبه شد. جدول شماره ۳ نشان داد که افزودن نانوذرات ZnO به دیسک‌های آکریلی، با اثر ضد قارچی همراه است که با افزایش غلظت، این اثر بیش‌تر می‌شود و این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار است.

جدول شماره ۱: جدول آنالیز عنصری پراش پرتو ایکس

ZAF	A%	W%	Kr	K	Int	Line	Elt
۰/۴۵۵۷	۶۴/۷۴	۵۵/۴۳	۰/۱۵۰۵	۰/۴۲۴۷	C	Ka	C
۰/۲۱۱۱	۳۲/۱۶	۳۶/۶۷	۰/۰۹۵۵	۰/۲۶۹۴	O	Ka	O
۰/۷۹۲۷	۰/۷۶	۱/۵۲	۰/۰۳۴۵	۰/۰۹۷۴	Si	Ka	Si
۰/۸۵۰۹	۱/۲۱	۲/۷۷	۰/۰۳۷۹	۰/۱۰۷۰	S	Ka	S
۰/۸۵۶۴	۰/۹۲	۲/۶۲	۰/۰۳۱۴	۰/۰۸۸۵	Ca	Ka	Ca
۰/۴۷۸۹	۰/۲۱	۱/۰۰	۰/۰۰۴۶	۰/۰۱۵۱	Zn	La	Zn

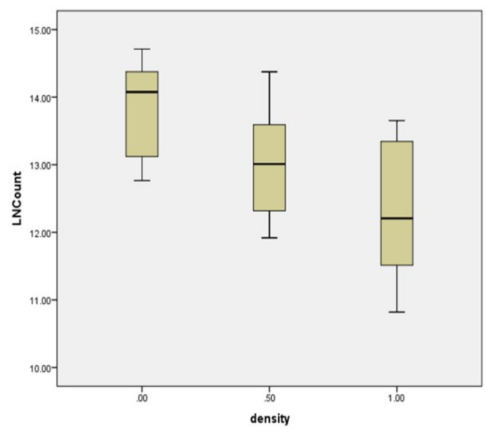
جدول شماره ۲: جدول میانگین، انحراف معیار، Max و Min تعداد کلنی های قارچی

گروه	تعداد نمونه	انحراف معیار ± میانگین	ماکزیمم	مینیمم
A (غلظت ۱)	۲۴	۱۲/۲۸۲۹ ± ۱/۰۸۰۰۷	۱۳/۶۵	۱۰/۸۲
B (غلظت ۰/۵)	۲۴	۱۲/۹۹۷۱ ± ۰/۸۱۲۸۲	۱۴/۳۸	۱۱/۹۲
C (کنترل)	۲۴	۱۳/۸۴۵۱ ± ۰/۶۵۱۸۵	۱۴/۷۱	۱۲/۷۷

جدول شماره۳: نتایج آزمون ANOVA

	Sum of squares	درجه آزادی (df)	Mean square	F	سطح معنی داری
بین گروه ها	۲۹/۳۵۷	۲	۱۴/۶۷۹	۱۹/۵۵۶	<۰/۰۰۱
داخل گروه ها	۵۱/۷۹۱	۶۹	۰/۷۵۱		

نمودار شماره ۲، میانگین تعداد کلنی های قارچی را در گروه های A، B و C نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۲: Stem-and-Leaf Plots

بحث

شایع‌ترین درمان جهت بازسازی دهانی بیماران بی‌دندان، ساخت پروتز متحرک از آکریل PMMA است(۱). با وجود استفاده از داروهای ضد قارچ، عفونت اغلب ادامه می‌یابد و مقاومت علیه بیوفیلم کاندیدا ایجاد می‌شود بدین‌معنی که روش‌های معمول درمانی یا به تنهایی موثر نیستند یا اثر آن‌ها مدوام نیست(۱۰). پیدا کردن رویکردی که مانع چسبندگی قارچ به آکریل رزینی شود ضروری است. یکی از این رویکردها ترکیب کردن یک ماده ضد قارچی با PMMA است(۲۴،۲۵). این ماده با توجه به سازگاری بافتی که دارد به عنوان حامل بسیاری از آنتی‌بیوتیک ها و آنتی اکسیدان‌ها مورد استفاده قرار می گیرد(۲۶).

