Evaluation of the Effect of Farnesol and/or Chitosan as a Final Irrigation on *Enterococcus faecalis* Biofilm; An In-vitro Study

Ardavan Moinafshar[1], Hanieh Paik[2], Rashid Ramazanzadeh[3], Amjad Ahmadi [4], Mohammad Rastegar Khosravi [5]

1. Dentist, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5093-1223
2. Dentist, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3120-2540
3. Professor, Department of Microbiology, School of Medicine and Researcher in Cellular & Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 6352 -1644- 0000-0002
4. MSc of Medical Microbiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9722-8826
5. Assistant Professor, Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, (Corresponding Author), Tel: 087-33629048, E-mail: mr.khosravi@muk.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-9023-1608

ABSTRACT

Background and Aim: Complete cleaning of the tooth root canal plays an important role in the success of endodontic treatments, which can be done with the help of mechanical and chemical methods. Two antibacterial detergents, farnesol and chitosan, have been proposed for removal and reduction of microbial species. The aim of this study was to investigate the antibacterial effect of farnesol and/or chitosan on *Enterococcus faecalis* biofilm.

Materials and Methods: In this experimental-laboratory study, the standard strain of *Enterococcus faecalis* was cultured in BHI broth medium for 7 and 21 days. Then, the biofilms were exposed to farnesol and chitosan as the antimicrobial substances. The antimicrobial effects of these substances on the growth of biofilm were investigated by analyzing the color spectrum of Confocal Laser Scanning Microscopy images.

Results: In comparison to the positive control group, farnesol reduced the number of live bacteria by 54.67% and 36.54% in the biofilms formed after 7 and 21 days, respectively. These figures were 64.08% and 39.05%, for chitosan respectively. The combination of farnesol and chitosan was able to reduced live bacteria by 82.77% and 60.91% in 7 and 21 day biofilm, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that use of farnesol and chitosan alone or in combination could destroy the living cells of *Enterococcus faecalis* biofilm. Combination of farnesol and chitosan had the greatest effect on destroying biofilm bacteria in both groups. Therefore, we recommend use of the combination of farnesol and chitosan for irrigation of the root canal, especially in the re-treatment of the root and teeth with periapical lesions.

Key words: *Enterococus faecalis*, Biofilm, Farnesol, Chitosan

Received: Nov 28, 2022 **Accepted:** Sep 5, 2023

How to cite the article: Ardavan Moinafshar, Hanieh Paik, Rashid Ramazanzadeh, Amjad Ahmadi, Mohammad Rastegar Khosravi . Evaluation of the Effect of Farnesol and/or Chitosan as a Final Irrigation on *Enterococcus faecalis* Biofilm; An In-vitro Study.ŞJKU 2024;29(1):85-97.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و نه / فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۳/۹۷-۸۵

بررسی تأثیر فارنزول و/یا چیتوزان به عنوان ماده شست و شو دهنده نهایی کانال ریشه دندان بر بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس: یک مطالعه آزمایشگاهی

اردوان معین افشار[۱]، هانیه پیک[۲]، رشید رمضان زاده[۳]، امجد احمدی [۴]، محمد رستگار خسروی [۵]

۱. دندانپزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۱۲۲۳-۵۰۹۳-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۲. دندانپزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۲۵۴۰-۳۱۲۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. استاد، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۶۳۵۲-۱۶۴۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۴. کارشناس ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۸۸۲۶-۹۷۲۲-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۵. استادیار، گروه اندودانتیکس، عضو هیئت علمی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، (نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: ۳۳۶۲۹۰۴۸-۰۸۷، پست الکترونیک: mr.khosravi@muk.ac.ir، کد ارکید: ۱۶۰۸-۹۰۲۳-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

مقدمه: پاکسازی کامل کانال ریشه دندان در موفقیت درمان‌های اندودانتیک نقش مهمی دارد که این امر به کمک روش‌های مکانیکی و شیمیایی قابل انجام است. دو ماده شستشو دهنده ضد باکتریال فارنزول و چیتوزان جهت حذف و کاهش گونه های میکروبی پیشنهاد شده‌اند. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر ضد باکتریایی فارنزول و/یا چیتوزان بر روی بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه‌ی تجربی- آزمایشگاهی، سویه استاندارد باکتری انتروکوکوس فکالیس در محیط BHI براث به مدت ۷ و ۲۱ روز کشت داده شد. سپس، بیوفیلم حاصل در معرض فارنزول و چیتوزان به عنوان مواد ضد میکروبی قرار داده شد. میزان تأثیر آن‌ها بر رشد بیوفیلم با روش آنالیز طیف رنگی تصاویر میکروسکوپ کانفوکال مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: فارنزول در گروه بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه به ترتیب ۵۴/۶۷٪ و ۳۶/۵۴٪ و چیتوزان به ترتیب ۶۴/۰۸٪ و ۳۹/۰۵٪ از جمعیت باکتری های زنده را نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش دادند. ترکیب فارنزول و چیتوزان توانست به ترتیب ۸۲/۷۷٪ و ۶۰/۹۱٪ باکتری های زنده را در بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه را کاهش دهد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از فارنزول و چیتوزان به تنهایی و یا در ترکیب با هم توانست باعث از بین رفتن سلول‌های زنده بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس شود. استفاده از ترکیب فارنزول و چیتوزان بیشترین تأثیر را در از بین بردن باکتری‌های بیوفیلم در هر دو گروه داشت؛ لذا استفاده از ترکیب فارنزول و چیتوزان در شستشوی کانال ریشه به خصوص در درمان های مجدد ریشه و دندان‌های دارای ضایعه پری آپیکال پیشنهاد می شود.

