

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

Kosar Dadgar^{1,2}
 Leila Shadan³
 Maryam Moazeni^{4,5}
 Pourya Biparva⁶
 Jamshid Yazdani Charati⁷
 Zahra Ebrahimi⁸, Mehdi Aryana⁹

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)

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

کوثر دادگر^{۲،۱}لیلا شادان^۳مریم موذنی^{۵،۴}پوريا بی پروا^۶جمشید یزدانی چراتی^۷زهرا ابراهیمی^۸مهدی آریانا^۹

چکیده

سابقه و هدف: پروتوزهای متحرک ساخته شده از پلی متیل متاکریلات 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 آکريل رزینی اصلاح شده با نانوذرات اکسید روی، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ۷۲ دیسک با ابعاد ۴×۱۰ میلی متر از جنس پلی متیل متاکریلات (Iran، Acropars، Marlic) به سه گروه ۲۴ تایی تقسیم شدند. غلظت نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) در گروه های مورد مطالعه، ۱ (گروه A)، ۰/۵ (گروه B) و ۰ (گروه C، کنترل) میلی گرم بر میلی لیتر بود. نمونه ها در محیط آزمایشگاه با استفاده از سویه های کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) مطابق با سند توصیه شده استاندارد بالینی و آزمایشگاهی M27-S4 و A3 ارزیابی شدند. آنالیز آماری با استفاده از آزمون های ANOVA یک طرفه و Scheffe's post-test در نرم افزار SPSS 24 انجام شد.

یافته ها: میانگین شمارش کلنی های قارچی در گروه های مطالعه حاضر متفاوت بود. مقدار کلنی های قارچی در گروه B کم تر از گروه C و در گروه A کم تر از گروه B بود. این تفاوت بین گروه ها از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/05$).
استنتاج: با در نظر گرفتن محدودیت های مطالعه ی 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 به طور فزاینده ای در بازسازی دهان بیماران بی دندان مورد استفاده قرار می گیرد، اما همچنان شایع ترین درمان استفاده از پروتوزهای متحرک ساخته شده از پلی متیل متاکریلات

E-mail: kosar.dadgar@gmail.com

مؤلف مسئول: کوثر دادگر - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده دندانپزشکی

۱. استادیار، گروه پروتوزهای دندانی، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه پروتوزهای 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. دانشیار، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۹. دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۲ 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 (۴-۶). 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 می‌شود (۹). البته روش‌های تمیز کردن مکانیکی به تنهایی برای کاهش سطح میکروارگانیسم‌ها 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 پروتئین‌های 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 (۱۶، ۱۷). 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 روش‌ها

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 الف ۰/۵ 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 غلظت‌های ۱ mg/ml (گروه A) و ۰/۵ mg/ml (گروه B) از نانوذرات ZnO و فاقد نانوذرات اکسید روی (گروه C، کنترل) ساخته

شد (۱۸). برای تهیه نمونه ها، نانوذرات ZnO (شرکت پیشگامان تولید نانو مواد ایران) با سایز ۱۰ تا ۳۰ نانومتر به جزء مایع آکريل (Acropars, Marlic, Iran) اضافه شد و سپس برای ۴ بار به مدت ۱۵ دقیقه تحت اولتراسونیک قرار گرفت تا به صورت یکنواخت داخل مایع آکريل بخش و هموزن شود. محلول استوک ZnO (محلول مادر با غلظت بیش تر) تهیه شد و در مراحل بعدی برای به دست آوردن غلظت های ۰/۵ mg/ml و ۱ mg/ml از نانو ذرات ZnO، با مایع آکريل رقیق شد. برای تهیه دیسک های آکريلي 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 ست شدن گچ، پوتی (Speedex, Coltene whaledent, Swiss) به ضخامت ۱۰ mm روی آن قرار داده شد. در حالی که پوتی در حال ست شدن بود، استوانه های 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 قرار گرفت و بعد از ۳ ساعت، استوانه های فلزی بیرون آورده شد. به این ترتیب فضای خالی با ابعاد مشخص ایجاد شد (۱۹). برای تهیه خمیر آکريلي، مایع مونومر ترکیب شده با ZnO NPs با پودر آکريل 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°C به مدت ۶ ساعت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، مفل باز شد و نمونه ها از درون گچ در آورده شدند. توسط فرز آکريل، اضافات تراشیده و درون سرم فیزیولوژی قرار داده شد (۱۹).

