

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

Ardavan Moinafshar<sup>1</sup>, Hanieh Paik<sup>2</sup>, Rashid Ramazanzadeh<sup>3</sup>, Amjad Ahmadi<sup>4</sup>, Mohammad Rastegar Khosravi<sup>5</sup>

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:** *Enterococcus 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. SJKU 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

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

اردوان معین افشار<sup>۱</sup>، هانیه پیک<sup>۲</sup>، رشید رمضان زاده<sup>۳</sup>، امجد احمدی<sup>۴</sup>، محمد رستگار خسروی<sup>۵</sup>

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 میکروبیولوژی 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: ۰۸۷-۳۳۶۲۹۰۴۸، 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 فارتزول و چیتوزان جهت حذف و کاهش گونه‌های میکروبی پیشنهاد شده‌اند. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر ضد باکتریایی فارتزول و/یا چیتوزان بر روی بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** 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 فارتزول 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.

**یافته‌ها:** فارتزول 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 باکتری‌های زنده را نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش دادند. ترکیب فارتزول و چیتوزان توانست به ترتیب ۸۲/۷۷٪ و ۶۰/۹۱٪ باکتری‌های زنده را در بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه را کاهش دهد.

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

**کلمات کلیدی:** انتروکوکوس فکالیس، بیوفیلم، فارتزول، چیتوزان

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

## مقدمه

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 ویروالانس، مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها و تأثیر آنتی بادی ها فراهم می کند. در نتیجه از بین بردن بیوفیلم در بدن میزبان بسیار مشکل است (۱۱، ۱۰). باکتری ها در بیوفیلم ۱۰۰۰ برابر بیشتر از سلول های پلانکتونیک (باکتری ها به صورت آزاد) نسبت به مواد آنتی باکتریال مقاوم هستند و از بهبود پرئودنتیت پری رادیکولار جلوگیری می کنند؛ بنابراین یکی از عوامل موفقیت در درمان کانال ریشه دندان، از بین بردن باکتری های 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 می کند. 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 گسترده ای از باکتری ها، غیر سمی بودن برای بافت های 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. شایع ترین 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 بافت های زنده سمی است و از خارج شدن آن از کانال ریشه باید اجتناب شود (۱۸).

علت اصلی ایجاد التهاب در بافت پالپ و پری آپیکال دندان باکتری ها هستند که باعث تجمع عوامل التهابی و ایمنی در ناحیه پری آپیکال و ایجاد واکنش های دفاعی می شوند (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 می دهد، درمان اندودانتیک برای دندان ضرورت پیدا می کند (۳). لازمه موفقیت درمان ریشه به حداقل رساندن میکرو ارگانیسم های موجود در سیستم کانال ریشه است و هرچه میزان این میکرو ارگانیسم ها 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 باکتری ها در کانال ریشه دندان دارای پالپ نکروز شده به وجود می آیند، عفونت های اندودانتیک اولیه غالباً ماهیت چند میکروبی دارند؛ اما باکتری های دخیل در این امر به طور عمده از باکتری های گرم منفی و بی هوازی تشکیل شده است (۷). در مقابل، عفونت های ثانویه و مقاوم به درمان، در دندان هایی مشاهده می شود که درمان ریشه برای آن ها انجام گرفته است. بر اساس مطالعات مختلف باکتری های دخیل در تشکیل عفونت های ثانویه و مقاوم به درمان اندودانتیک، عمدتاً باکتری های گرم مثبت و بی هوازی اختیاری می باشند که توانایی زنده ماندن و کلونیزاسیون در شرایط سخت محیطی را دارند که از میان آن ها باکتری انتروکوکوس فکالیس مهم ترین نقش را دارد و معمولاً با شکست درمان ریشه مرتبط می باشند (۹، ۸). حذف باکتری انتروکوکوس فکالیس از کانال ریشه به کمک روش های 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

ماده شست و شو دهنده نهایی کانال ریشه دندان بر بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس طراحی و انجام شد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر پس از تأیید 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  $10^8 \times 1/5$  CFU/ml معادل کدورت نیم مک فارلند در محیط BHI برآت 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 برآت حاوی باکتری جایگزین شد. محیط BHI برآت 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 هر کدام در معرض محلول های فارتزول یا چیتوزان و یا ترکیب فارتزول - چیتوزان قرار گرفتند. برای هر گروه یک chamber slide مخصوص خود اختصاص داده شد. سپس نمونه ها شست و شو داده شده و جهت تأیید تشکیل بیوفیلم توسط