کلمات کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، بیوفیلم، فارنزول، چیتوزان

وصول مقاله:۱۴۰۱/۹/۷ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۲/۴/۱۱ پذیرش:۱۴۰۲/۶/۱۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

مقدمه

علت اصلی ایجاد التهاب در بافت پالپ و پری آپیکال دندان باکتری‌ها هستند که باعث تجمع عوامل التهابی و ایمنی در ناحیه پری آپیکال و ایجاد واکنش‌های دفاعی می‌شوند (۲،۱). هنگامی که بافت پالپ دندان به علت آلوده شدن توسط باکتری ها نکروتیک می شود و حیات خود را به صورت کامل یا نسبی از دست می‌دهد، درمان اندودانتیک برای دندان ضرورت پیدا می‌کند (۳). لازمه موفقیت درمان ریشه به حداقل رساندن میکرو ارگانیسم‌های موجود در سیستم کانال ریشه است و هرچه میزان این میکرو ارگانیسم‌ها در کانال ریشه کمتر باشد، احتمال موفقیت درمان بیشتر است (۴)؛ بنابراین دبریدمان فیزیکی و شیمیایی جهت به حداقل رساندن و یا حذف میکرو ارگانیسم های داخل کانال ریشه امری ضروری است (۵،۶).

عفونت های اندودانتیک اولیه به علت کلونیزاسیون باکتری‌ها در کانال ریشه دندان دارای پالپ نکروز شده به وجود می آیند، عفونت های اندودنتیک اولیه غالباً ماهیت چند میکروبی دارند؛ اما باکتری‌های دخیل در این امر به طور عمده از باکتری‌های گرم منفی و بی‌هوازی تشکیل شده است (۷). در مقابل، عفونت های ثانویه و مقاوم به درمان، در دندان هایی مشاهده می شود که درمان ریشه برای آن‌ها انجام گرفته است. بر اساس مطالعات مختلف باکتری‌های دخیل در تشکیل عفونت‌های ثانویه و مقاوم به درمان اندودانتیک، عمدتا باکتری‌های گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که توانایی زنده ماندن و کلونیزاسیون در شرایط سخت محیطی را دارند که از میان آن‌ها باکتری انتروکوکوس فکالیس مهم‌ترین نقش را دارد و معمولاً با شکست درمان ریشه مرتبط می باشند (۹،۸). حذف باکتری انتروکوکوس فکالیس از کانال ریشه به کمک روش‌های فیزیکی و شیمیایی همچنان یک چالش کلینیکی در درمان اندودانتیک محسوب می شود؛ بنابراین، رویکردهای تکمیلی جهت ضد عفونی داخل کانال ریشه با هدف رسیدن به یک درمان ریشه مؤثر و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و انتشار باکتری انتروکوکوس فکالیس به سایر نقاط بدن ضروری است (۱۰).

بیوفیلم اجتماعی از سلول های میکروبی است که توسط یک ماتریکس پلی ساکاریدی احاطه می شوند و یک محیط ایده آل را برای تبادل مواد ژنتیکی، فاکتور های ویرولانس، مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها و تأثیر آنتی‌بادی ها فراهم می‌کند. در نتیجه از بین بردن بیوفیلم در بدن میزبان بسیار مشکل است (۱۱،۱۰). باکتری ها در بیوفیلم ۱۰۰۰ برابر بیشتر از سلول‌های پلانکتونیک (باکتری‌ها به صورت آزاد) نسبت به مواد آنتی باکتریال مقاوم هستند و از بهبود پریودنتیت پری رادیکولار جلوگیری می‌کنند؛ بنابراین یکی از عوامل موفقیت در درمان کانال ریشه دندان، از بین بردن باکتری‌های موجود در بیوفیلم است (۱۲-۱۴).

استفاده از شست و شو دهنده های کانال ریشه دندان به همراه استفاده از روش های فیزیکی دبریدمان کانال ریشه، نقش کلیدی در موفقیت درمان اندودانتیک ایفا می‌کند. یکی از خواص ماده شست و شو دهنده کانال ریشه، توانایی انحلال اجزای آلی کانال ریشه (پالپ نکروتیک) و دبری های غیر آلی از عاج ریشه در حین پاکسازی مکانیکی کانال ریشه است. داشتن فعالیت ضد باکتریایی بر علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، غیر سمی بودن برای بافت‌های زنده، داشتن کشش سطحی پایین و توانایی لغزنده سازی از دیگر ویژگی های ماده شست و شوی ایده آل کانال ریشه است (۱۵،۱۶). رایج ترین ماده شست و شو دهنده کانال ریشه، هیپوکلریت سدیم است. شایع‌ترین غلظت مورد استفاده آن، غلظت ۲/۵ درصد است که علاوه بر خاصیت ضد باکتریایی، توانایی انحلال بافت های آلی و غیر آلی، خاصیت لغزنده سازی و شست و شوی مکانیکی دبری ها از کانال ریشه را دارد (۱۷)؛ اما این محلول به شدت برای بافت‌های زنده سمی است و از خارج شدن آن از کانال ریشه باید اجتناب شود (۱۸).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

فارنزول یک الکل ایزوپروپیل طبیعی است و در بسیاری از روغن های گیاهی و در عطرها جهت تقویت بوی آن ها یافت می شود (۱۹). مطالعات نشان داده اند که فارنزول با تأثیر بر روند اتصال باکتری ها به یکدیگر و همچنین کاهش تولید اسید و گلوکان توسط آن ها باعث اختلال در تشکیل بیوفیلم می شود (۲۰). بیوفیلمی که در حضور فارنزول تشکیل می شود دارای تعداد باکتری کمتر و پلی ساکارید خارج سلولی کمتری است و درنتیجه اتصالش به سطح سست تر است (۱۹). مطالعات نشان داده‌اند میزان پتاسیم داخل سلولی باکتری انتروکوکوس فکالیس در معرض فارنزول در اثر اختلال در مکانیسم اکسیداسیون-احیا افزایش می یابد و با این مکانیسم فارنزول باعث لیز شدن باکتری می شود (۲۰).