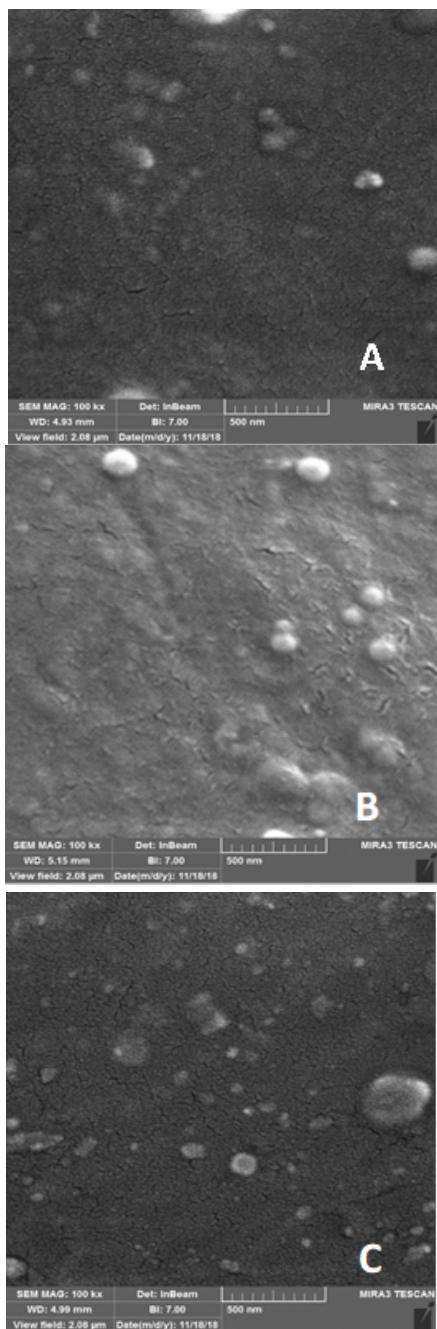
بررسی میکروسکوپی نمونه ها

از آنالیز FE-SEM^۱، EDX^۲ و MAP برای شناسایی مورفولوژی و پراکنش و درصد اجزای

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

تست حساسیت ضد قارچی

تست حساسیت ضد قارچی طبق دستورالعمل های استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، M27-A3 و M27-S4 بر روی ۲۴ سویه از کاندیدا/آلیکنس (ACCT 10231) که از سازمان تحقیقات علم و تکنولوژی ایران (IROST) خریداری شد، و با کمی اصلاحات انجام شد (۲۱). سویه های کاندیدا در محیط استاندارد RPMI 1640 (Sigma chemical Co.) که با استفاده از (N-Morpholino)-۳-۱۶۵ پروپانسلوفونیک اسید (MOPS, sigmachemical Co.) با I-گلوتامین بدون بیکربنات، تا pH=۷/۰ بافر شده بود، کشت داده شدند. سپس دیسک های گروه های A، B و C در ۲۴ چاهک (well) پلیت های میکرودايلوژن (Nunc, UK) قرار گرفتند. سوسپانسیون های مخمر از ایزوله هایی که به مدت ۲۴-۷۲ ساعت رشد کرده



تصویر شماره ۱: 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 کرین که جزء اصلی پلیمر می باشد را نشان می دهد و همچنین پراکندگی ZnO NPs را در نمونه مشخص می کند که

بودند، تهیه شدند. سپس این سوسپانسیون ها در یک محلول سالین استریل معلق شده و با اندازه گیری های 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 $2/5 \times 10^3$ CFU/ml شد. چاهک های بدون دارو و بدون مخمر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. پلیت های میکرودايلویشن در دمای 35°C انکوبه شده و بعد از ۲۴ ساعت مورد بررسی بصری قرار گرفتند.