نانوذرات اکسید روی، به دلیل مزایایی چون قیمت پایین، سمیت کم، نمای سفید و بلوک کردن اشعه ماورا بنفش در مقایسه با نانو ذرات نقره در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. همچنین بررسی خصوصیات مکانیکال کامپوزیت رزین های اصلاح شده با نانو ذرات اکسید روی نشان داده اند که بدون تغییر در استحکام خمشی آن ها باعث بهبود استحکام برشی و فشاری آن‌ها شدند(۲۶). با توجه به مطالعات محدود انجام شده در خصوص ترکیب نانو ذرات اکسید روی و PMMA این مطالعه انجام شد. Gad و همکاران نانوذرات زیرکونیوم اکسید را با PMMA ترکیب کردند و به این نتیجه رسیدند که نمونه‌های آکریلی که با درصد وزنی ۷/۵ درصد نانوذرات زیرکونیا تقویت شده بودند، کم‌ترین تعداد کاندیدا را نشان دادند(۸).

Li و همکاران نانوذرات نقره را با PMMA ترکیب کردند و به این نتیجه رسیدند که بیس‌های رزینی دنچر حاوی نانوذرات نقره فقط در غلظت‌های بالا (۵ درصد) علیه *کاندیدا آلبیکنس* مؤثر هستند(۲۷). Nam و همکاران نانوذرات پلاتینیوم را با PMMA ترکیب کردند و به این نتیجه رسیدند که نانوکامپوزیت پلاتینوم (PtNC) اثر ضد چسبندگی باکتریال قابل توجهی در غلظت‌های بالای mg/l ۵۰ در مقایسه با زمانی که اصلاً این نانوذره وجود نداشت یا مقدار کمی وجود داشت، دارد(۲۸). قهرمانلو و همکاران نانوذرات نقره را با PMMA ترکیب کردند و به این نتیجه رسیدند که اثر ضد قارچی رزین آکریلی حاوی نانوذرات نقره با افزایش زمان تماس و غلظت نانوذرات بیش‌تر می‌شود(۱۹).

مطالعات کریمیان، Cierech، Khan و Lipovsky و همکارانشان نشان داد که ZnO NPs اثرات ضد قارچی دارد(۱۱،۲۲،۹،۳۰). این نانوذرات از طریق تولید ROS باعث سمیت سلولی و مرگ سلول های قارچی می‌شوند(۳۱). فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی

نـانوذرات Zn دلیـل اصـلی بـرای شـروع تحقیـق روی پروتزهای اصلاح شده توسط این نانوذرات بود(۳۲).

در مطالعه کریمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ که به بررسـی اثـر ضـد قـارچی ZnO بـر چسـبندگی *کاندیـدا آلبیکنس* پرداختند، MIC و MFC برای نانوذرات Zn را به‌ترتیب ۲۰۰ μg/ml و ۴۰۰ μg/ml به‌دست آوردند(۲۹). در مطالعه Khan و همکاران در سـال ۲۰۱۳ کـه دربـاره اثر biocidal نـانوذرات اکسـید روی و اکسـید مـس بـر میکروارگانیسم‌های حفره دهـان و تشـکیل بیـوفیلم کـار کردند، به این نتیجه رسیدند کـه ایـن دو نـانوذره باعـث منــع فعالیــت باکتری‌هــای دهــان و تشــکیل بیــوفیلم می‌شود(۱۲). در مطالعـه Lipovsky و همکـاران در سـال ۲۰۱۱ که به بررسی اثر نـانوذرات ZnO بـر زنـده مانـدن *کاندیدا آلبیکنس* پرداختند، بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه حداقل غلظت کشندگی قارچ ۰/۱ mg/ml بود(۳۰).