چیتوزان یک پلی ساکارید طبیعی با خاصیت آنتی باکتریال است که دارای ویژگی سازگاری زیستی، تخریب پذیری زیستی، عدم سمیت و قابلیت چسبندگی زیستی می باشد (۲۱). طبق مطالعات انجام شده، چیتوزان دارای خاصیت آنتی باکتریال بر علیه قارچ ها و طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت است (۲۲). چیتوزان به علت دارا بودن بار مثبت قوی، جذب دیواره سلولی باکتری و بیوفیلم می شود و باعث افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری و همچنین اتصال ضعیف تر آن به عاج می شود و از این طریق باکتری را از بین می برد (۲۳،۲۱). فارنزول و چیتوزان چندین سال است که به عنوان مواد آنتی باکتریال با خاصیت سازگاری زیستی برای بافت های انسان مورد توجه قرار گرفته اند. در مطالعات مختلف فعالیت آنتی باکتریال آن ها بر علیه باکتری‌های گرم مثبت مانند استافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کلی به اثبات رسیده است (۲۴).

با توجه به موارد ذکر شده، جهت انتخاب شست و شو دهنده نهایی مناسب برای به حداقل رساندن میزان باکتری انتروکوکوس فکالیس که اغلب بدون علامت و در عفونت‌های مقاوم و مزمن اندودانتیک شیوع دارند، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر فارنزول و چیتوزان به عنوان ماده شست وشو دهنده نهایی کانال ریشه دندان بر بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر پس از تائید توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد.

تشکیل بیوفیلم در chamber slide مخصوص تشکیل بیوفیلم

برای ایجاد عفونت استاندارد و کنترل شده، از سویه استاندارد انتروکوکوس فکالیس (ATCC 29212) که از مرکز انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود استفاده گردید. یک سوسپانسیون خالص از انتروکوک فکالیس با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml معادل کدورت نیم مک فارلند در محیط BHI براث تهیه شد و مقدار ۸۰۰ میکرولیتر به هر کدام از خانه های chamber slide اضافه گردید. هر ۴۸ ساعت یک بار محیط کشت موجود در خانه های chamber slide با محیط کشت تازه BHI براث حاوی باکتری جایگزین شد. محیط BHI براث بدون باکتری، به عنوان کنترل منفی در کنار نمونه ها قرار داده شد و هر ۴۸ ساعت همراه با سایر نمونه ها تعویض گردید. این فرایند به مدت ۷ روز (برای تشکیل بیوفیلم ۷ روزه) و ۲۱ روز (جهت تشکیل بیوفیلم ۲۱ روزه) انجام شد.

طبقه بندی نمونه ها

به منظور بررسی تأثیر مواد ضد باکتریایی، نمونه‌ها در ۸ گروه تقسیم بندی شدند. یک گروه کنترل منفی شامل نمونه‌های فاقد باکتری و بیوفیلم جهت کنترل شرایط استریل، یک گروه کنترل مثبت (گروهی که بیوفیلم در آن تشکیل می شود؛ اما در معرض مواد آنتی باکتریال قرار نمی‌گیرد)، گروه‌های بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه که هرکدام در معرض محلول های فارنزول یا چیتوزان و یا ترکیب فارنزول – چیتوزان قرار گرفتند. برای هر گروه یک chamber slide مخصوص خود اختصاص داده شد. سپس نمونه ها شست و شو داده شده و جهت تائید تشکیل بیوفیلم توسط

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

میکروسکوپ الکترونی نگاره Scanning Electron Microscopy, SEM) مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت اطمینان از نتایج مطالعه‌ی حاضر، تمام مراحل آزمایش زیر نظر کارشناس میکروب شناسی سه بار تکرار گردید.

تعیین حساسیت ضد میکروبی فارنزول و چیتوزان با استفاده از روش میکرودایلوشن

سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند در محیط کشت BHI براث به نحوی رقیق شد که غلظت سوسپانسیون باکتریایی به 1×10^{6}CFU/ml برسد. فارنزول و چیتوزان در محدوده غلظت ۱۲۸-۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد و ۵۰ میکرولیتر از هر رقت فارنزول و چیتوزان به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. یک چاهک نیز حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پلیت ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و سپس از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شدند. کمترین غلظتی از فارنزول و چیتوزان که در آن باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از چاهک هایی که در آن باکتری رشد نکرده بود، ۱۰ میکرولیتر برداشته و در محیط BHI آگار کشت داده و در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. کمترین غلظت از فارنزول و چیتوزان که در آن هیچ باکتری رشد نکرده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسی تأثیر مواد آنتی باکتریال بر بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس

غلظت ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول فارنزول و غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول چیتوزان (با توجه به MBC های تعیین شده)، با ترکیب پودر چیتوزان در استیک اسید ۱ درصد و ترکیب محلول فارنزول با اتانول ۱۰۰ درصد تهیه شد. در شرایط استریل، هر کدام از این غلظت ها به مدت ۳ دقیقه با نمونه ها مجاور و سپس مواد آنتی باکتریال به مدت ۳۰ ثانیه با ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات (PBS) شست و شو و از نمونه ها حذف شدند.

در گروه فارنزول-چیتوزان، ابتدا نمونه ها به مدت ۳ دقیقه در معرض فارنزول با غلظت ذکر شده قرار داده شدند. سپس شست و شوی نمونه ها به وسیله ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS استریل انجام شد و مجدداً به مدت ۳ دقیقه در معرض چیتوزان با غلظت ذکر شده قرار گرفتند. در انتها نمونه ها جهت حذف چیتوزان به وسیله ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS شست و شو داده شدند.