تعیین CFU/ml

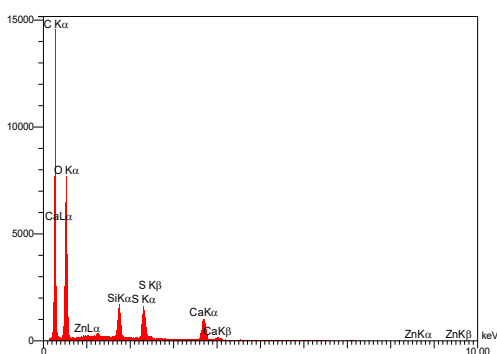
برای کمی سازی نتایج از CFU/ml استفاده شد. جهت تعیین CFU/ml از متد Miles استفاده شد (۲۲). یک کشت از رقت $1/1000$ از هر چاهک در نظر گرفته شد. در هر محیط کشت (سابورود کستروز آگار همراه با پن استرپ) به میزان $20 \mu\text{l}$ (0.2 ml) از هر نمونه کشت داده شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 35°C خوانده شد و CFU/ml با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید و سپس تحت آنالیز قرار گرفت.

$$(\text{Number of colonies} * \text{Dilution factor}) / \text{Volume of culture plate}$$

یافته ها

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

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.

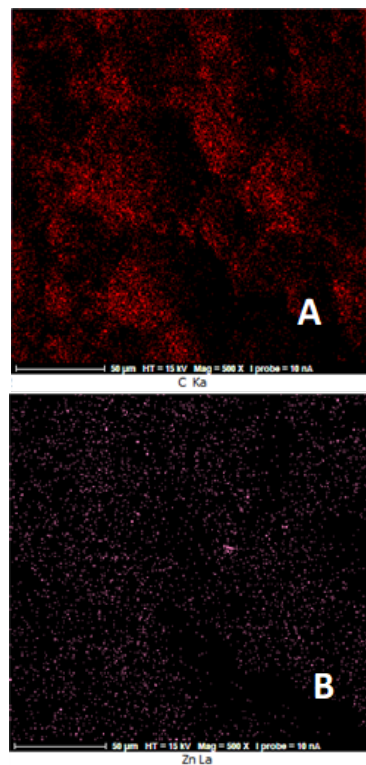


نمودار شماره ۱: طیف عنصری پراش پرتو ایکس

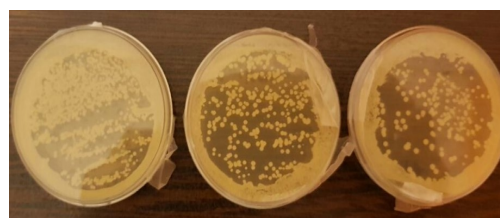
جدول شماره ۱ مربوط به آنالیز EDX برای گروه A است که درصد وزنی اجزاء پلیمر و ذرات Zn را نشان می‌دهد. میانگین لگاریتم کلنی‌های قارچی در گروه‌های مورد بررسی در جدول شماره ۲ گزارش شد. برای مقایسه میان گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ از SPSS 24 استفاده شد. با در نظر گرفتن میزان اطمینان ۹۵ درصد، مقدار $P < 0/05$ 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



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: محیط‌های کشت و کلنی‌های قارچی تشکیل شده مربوط به سه نمونه (به ترتیب از سمت راست به چپ: گروه‌های A، B و C) - کدورت ایجاد شده در اطراف پلیت‌ها، مربوط به پیچیدن چندین لایه پارافیلیم است و نباید با توده مخمری اشتباه گرفته شود.

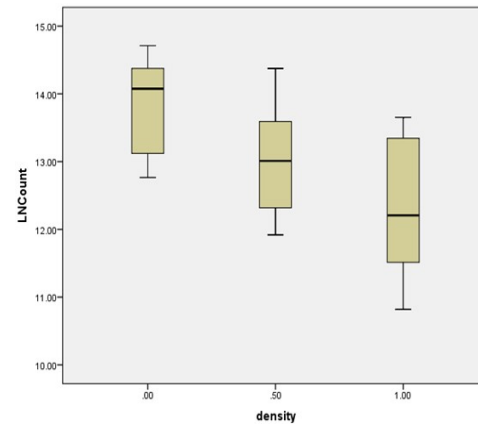
جدول شماره ۲: جدول میانگین، انحراف معیار، Max و Min