در این سه مطالعه اثر ضد قـارچی ZnO NPs تأییـد شد که هم جهت با مطالعه حاضر بود، ولی در مطالعـات مذکور مهار رشد قارچ گزارش شد در صـورتی کـه در این مطالعه کاهش رشد قارچ مشاهده شـد و اثـر مهـاری دیده نشد. این اختلاف می‌تواند به این علت باشد که در مطالعــه کریمیــان سوسپانســیون نــانوذرات تهیــه شــد و *کاندیدا آلبیکنس* به ایـن سوسپانسـیون اضـافه شـد و در مطالعه Liposky و Khan نیز مقادیر مشـخص نـانوذرات ZnO مستقیماً به محیط کشت *کاندیدا آلبیکنس* اضـافه شد. در هیچ یک از سه مطالعه‌ی مذکور، این نـانوذرات با ماده‌ی جامدی ترکیب نشدند، اما در مطالعـه‌ی حاضـر از آن‌جا که نانوذرات ZnO درون دیسک‌های آکریلـی محبوس شده بودند، در کوتاه مـدت بـه خـوبی قـادر بـه اعمال اثر ضد میکروبی نبودند و تنها نـانوذرات سـطحی بودند که این اثر ضد میکروبی را اعمال می‌کردند. اگـر نانوذرات با یک سوسپانسیون مخلوط گردند و سپس در مجاورت قارچ قرار گیرند در مقایسـه بـا ایـن کـه درون نمونه‌های جامد آکریلی قرار گیرند، شاید اثر بیش‌تـری اعمال کنند(۱۹). همچنین خواص سطحی آکریل رزینـی مثل خشونت سطحی و تخلخـل ظـاهری و تـرک را کـه می‌تواند به‌عنوان مخزنـی بـرای میکروارگانیسـم‌ها عمـل کند، باید در نظر گرفت(۴۵). در مطالعـه Lipovsky سـایز نانوذرات ZnO از ۶/۸ تا ۱۱/۶ نـانومتر بـود در صـورتی که سایز نانوذرات در مطالعه ما بین ۱۰ تا ۳۰ نانومتر بود. از آن‌جایی که کم‌تر بودن سایز نانوذرات باعث افـزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه اثر ضد قـارچی بیش‌تـر می‌شود، می‌توان این اختلاف را توجیه کرد(۱۹).

مطابق نتیجه مطالعه حاضر، تعداد کلنی‌های قـارچی بـا افـزایش مقـدار و غلظـت نـانوذرات ZnO بـه طـور معناداری کاهش یافت. Raghunath و همکـاران نیـز در مطالعه‌ی خـود نشـان دادنـد کـه فعالیـت ضـد میکروبـی نانوذرات ZnO نسبت مستقیمی با غلظت آن‌ها دارد(۳۱).

در مطالعه Cierech و همکاران در سال ۲۰۱۶ که به تهیه و توصـیف خـواص PMMA resin nanocomposite جهت ساخت بیس دنچر پرداختنـد، فعالیـت بیولوژیـک ZnO بـر *کاندیـدا آلبیکـنس* را تأییـد کردنـد و حـداقل غلظت مهـاری (MIC) در سـطح ۰/۷۵ mg/ml به‌دسـت آمد(۱۸). آن‌ها مهـار رشـد قـارچ را گـزارش کردنـد در صورتی که در مطالعه حاضر کاهش رشد قارچ مشـاهده شد و اثر مهاری دیده نشد که این اختلاف به ایـن علـت است که آن‌هـا ابتـدا اثـرات ضـد قـارچی ZnO NPs را بررسی کردند و MIC را به‌دست آورند و سپس با رزین آکریلی ترکیب کردند و پس از ترکیـب کـردن نـانوذرات اثر ضد قارچی را بررسی نکردند و تنها خشونت سطحی و مورفولوژی نانوکامپوزیت را مورد بررسی قرار دادنـد و به این نتیجه رسیدند که می‌تـوان ایـن نـانوذرات را بـا آکریل رزینی ترکیب کرد.