فارتزول 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 فارتزول 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 فارتزول تشکیل می شود دارای تعداد باکتری کمتر و پلی ساکارید خارج سلولی کمتری است و در نتیجه اتصالش به سطح سست تر است (۱۹). مطالعات نشان داده‌اند میزان پتاسیم داخل سلولی باکتری انتروکوکوس فکالیس در معرض فارتزول در اثر اختلال در مکانیسم اکسیداسیون-احیا افزایش می یابد و با این مکانیسم فارتزول 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 (۲۱، ۲۳). فارتزول 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 اشیریشیا 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 فارتزول و چیتوزان به عنوان

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 نمونه ها برای میکروسکوپ کانفو کال (confocal laser scanning microscopy, 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 غشای می تواند به گیرنده های خود در DNA باکتری متصل شود؛ بنابراین باکتری های زنده دارای رنگ فلورسانس سبز و باکتری های مرده دارای رنگ فلورسانس قرمز خواهند بود. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه، در اتاق کاملاً تاریک و در دمای اتاق در معرض رنگ های 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.

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 میکروداپلوشن

سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند در محیط کشت BHI براث به نحوی رقیق شد که غلظت سوسپانسیون باکتریایی به  $1 \times 10^6$  CFU/ml برسد. فارنزول و چیتوزان در محلول 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 فکاليس

غلظت ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر از محلول فارنزول و غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر 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

### تجزیه و تحلیل داده ها

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

### نتایج

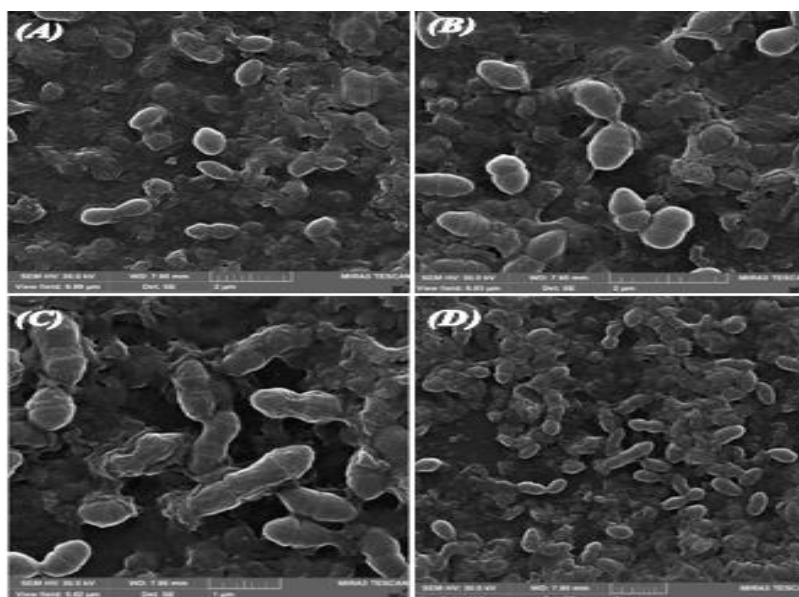
#### مربوط به حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

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

### نتایج میکروسکوپی اثبات تشکیل بیوفیلم

آزمایش های اولیه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره جهت تأیید تشکیل بیوفیلم ۷ روزه و ۲۱ روزه باکتری انجام شد.