گروه	تعداد نمونه	انحراف معیار $\pm$ میانگین	ماکزیمم	مینیمم
A (غلظت ۱)	۲۴	$12/2829 \pm 1/0007$	۱۳/۶۵	۱۰/۸۲
B (غلظت ۰/۵)	۲۴	$12/9971 \pm 0/1282$	۱۴/۳۸	۱۱/۹۲
C (کنترل)	۲۴	$13/8451 \pm 0/65185$	۱۴/۷۱	۱۲/۷۷

جدول شماره ۳: نتایج آزمون ANOVA

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

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



نمودار شماره ۲: Stem-and-Leaf Plots

بحث

شایع ترین درمان جهت بازسازی دهانی بیماران بی دندان، ساخت پروتز متحرک از آکریل PMMA است (۱). با وجود استفاده از داروهای ضد قارچ، عفونت اغلب ادامه می یابد و مقاومت علیه بیوفیلم کاندیدا ایجاد می شود بدین معنی که روش های معمول درمانی یا به تنهایی موثر نیستند یا اثر آن ها مداوم 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 (۲۴۲۵). این ماده با توجه به سازگاری بافتی که دارد به عنوان حامل

بسیاری از آنتی بیوتیک ها و آنتی اکسیدان ها 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 آن ها 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 زیر کونیوم اکسید را با PMMA ترکیب کردند و به این نتیجه رسیدند که نمونه های آکریلی که با درصد وزنی ۷/۵ درصد نانوذرات زیر کونیوم تقویت شده بودند، کم ترین تعداد کاندیدا را نشان دادند (۸).

Li و همکاران نانوذرات نقره را با PMMA ترکیب کردند و به این نتیجه رسیدند که بیس های رزینی دنچر حاوی نانوذرات نقره فقط در غلظت های 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 نانو کامپوزیت پلاتینیوم (PtNC) اثر ضد چسبندگی باکتریال قابل توجهی در غلظت های بالای ۵۰ mg/l 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 بیش تر می شود (۱۹).

مطالعات کریمیان، Cierech، Khan و Lipovsky و همکارانشان نشان داد که ZnO NPs اثرات ضد قارچی دارد (۱۱۲۲۹۳۰). این نانوذرات از طریق تولید ROS باعث سمیت سلولی و مرگ سلول های قارچی می شوند (۳۱). فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی

نانوذرات Zn دلیل اصلی برای شروع تحقیق روی پروتئزهای اصلاح شده توسط این نانوذرات بود (۳۲).

در مطالعه کریمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ که به بررسی اثر ضد قارچی ZnO بر چسبندگی کاندیدا/آلبیکس پرداختند، MIC و MFC برای نانوذرات Zn را به ترتیب $200 \mu\text{g/ml}$ و $400 \mu\text{g/ml}$ به دست آوردند (۲۹). در مطالعه Khan و همکاران در سال ۲۰۱۳ که درباره اثر biocidal نانوذرات اکسید روی و اکسید مس بر میکروارگانیسم‌های حفره دهان و تشکیل بیوفیلم کار کردند، به این نتیجه رسیدند که این دو نانوذره باعث منع فعالیت باکتری‌های دهان و تشکیل بیوفیلم می‌شود (۱۲). در مطالعه Lipovsky و همکاران در سال ۲۰۱۱ که به بررسی اثر نانوذرات ZnO بر زنده ماندن کاندیدا/آلبیکس پرداختند، به این نتیجه رسیدند که حداقل غلظت کشندگی قارچ 0.1 mg/ml بود (۳۰).