آماده سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ کانفوکال فلورسانس (confocal laser scanning microcopy, CLSM)

نمونه های بیوفیلم پس از شست و شو با محلول PBS، با ۵۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی فلورسین دی استات (FDA; sigma) و ۵۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی پروپیدیوم یدید(PI; sigma) رنگ آمیزی شدند. FDA یک ترکیب سبز رنگ با قابلیت عبور از غشای سلول است و در داخل سلول باکتری به علت فعالیت متابولیکی نرمال آنزیم استراز به فلورسین تبدیل می شود. PI یک ترکیب قرمز رنگ فلورسانس است که توانایی نفوذ به داخل سلول باکتری را ندارد و تنها در صورت از بین رفتن غشا می تواند به گیرنده‌های خود در DNA باکتری متصل شود؛ بنابراین باکتری‌های زنده دارای رنگ فلورسانس سبز و باکتری‌های مرده دارای رنگ فلورسانس قرمز خواهند بود. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه، در اتاق کاملاً تاریک و در دمای اتاق در معرض رنگ‌های فلورسانس قرار گرفتند و سپس با محلول PBS به مدت یک دقیقه شست و شو داده شدند و در نهایت با میکروسکوپ CLSM مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه از میکروسکوپ leica inverted TCS-SPE (شرکت بین المللی leica Microsystems، آلمان) استفاده شد. طول موج لیزر استفاده شده جهت بررسی رنگ فلورسانس قرمز، ۶۴۰ نانومتر و برای بررسی رنگ فلورسانس سبز، ۴۸۸ نانومتر بود.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

تجزیه و تحلیل داده ها

جهت بررسی درصد حذف باکتری های بیوفیلم، از نرم‌افزار COMSTAT(version 2.0.1) استفاده شد. این نرم‌افزار به طور اختصاصی جهت آنالیز عکس‌های به دست آمده از میکروسکوپ CLSM است و برای هر رنگ مورد استفاده در نمونه ها، طول موج خاصی را بررسی می‌کند.

نتایج

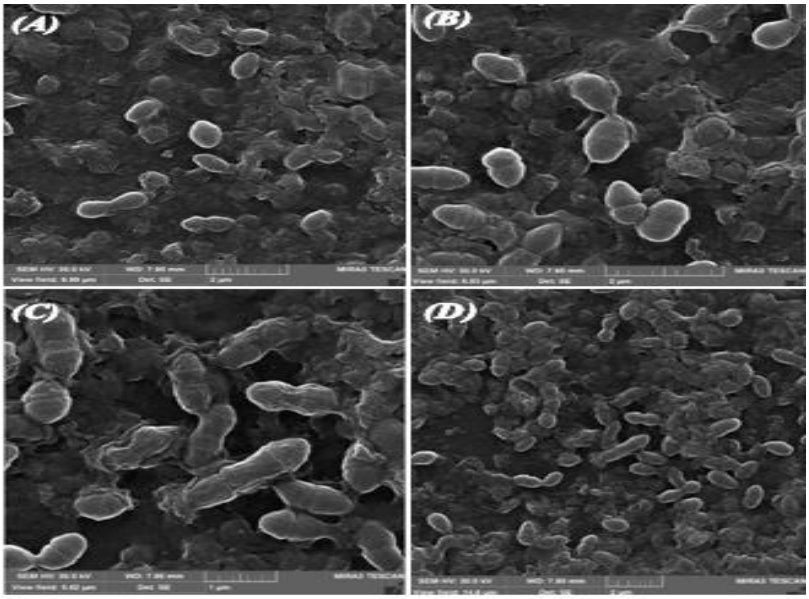
مربوط به حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC)

حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری در فارنزول برابر با ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و در چیتوزان برابر با ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی باکتری در فارنزول برابر با ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و در چیتوزان برابر با ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

نتایج میکروسکوپی اثبات تشکیل بیوفیلم

آزمایش‌های اولیه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره جهت تائید تشکیل بیوفلیم ۷ روزه و ۲۱ روزه باکتری انجام شد.

تصویر ۱ تشکیل بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس را بعد از ۷ و ۲۱ روز نشان می‌دهند. در انتهای ۷ روز، باکتری‌ها در داخل لایه اگزوپلی ساکارید قرار گرفتند و به صورت متراکم و به شکل زنجیره هایی کوتاه متشکل از کوکسی های به هم چسبیده دیده شدند. در انتهای روز ۲۱، حجم بیوفیلم باکتریایی افزایش یافت و لایه اگزوپلی ساکارید بیشتری در ساختار بیوفیلم مشاهده شد. بر اساس این یافته ها، مدت زمان لازم جهت تشکیل بیوفیلم باکتری انتروکوکوس فکالیس یک هفته بود.



تصویر ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از ساختار بیوفیلم باکتری انتروکوکوس فکالیس:

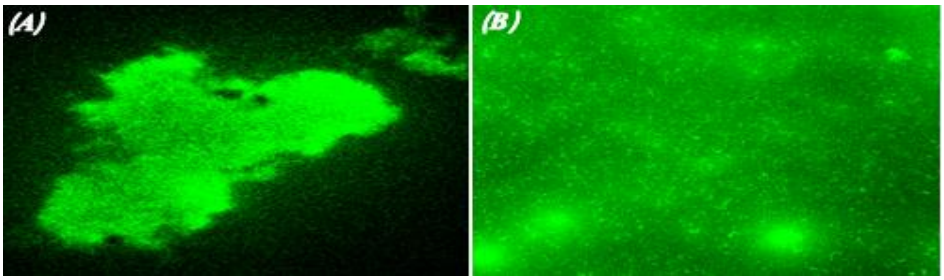
بعد از ۷ روز (تصویر (A) با بزرگنمایی ۱۰۰۰× . تصویر (B) با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ ×)، **بعد از ۲۱ روز** (تصویر (C) با بزرگنمایی ۱۰۰۰× . تصویر (D) با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ ×)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

نتایج حذف بیوفیلم باکتریایی

۱. گروه کنترل

قرار گرفتن نمونه ها در معرض بافر فسفات (PBS) به مدت سه دقیقه، به عنوان گروه کنترل مثبت نشان داد که تمامی جمعیت باکتری ها در بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه زنده بوده و کاهشی در جمعیت باکتری های زنده دیده نشد. در تصاویر میکرسکوپ CLSM به دست آمده، طول موجی که با رنگ سبز مشخص شده است نشان دهنده کلونی های باکتری زنده بودند (تصویر۲).