تصویر ۱ تشکیل بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس را بعد از ۷ و ۲۱ روز نشان می دهند. در انتهای ۷ روز، باکتری ها در داخل لایه آگزوپلی 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 آگزوپلی 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:

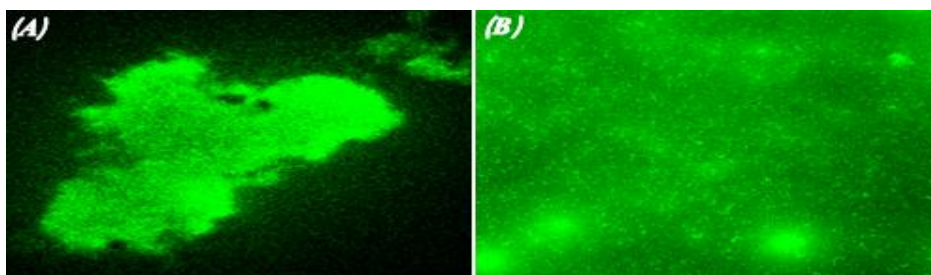
بعد از ۷ روز (تصویر (A) با بزرگنمایی ۱۰۰۰×. تصویر (B) با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰×)، بعد از ۲۱ روز (تصویر (C) با بزرگنمایی ۱۰۰۰×. تصویر (D) با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰×)

## نتایج حذف بیوفیلم باکتریایی

### ۱. گروه کنترل

قرار گرفتن نمونه‌ها در معرض بافر فسفات (PBS) به مدت سه دقیقه، به عنوان گروه کنترل مثبت نشان داد که تمامی جمعیت باکتری‌ها در بیوفیلم ۷ و ۲۱ روزه زنده بوده و

کاهش در جمعیت باکتری‌های زنده دیده نشد. در تصاویر میکروسکوپ CLSM به دست آمده، طول موجی که با رنگ سبز مشخص شده است نشان دهنده کلونی‌های باکتری زنده بودند (تصویر ۲).



تصویر ۲. تصویر میکروسکوپ کانفوکال از بیوفیلم ۷ روزه (A) و ۲۱ روزه (B) باکتری ایتروکوکوس فکالیس گروه کنترل با بزرگنمایی  $\times 400$ . نقاط سبز مربوط به تابش لیزر با طول موج ۴۸۸ نانومتر به رنگ فلورو دی استات (FDA) است. این رنگ به باکتری‌هایی با غشای سلولی سالم متصل می‌شود و نشان دهنده باکتری‌هایی است که زنده هستند و فعالیت متابولیک نرمال دارند.

### ۲. فارنزول

قرار گرفتن نمونه‌های ۷ روزه و ۲۱ روزه در معرض فارنزول با غلظت MBC به مدت سه دقیقه نشان داد که جمعیت باکتری‌های زنده بیوفیلم کاهش یافت. نتایج حاصل از آنالیز طیف رنگ‌های موجود در تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ CLSM نشان داد که در بیوفیلم ۷ روزه جمعیت باکتری‌های زنده نسبت به گروه کنترل به میزان ۵۴/۶۷ درصد کاهش داشتند. همچنین این میزان در بیوفیلم ۲۱ روزه ۳۶/۵۴٪ بود.

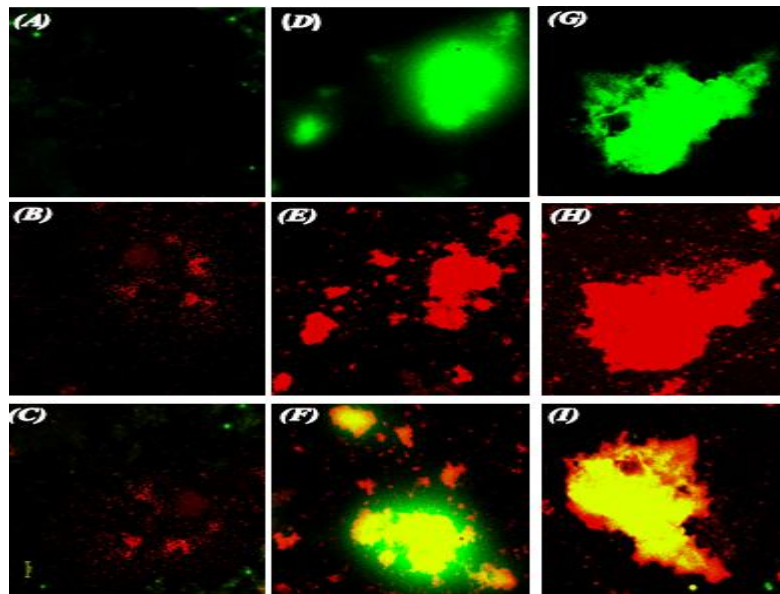
۷ روزه و ۲۱ روزه را به میزان ۶۵/۰۸٪ و ۳۹/۰۵٪ کاهش داده است.