در مطالعـه Anwander و همکـاران در سـال ۲۰۱۷ که به بررسی تشکیل بیوفیلم بر بیس دنچر رزینی حـاوی نانوذرات ZnO و CaO و TiO_2 با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ و ۰/۴ و ۰/۸ درصد وزنی پرداختند، به این نتیجه رسیدند که تغلیظ مواد بیس دنچر رزینی با ایـن نـانوذرات، مـانع تشکیل بیوفیلم روی سطح نمی‌شود که خـلاف نتیجـه‌ی

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.201.15.3]

مطالعه حاضر بود(۲۰). این مورد می‌تواند ناشی از تفاوت در سایز نانوذرات در دو مطالعه باشد، چرا که آن‌ها سایز نانوذرات را به‌طور غیر دقیق و تنها کمتر از ۱۰۰ نانومتر اعلام کردند، در حالی که سایز نانوذرات مطالعه حاضر ۱۰-۳۰ نانومتر بود. کمتر بودن سایز نانوذرات باعث افزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه اثر ضد قارچی بیش‌تر می‌شود(۱۹).

در مجموع براساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و با توجه به محدودیت‌های آن، این فرضیه‌ها که دنچر آکریلی اصلاح شده با نانوذرات اکسید روی در مقایسه با گروه کنترل، اثر ضد قارچی دارند و این اثر ضد قارچی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد، تأیید شد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل از پایان‌نامه دانشجویی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران با شماره ۵۷۵ و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1398.180 می باشد. از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت حمایت‌های مالی، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

References

1. Cierech M, Kolenda A, Grudniak AM, Wojnarowicz J, Woźniak B, Gołaś M, et al. Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. Int J Pharm 2016; 510(1): 323-335.
2. Gad MM, Fouda SM, Al-Harbi FA, Näpänkangas R, Raustia A. PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. Int J Nanomedicine 2017; 12: 3801-3812.
3. Raj PA, Dentino AR. New phosphated poly (methyl methacrylate) polymers for the prevention of denture-induced microbial infection: an in vitro study. Clin Cosmeti Investig Dent 2011; 3: 25-32.
4. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaee N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Med Mycol 2011; 49(2): 208-211.
5. Pattanaik S, Vikas B, Pattanaik B, Sahu S, Lodam S. Denture stomatitis: a literature review. J Indian Acad Oral Med Radiol. 2010; 22(3): 136-140.
6. Govindswamy D, Rodrigues S, Shenoy VK, Shenoy S, Shenoy R, Yadav TJJoNDA-J, et al. The influence of surface roughness on the retention of Candida albicans to denture base acrylic resins–An in vitro study. JNDA 2014; 14(1): 1-9.
7. Govindswamy D, Rodrigues S, Shenoy VK, Shenoy S, Shenoy R, Yadav T, et al. The influence of surface roughness on the retention of Candida albicans to denture base acrylic resins–An in vitro study. JNDA 2014; 14(1): 1-9.
8. Gad MM, Al-Thobity AM, Shahin SY, Alsaqer BT, Ali AA. Inhibitory effect of zirconium oxide nanoparticles on Candida albicans adhesion to repaired polymethyl methacrylate denture bases and interim removable prostheses: a new approach for denture stomatitis prevention. Int J Nanomedicine 2017; 12: 5409-5419.
9. Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Take C, Kurono A, Nagaoka E. Examination of