تصویر ۲. تصویر میکروسکوپ کانفوکال از بیوفیلم ۷ روزه(A) و ۲۱ روزه(B) باکتری انتروکوکوس فکالیس گروه کنترل با بزرگنمایی ۴۰۰×. نقاط سبز مربوط به تابش لیزر با طول موج ۴۸۸ نانومتر به رنگ فلورو دی استات (FDA) است. این رنگ به باکتری هایی با غشای سلولی سالم متصل می شود و نشان دهنده باکتری هایی است که زنده هستند و فعالیت متابولیک نرمال دارند.

۲. فارنزول

قرار گرفتن نمونه های ۷ روزه و ۲۱ روزه در معرض فارنزول با غلظت MBC به مدت سه دقیقه نشان داد که جمعیت باکتری های زنده بیوفیلم کاهش یافت. نتایج حاصل از آنالیز طیف رنگ های موجود در تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ CLSM نشان داد که در بیوفیلم ۷ روزه جمعیت باکتری های زنده نسبت به گروه کنترل به میزان ۵۴/۶۷ درصد کاهش داشتند. همچنین این میزان در بیوفیلم ۲۱ روزه۳۶/۵۴٪ بود.

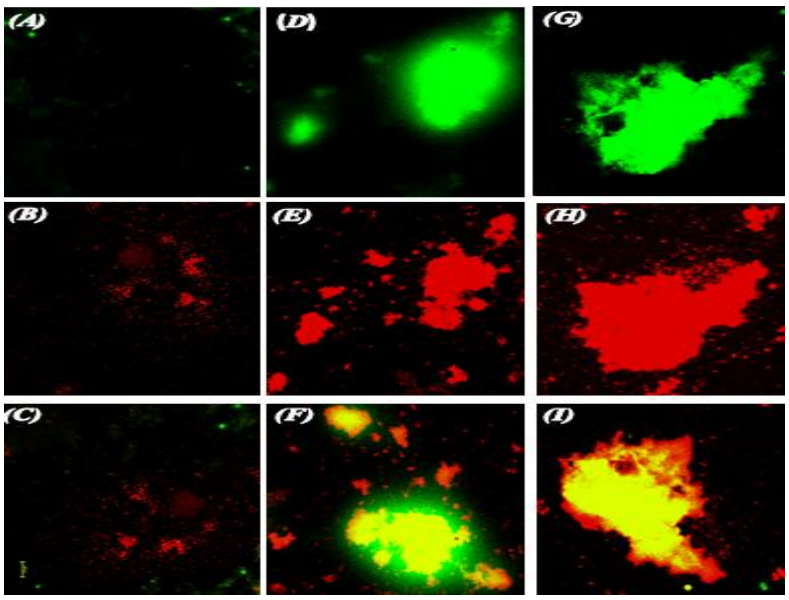
۳. چیتوزان

در مقایسه با گروه کنترل، نتایج آنالیز طیف رنگی نشان داد که چیتوزان در غلظت MBC جمعیت باکتری های بیوفیلم ۷ روزه و ۲۱ روزه را به میزان ۶۵/۰۸٪ و ۳۹/۰۵٪ کاهش داده است.

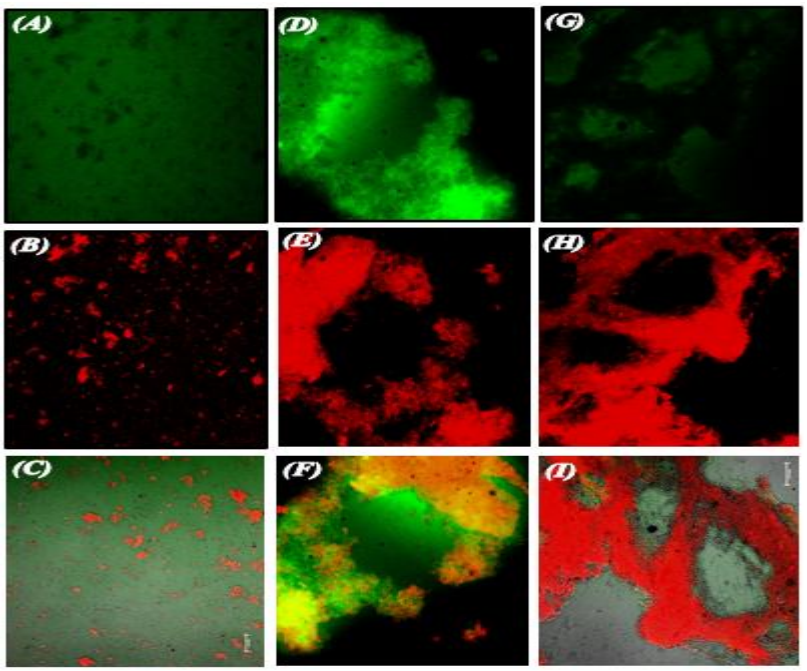
۴. فارنزول-چیتوزان

نتایج آنالیز طیف رنگی در نمونه هایی که ابتدا ۳ دقیقه در معرض فارنزول و سپس ۳ دقیقه در معرض چیتوزان قرار گرفتند نشان داده است که در بیوفیلم ۷ روزه، تعداد کلونی‌های باکتری‌های زنده نسبت به گروه کنترل به میزان ۸۲/۷۸٪ و در گروه بیوفیلم ۲۱روزه به میزان ۶۰/۹۱٪ کاهش یافته است. در این تصاویر رنگ قرمز نشان دهنده باکتری‌های مرده و رنگ سبز نشان دهنده باکتری های زنده است (تصویر ۳ و۴).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]