### ۴. فارنزول-چیتوزان

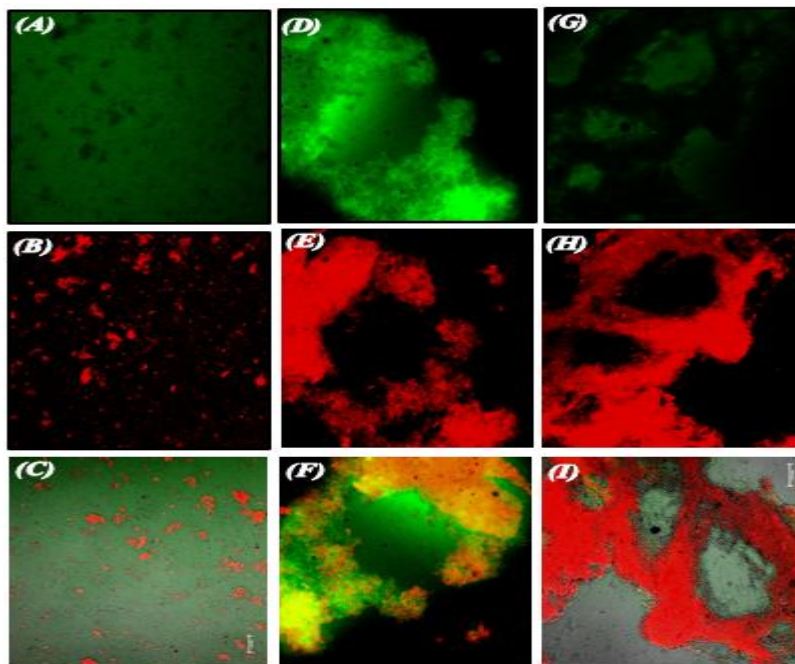
نتایج آنالیز طیف رنگی در نمونه‌هایی که ابتدا ۳ دقیقه در معرض فارنزول و سپس ۳ دقیقه در معرض چیتوزان قرار گرفتند نشان داده است که در بیوفیلم ۷ روزه، تعداد کلونی‌های باکتری‌های زنده نسبت به گروه کنترل به میزان ۸۲/۷۸٪ و در گروه بیوفیلم ۲۱ روزه به میزان ۶۰/۹۱٪ کاهش یافته است. در این تصاویر رنگ قرمز نشان دهنده باکتری‌های مرده و رنگ سبز نشان دهنده باکتری‌های زنده است (تصویر ۳ و ۴).

### ۳. چیتوزان

در مقایسه با گروه کنترل، نتایج آنالیز طیف رنگی نشان داد که چیتوزان در غلظت MBC جمعیت باکتری‌های بیوفیلم



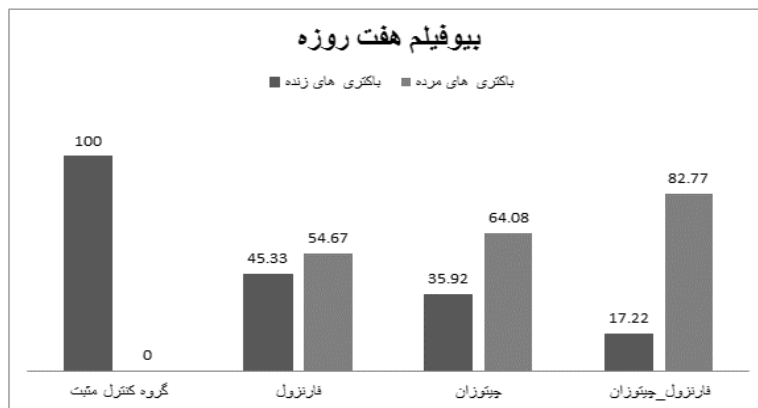
تصویر ۳. تصاویر میکروسکوپ کانفو کال از بیوفیلم ۷ روزه باکتری پس از مجاورت با فارنزول (A-C)، چیتوزان (D-F) و فارنزول-چیتوزان (G-I)، با بزرگ نمایی  $\times 400$ . (A و D، G) تصاویر با طول موج ۴۸۸ نانومتر جهت نمایش باکتری های زنده. (B و E، H) تصاویر با طول موج ۶۴۰ نانومتر جهت نمایش باکتری های مرده. (C و F، I) ترکیب تصاویر مربوط به باکتری های زنده و مرده.