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.201.15.3]

denture-cleaning methods based on the quantity of microorganisms adhering to a denture. Gerodontology. 2012; 29(2): e259-e266.
10. Wady A, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini C, Berni E, Vergani CE. Evaluation of Candida albicans adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. J Appl Microbiol 2012; 112(6): 1163-1172.
11. Nuñez-Anita RE, Acosta-Torres LS, Vilar-Pineda J, Martínez-Espinosa JC, de la Fuente-Hernández J, Castaño VMJIJon. Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. Int J Nanomed 2014; 9: 3999-4006
12. Khan ST, Ahamed M, Al-Khedhairy A, Musarrat J. Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. Mater Lett. 2013; 97: 67-70.
13. Darabi N, Roudbar Mohammadi S, Naderi Manesh H, Mostafai A, Vahidi M. Antifungal effect of Zinc oxide nano_particlees of the standard strains of candida albicansbiofim growth on catheters. Ann Mil Health Sci Res 2012; 10(3): 207-212.
14. Vimbela GV, Ngo SM, Fraze C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. Int J nanomedicine. 2017; 12: 3941-3965.
15. Nuñez-Anita RE, Acosta-Torres LS, Vilar-Pineda J, Martínez-Espinosa JC, de la Fuente-Hernández J, Castaño VM. Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. Int J Nanomed 2014; 9: 3999-4006.
16. Siddiqi KS, ur Rahman A, Husen A. Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes. Nanoscale Res Lett 2018; 13(1): 141.
17. Araujo-Lima CF, Nunes RJ, Carpes RM, Aiub CA, Felzenszwalb I. Pharmacokinetic and toxicological evaluation of a zinc gluconate-based chemical sterilant using in vitro and in silico approaches. Biomed Res Int 2017; 2017: 5746768.
18. Miles AA, Misra S, Irwin J. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg (Lond) 1938; 38(6): 732-749.
19. Ghahremanloo A, Rajabi O, Ghazvini K, Mirmortazavi A, Motevali Haghighi M. Antifungal effect of silver nanoparticles in acrylic resins. J Mash Dent Sch 2013; 37(3): 239-248.
20. Anwander M, Rosentritt M, Schneider-Feyrer S, Hahnel S. Biofilm formation on denture base resin including ZnO, CaO, and TiO_2 nanoparticles. J Adv Prosthodont 2017; 9(6): 482-485.
21. Nawasrah A, AlNimr A, Ali A. Antifungal effect of Henna against Candida albicans adhered to acrylic resin as a possible method for prevention of denture stomatitis. Int J Environ Res Public Health 2016; 13(5): 520.
22. Anaraki MR, Jangjoo A, Alimoradi F, Dizaj SM, Lotfipour F. Comparison of Antifungal Properties of Acrylic Resin Reinforced with ZnO and Ag Nanoparticles. Pharm Sci 2017; 23(3): 207-214.
23. Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Castaño VM. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. Int J Nanomed 2012; 7: 4777-4786.
24. Formosa C, Schiavone M, Boisrame A, Richard ML, Duval RE, Dague E. Multiparametric imaging of adhesive nanodomains at the surface of Candida

albicans by atomic force microscopy. Nanomedicine 2015; 11(1): 57-65.

25. Karimiyan A, Najafzadeh H, Ghorbanpour M, Hekmati-Moghaddam SHJZJoRiMS. Antifungal effect of magnesium oxide, zinc oxide, silicon oxide and copper oxide nanoparticles against Candida albicans. Zahedan J Res Med Sci 2015; 17(10): e2179.
26. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart RJN. Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. Nanotechnology 2011; 22(10): 105101.
27. Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on Candida albicans adhesion and biofilm formation. Gerodontology. 2016; 33(2): 209-216.
28. Nam KY, Lee CH, Lee CJ. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. Gerodontology 2012; 29(2): e413-e419.
29. Karimiyan A, Najafzadeh H, Ghorbanpour M, Hekmati-Moghaddam SH. Antifungal effect of magnesium oxide, zinc oxide, silicon oxide and copper oxide nanoparticles against Candida albicans. Zahedan J Res Med Sci 2015; 17(10): e2179.
30. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. Nanotechnology 2011; 22(10): 105101.
31. Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. Int J Antimicrob Agents 2017; 49(2): 137-152.
32. Cierech M, Osica I, Kolenda A, Wojnarowicz J, Szmigiel D, Łojkowski W, et al. Mechanical and Physicochemical Properties of Newly Formed ZnO-PMMA Nanocomposites for Denture Bases. Nanomaterials 2018; 8(5): 305.

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.201.15.3]