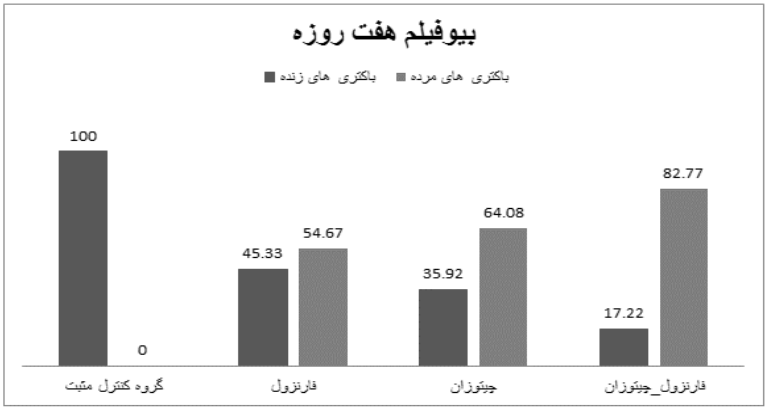
تصویر ۳. تصاویر میکروسکوپ کانفوکال از بیوفیلم ۷ روزه باکتری پس از مجاورت با فارنزول(A-C)، چیتوزان (D-F) و فارنزول-چیتوزان(G-I). با بزرگ نمایی۴۰۰ × . (D،G وA) تصاویر با طول موج ۴۸۸ نانومتر جهت نمایش باکتری های زنده. (E،H وB) تصاویر با طول موج ۶۴۰ نانومتر جهت نمایش باکتری های مرده. (F،I وC) ترکیب تصاویر مربوط به باکتری های زنده و مرده.



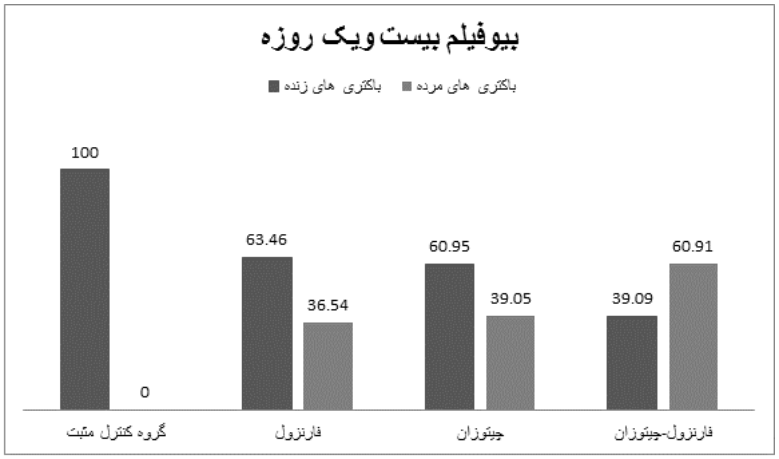
تصویر ۴. تصاویر میکروسکوپ کانفوکال از بیوفیلم ۲۱ روزه باکتری پس از مجاورت با فارنزول(A-C)، چیتوزان (D-F) و فارنزول-چیتوزان(G-I). با بزرگ نمایی۴۰۰ × . (D،G وA) تصاویر با طول موج ۴۸۸ نانومتر جهت نمایش باکتری های زنده. (E،H وB) تصاویر با طول موج ۶۴۰ نانومتر جهت نمایش باکتری های مرده. (F،I وC) ترکیب تصاویر مربوط به باکتری های زنده و مرده.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

نمودار مقایسه نتایج آنتی باکتریال بر بیوفیلم ۷ روزه و ۲۱ روزه باکتری انتروکوکوس فکالیس نشان داد که بیشترین خاصیت آنتی باکتریال در گروهی مشاهده شده که از ترکیب فارنزول و چیتوزان استفاده شده بود. همچنین تاثیر چیتوزان بر بیوفیلم ۷ روزه و ۲۱ روزه باکتری، با تفاوت اندکی بیشتر از فارنزول بود (نمودار۱و۲).



نمودار ۱. نمودار مقایسه درصد حذف باکتری های بیوفیلم در گروه بیوفیلم ۷ روزه



نمودار۲. نمودار درصد حذف باکتری های بیوفیلم در گروه بیوفیلم ۲۱ روزه

بحث

درمان اندودانتیک با هدف حذف باکتری‌ها از کانال ریشه عفونی به کمک استفاده از روش‌های مکانیکی و شست‌وشو دهنده های آنتی باکتریال انجام می شود. با وجود روش‌های مکانیکی و شیمیایی، عفونت پری آپیکال در تعداد نسبتاً زیادی از دندان‌هایی که درمان ریشه شده‌اند ایجاد می‌شود (۲۶،۲۵). حذف باکتری های موجود در بیوفیلم یک موضوع چالش برانگیز است. اگرچه تا به حال مواد آنتی باکتریال و آنتی بیوتیک های مختلفی برای درمان عفونت‌های ناشی از بیوفیلم استفاده شده است؛ ولی تا به حال اثر بخشی کاملی گزارش نشده است (۲۷). این مطالعه آزمایشگاهی با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی فارنزول و چیتوزان به تنهایی و ترکیب آن ها با یکدیگر بر ضد بیوفیلم باکتریایی انتروکوکوس فکالیس صورت گرفت که اغلب بدون علامت و در عفونت‌های مقاوم و مزمن اندودانتیک با شیوع ۲۴ تا ۷۷ درصد شناسایی شده است

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

(۲۸). در این مطالعه تفاوت قابل ملاحظه ای بین گروه های آزمایشی و گروه کنترل مثبت مشاهده شد.

در این مطالعه به چند دلیل از فارنزول جهت بررسی خاصیت آنتی باکتریال برای باکتری های بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس استفاده شد (۱۹). بررسی مکانیسم اثر فارنزول در مطالعات مختلف نشان داده است که فارنزول به علت داشتن بار مثبت الکتریکی می تواند جذب لایه اگزوپلی ساکارید بیوفیلم شود و پس از این مرحله به علت داشتن سایز مولکولی بسیار پایین توانایی عبور از این لایه را دارد (۲۰). با توجه به این که باکتری انتروکوکوس فکالیس یک باکتری گرم مثبت با توانایی تشکیل بیوفیلم است، فارنزول به دلیل مکانیسم هایی که در بالا ذکر شد می تواند انتخاب مناسبی جهت از بین بردن باکتری های بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس باشد و نتایج این مطالعه نیز این فرضیه را ثابت می کند.