در این سه مطالعه اثر ضد قارچی ZnO NPs تأیید شد که هم جهت با مطالعه حاضر بود، ولی در مطالعات مذکور مهار رشد قارچ گزارش شد در صورتی که در این مطالعه کاهش رشد قارچ مشاهده شد و اثر مهاري دیده نشد. این اختلاف می‌تواند به این علت باشد که در مطالعه کریمیان سوسپانسیون نانوذرات تهیه شد و کاندیدا/آلبیکس به این سوسپانسیون اضافه شد و در مطالعه Lipovsky و Khan نیز مقادیر مشخص نانوذرات ZnO مستقیماً به محیط کشت کاندیدا/آلبیکس اضافه شد. در هیچ یک از سه مطالعه‌ی مذکور، این نانوذرات با ماده‌ی جامدی ترکیب نشدند، اما در مطالعه‌ی حاضر از آنجا که نانوذرات ZnO درون دیسک‌های آکریلی محبوس شده بودند، در کوتاه مدت به خوبی قادر به اعمال اثر ضد میکروبی نبودند و تنها نانوذرات سطحی بودند که این اثر ضد میکروبی را اعمال می‌کردند. اگر نانوذرات با یک سوسپانسیون مخلوط گردند و سپس در مجاورت قارچ قرار گیرند در مقایسه با این که درون نمونه‌های جامد آکریلی قرار گیرند، شاید اثر پیش‌تری اعمال کنند (۱۹). همچنین خواص سطحی آکریل رزینی

مثل خشونت سطحی و تخلخل ظاهری و ترک را که می‌تواند به عنوان مخزنی برای میکروارگانیسم‌ها عمل کند، باید در نظر گرفت (۴۵). در مطالعه Lipovsky سائز نانوذرات ZnO از $6/8$ تا $11/6$ نانومتر بود در صورتی که سائز نانوذرات در مطالعه ما بین 10 تا 30 نانومتر بود. از آنجایی که کم‌تر بودن سائز نانوذرات باعث افزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه اثر ضد قارچی بیش‌تر می‌شود، می‌توان این اختلاف را توجیه کرد (۱۹).

مطابق نتیجه مطالعه حاضر، تعداد کلنی‌های قارچی با افزایش مقدار و غلظت نانوذرات ZnO به طور معناداری کاهش یافت. Raghunath و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی نانوذرات ZnO نسبت مستقیمی با غلظت آن‌ها دارد (۳۱). در مطالعه Cierech و همکاران در سال ۲۰۱۶ که به تهیه و توصیف خواص PMMA resin nanocomposite جهت ساخت بیس دنچر پرداختند، فعالیت بیولوژیک ZnO بر کاندیدا/آلبیکس را تأیید کردند و حداقل غلظت مهاري (MIC) در سطح 0.75 mg/ml به دست آمد (۱۸). آن‌ها مهار رشد قارچ را گزارش کردند در صورتی که در مطالعه حاضر کاهش رشد قارچ مشاهده شد و اثر مهاري دیده نشد که این اختلاف به این علت است که آن‌ها ابتدا اثرات ضد قارچی ZnO NPs را بررسی کردند و MIC را به دست آوردند و سپس با رزین آکریلی ترکیب کردند و پس از ترکیب کردن نانوذرات اثر ضد قارچی را بررسی نکردند و تنها خشونت سطحی و مورفولوژی نانوکامپوزیت را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که می‌توان این نانوذرات را با آکریل رزینی ترکیب کرد.

در مطالعه Anwender و همکاران در سال ۲۰۱۷ که به بررسی تشکیل بیوفیلم بر بیس دنچر رزینی حاوی نانوذرات ZnO و CaO و TiO_2 با غلظت‌های 0.1 و 0.2 و 0.4 و 0.8 درصد وزنی پرداختند، به این نتیجه رسیدند که تغلیظ مواد بیس دنچر رزینی با این نانوذرات، مانع تشکیل بیوفیلم روی سطح نمی‌شود که خلاف نتیجه‌ی

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 می‌باشد. از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت حمایت‌های مالی، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

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

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, Nāpānkangas 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 Cosmetol Investig Dent* 2011; 3: 25-32.
4. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei 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

- 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 VM. Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. *Int J Nanomed* 2014; 9: 3999-4006.
 12. Khan ST, Ahamed M, Al-Khedhairi 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 nanoparticles of the standard strains of *Candida albicans* biofilm growth on catheters. *Ann Mil Health Sci Res* 2012; 10(3): 207-212.
 14. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee 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. Anwender M, Rosentritt M, Schneider-Feyrer S, Hahnel S. Biofilm formation on denture base resin including ZnO, CaO, and TiO₂ 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.