در این مطالعه، فارنزول در گروه بیوفیلم ۷ روزه و ۲۱ روزه به ترتیب ۵۴/۶۷٪ و ۳۶/۵۴٪ از باکتری های زنده بیوفیلم را از بین بردند علت این اختلاف و کمتر بودن تاثیر فارنزول در گروه بیوفیلم ۲۱ روزه، بالغ تر بودن بیوفیلم ۲۱ روزه و بیشتر بودن جمعیت باکتری ها و حجم بیشتر لایه اگزوپلی ساکارید بیوفیلم است که این تفاوت های بین دو گروه بیوفیلم، در تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره به خوبی قابل مشاهده بود. Gomes و همکاران گزارش کردند که از بین رفتن باکتری های بیوفیلم ۲۱ روزه باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس پس از قرار گرفتن در معرض فارنزول با غلظت MBC، به میزان ۵۰٪ است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۹). Unnanuntana و همکاران کاهش جمعیت باکتری‌های زنده بیوفیلم استافیلوکوک اورئوس به میزان یک سوم را در غلظت ۳۰ میلی مولار فارنزول و نزدیک به غلظت MBC گزارش دادند (۳۰).

چیتوزان همانند فارنزول دارای بار مثبت است و به علت جذب الکترواستاتیک می‌تواند جذب لایه اگزوپلی ساکاریدی بیوفیلم شود. همچنین به علت سایز مولکولی بسیار پایین، مولکول های چیتوزان می‌توانند از این لایه عبور کنند (۲۱). در استفاده از چیتوزان در گروه بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه باکتری انتروکوکوس فکالیس، جمعیت باکتری های زنده نسبت به گروه کنترل متفاوت است. نتایج این مطالعه نشان داد که در بیوفیلم ۷ روزه، چیتوزان جمعیت باکتری‌های زنده را به میزان ۶۴/۰۸٪ و در بیوفیلم ۲۱ روزه به میزان ۳۹/۰۵٪ نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش داد. Perelshtein و همکاران اختلاف معناداری را برای خاصیت آنتی باکتریال چیتوزان با غلظت MBC بر علیه بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس نسبت به گروه کنترل گزارش کردند که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. نتایج مطالعه Perelshtein کاهش ۸۰ درصدی تعداد کلونی باکتری‌های زنده در ساختار بیوفیلم را نشان داد که تفاوت آن نسبت به مطالعه حاضر احتمالا به علت مدت زمان تشکیل بیوفیلم است (۳۱). Del carpio و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که ۳۳٪ باکتری های بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس پس از ۳ دقیقه قرار گرفتن در معرض چیتوزان از بین رفتند که با نتایج به دست آمده در مطالعه ما همخوانی دارد و تفاوت اندک در درصدهای گزارش شده احتمالاً به دلیل محیط تشکیل بیوفیلم باکتری است (۳۲). Raafat و همکاران پس از قرار دادن چیتوزان با غلظت ۱۰ برابر MIC به مدت ۱۰ دقیقه در معرض بیوفیلم ۲۱ روزه استافیلوکوک اورئوس،کاهش ۵۰ درصدی میزان باکتری های زنده بیوفیلم نسبت به گروه کنترل را گزارش کردند که تفاوت در درصد باکتری های زنده بیوفیلم در این مطالعه و مطالعه حاضر به دو علت، نوع باکتری موجود در بیوفیلم و تفاوت در مدت زمان قرار گرفتن نمونه ها در معرض چیتوزان است (۳۳).

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیب فارنزول و چیتوزان توانست جمعیت باکتری های زنده در بیوفیلم ۲۱ روزه را ۶۰/۹۱٪ و بیوفیلم ۷ روزه را ۸۲/۷۷٪ کاهش دهد. استفاده از ترکیب فارنزول و چیتوزان و بررسی خواص آنتی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

باکتریال آن علیه بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس با توجه به مکانیسم های اثر هرکدام از این ترکیبات آنتی باکتریال قابل توجیه است. در این مطالعه ابتدا نمونه ها ۳ دقیقه در معرض فارنزول قرار گرفتند، سپس شست وشو داده شدند و در نهایت به مدت ۳ دقیقه در معرض چیتوزان قرار داده شدند. در ابتدای شروع پروسه ضد میکروبی فارنزول، بار مثبت این ترکیب باعث جذب شدن آن به لایه اگزوپلی ساکارید با بار منفی می شود، سپس به علت سایز مولکولی بسیار پایین، فارنزول می‌تواند از این لایه عبور کند و در مجاورت باکتری های داخل بیوفیلم قرار بگیرد (۳۴). پس از طی این فرآیند، فارنزول با اتصال به غشای باکتری و آسیب به آن، باعث افزایش نفوذپذیری و در نهایت لیز شدن سلول باکتری می شود. چیتوزان نیز با مکانیسمی مشابه می‌تواند از لایه اگزوپلی ساکارید بیوفیلم عبور کند و وارد ساختار بیوفیلم شود (۳۵،۱۹). به دلیل اینکه مهمترین مکانیسم آنتی باکتریال چیتوزان، تخریب DNA باکتری است؛ بنابراین نفوذپذیر شدن غشای باکتری نقش مهمی در افزایش اثر ضد میکروبی چیتوزان دارد که این افزایش در میان نفوذپذیری غشای سلولی می‌تواند توسط فارنزول انجام شود.

به طور کلی در گروه بیوفیلم ۲۱ روزه نسبت به گروه بیوفیلم ۷ روزه، اثر آنتی باکتریال کمتر است که علت آن افزایش حجم لایه اگزوپلی ساکارید و بیشتر بودن جمعیت باکتری‌های بیوفیلم است.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج، بیشترین تأثیر ضد میکروبی در هر دو گروه بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه، مربوط به استفاده ترکیبی از فارنزول و چیتوزان است. در بیوفیلم ۷ روزه اثر آنتی باکتریال چیتوزان بیشتر از فارنزول است و در بیوفیلم ۲۱ روزه نیز تأثیر آنتی باکتریال چیتوزان با اختلاف اندکی بیشتر از فارنزول است. بر اساس این نتایج می‌توان پیشنهاد کرد که استفاده از فارنزول و چیتوزان به تنهایی یا استفاده از ترکیب آن ها به عنوان ماده شست و شو دهنده نهایی کانال ریشه می تواند جهت حذف باکتری های موجود در بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس ریشه دندان در درمان ریشه در عفونت های اولیه و مقاوم به درمان مفید باشد. همچنین می توان استفاده از فارنزول، چیتوزان و یا ترکیب آن‌ها به عنوان شست و شو دهنده نهایی کانال ریشه، مخصوصاً برای دندان‌های درمان شده قبلی و دارای ضایعه پری آپیکال مزمن را پیشنهاد داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کردستان جهت حمایت مالی و معنوی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. این مطالعه با کد اخلاق IR.MUK.REC.1395/333 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان مصوب گردیده است. همچنین هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافعی برای انتشار مقاله ندارند.

منابع

1. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjogren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. Infect Immun. 2009;25(2):685-693.
2. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20(3):340-349.
3. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(6):348-381.
4. Niazi SA, Bakhsh A. Association between Endodontic Infection, Its Treatment and Systemic Health: A Narrative Review. Medicina (Kaunas). 2022;58(7):931-955.
5. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. J Endod. 2004;30(8):559-567.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

6. Bhat R, Kini A, Shetty P, Kansara P, Penugonda B. Cyclic Fatigue Resistance and Surface Roughness of Rotary NiTi Instruments after Simulated Clinical Use in Curved Root Canals – An Atomic Force Microscopy Study. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr .2022; 22(2022): 210-219.
7. López-Marrufo-Medina A, Domínguez-Domínguez L, Cabanillas-Balsera D, et al. Antibiotics prescription habits of Spanish endodontists: Impact of the ESE awareness campaign and position statement. J Clin Exp Dent. 2022;14(1):48-54.
8. Manoil D, Al-Manei K, Belibasakis GN. A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing. Proteomics Clin Appl. 2020;14(3):60-78.
9. Shin JM, Luo T, Lee KH, Guerreiro D, Botero TM, McDonald NJ, Rickard AH. 2018. Deciphering endo-dontic microbial communities by next-generation sequencing. J Endod. 2018;44(7):1080-1087.
10. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of Enterococcus faecalis as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. Cureus. 2020;12(3):57-72.
11. Singh H: Microbiology of endodontic infections. J Dent Oral Hyg. 2016, 2:1-4.
12. Li W, Liu H, Xu Q. Extracellular Dextran and DNA Affect the Formation of Enterococcus faecalis Biofilms and Their Susceptibility to 2% Chlorhexidine. J Endod. 2012;38(7):894-898.
13. Kumar T, Dhillon JS, Gill GS, Singla R, Rani S, Dhillon M. An in vitro comparison of the antimicrobial efficacy of positive pressure and negative pressure irrigation techniques in root canals infected with Enterococcus faecalis. J Conserv Dent. 2018;21(4):438-442.
14. Arias-Moliz MT, Baca P, Ordóñez-Becerra S, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012;17(5):902-906.
15. Namba AM, Santos ELS, Garcia MT, et al. Farnesol as a potentiator of antimicrobial photodynamic inactivation on Enterococcus faecalis. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2022;39:102928.
16. Giardino L, Pedullà E, Cavani F, et al. Comparative Evaluation of the Penetration Depth into Dentinal Tubules of Three Endodontic Irrigants. Materials (Basel). 2021;14(19):53-58.
17. Meena Kumari C, Kapoor Punia S, Punia V. Herbs used as irrigants and root canal irrigation techniques-Part 2 – A review. Indian J Dent Sci. 2014;6(3):93–100.
18. Beegam KS, Joseph A, Singh VPP. Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of Elettaria cardamomum Oil, Trachyspermum ammi Oil and 5% Sodium Hypochlorite Against Enterococcus faecalis Biofilm Formed on Tooth Substrate. Contemp Clin Dent. 2021;12(4):396-400.
19. Chávez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Basso Bernardi MI, de Toledo Leonardo R, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. Arch Oral Biol. 2019;107:104481-7.
20. Chávez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. Arch Oral Biol. 2017;84:89-93.
21. Rodríguez-Acosta H, Tapia-Rivera JM, Guerrero-Guzmán A, et al. Chronic wound healing by controlled release of chitosan hydrogels loaded with silver nanoparticles and calendula extract. J Tissue Viability. 2022;31(1):173-179.
22. Mohandas A, Rangasamy J. Nanocurcumin and arginine entrapped injectable chitosan hydrogel for restoration of hypoxia induced endothelial dysfunction. Int J Biol Macromol. 2021;166:471-482.
23. Jhaveri J, Raichura Z, Khan T, Momin M, Omri A. Chitosan Nanoparticles-Insight into Properties, Functionalization and Applications in Drug Delivery and Theranostics. Molecules. 2021;26(2):272.
24. Ahmadian E, Shahi S, Yazdani J, Maleki Dizaj S, Sharifi S. Local treatment of the dental caries using nanomaterials. Biomed Pharmacother. 2018;108:443-447.
25. Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. J Endod. 2007;33(6):652–662.
26. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endod Topics. 2004;9(1):27–36.
27. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod. 2010;36(1):70–77.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]

28. Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on Enterococcus faecalis survival and specific gene transcripts. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(3):169–174.
29. Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008;34(5):537-540.
30. Aasis Unnanuntana, Lindsay Bonsignore, Mark E. Shirtliff, and Edward M. Greenfield, Int Endod J. 2003;36:1–11.
31. Perelshtein I , Ruderman E , Perkas N , et al. Chitosan and chitosan-ZnO-based complex nanoparticles: formation, characterization, and antibacterial activity. J Mater Chem B. 2013;1(14):1968-1976.
32. Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MA, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. Restor Dent Endod. 2015;40(3):195-201.
33. Raafat D, von Bargen K, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Appl Environ Microbiol. 2008;74(12):3764-3773.
34. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(5):308-320.
35. Parsk R, Hirani V. Dental health and cognitive impairment in an English national survey population. J Am Geriatr Soc. 2007;55(9):1410-1414.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-30]