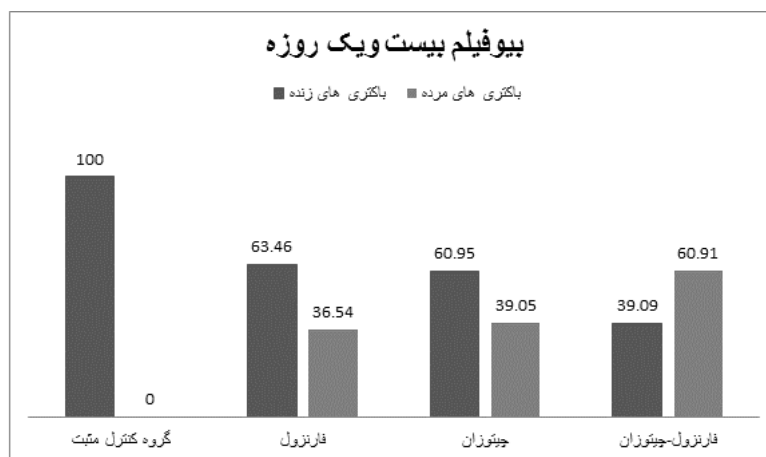
تصویر ۴. تصاویر میکروسکوپ کانفو کال از بیوفیلم ۲۱ روزه باکتری پس از مجاورت با فارنزول (A-C)، چیتوزان (D-F) و فارنزول-چیتوزان (G-I)، با بزرگ نمایی  $\times 400$ . (A و D، G) تصاویر با طول موج ۴۸۸ نانومتر جهت نمایش باکتری های زنده. (B و E، H) تصاویر با طول موج ۶۴۰ نانومتر جهت نمایش باکتری های مرده. (C و F، I) ترکیب تصاویر مربوط به باکتری های زنده و مرده.

ترکیب فارنزول و چیتوزان استفاده شده بود. همچنین تاثیر چیتوزان بر بیوفیلیم ۷ روزه و ۲۱ روزه باکتری، با تفاوت اندکی بیشتر از فارنزول بود (نمودار ۱ و ۲).

نمودار مقایسه نتایج آنتی باکتریال بر بیوفیلیم ۷ روزه و ۲۱ روزه باکتری انتروکوکوس فکالیس نشان داد که بیشترین خاصیت آنتی باکتریال در گروهی مشاهده شده که از



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



نمودار ۲. نمودار درصد حذف باکتری های بیوفیلیم در گروه بیوفیلیم ۲۱ روزه

باکتریال و آنتی بیوتیک های مختلفی برای درمان عفونت های ناشی از بیوفیلیم 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 بیوفیلیم باکتریایی انتروکوکوس فکالیس صورت گرفت که اغلب بدون علامت و در عفونت های مقاوم و مزمن اندودانتیک با شیوع ۲۴ تا ۷۷ درصد شناسایی شده است

## بحث

درمان اندودانتیک با هدف حذف باکتری ها از کانال ریشه عفونی به کمک استفاده از روش های مکانیکی و شست و شو دهنده های آنتی باکتریال انجام می شود. با وجود روش های مکانیکی و شیمیایی، عفونت پری آپیکال در تعداد نسبتاً زیادی از دندان هایی که درمان ریشه شده اند ایجاد می شود (۲۶، ۲۵). حذف باکتری های موجود در بیوفیلیم یک موضوع چالش برانگیز است. اگرچه تا به حال مواد آنتی

(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 فارتزول جهت بررسی خاصیت آنتی باکتریال برای باکتری های بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس استفاده شد (۱۹). بررسی مکانیسم اثر فارتزول در مطالعات مختلف نشان داده است که فارتزول به علت داشتن بار مثبت الکتریکی می تواند جذب لایه آگزوپلی 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، فارتزول 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، فارتزول 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 فارتزول در گروه بیوفیلم ۲۱ روزه، بالغ تر بودن بیوفیلم ۲۱ روزه و بیشتر بودن جمعیت باکتری ها و حجم بیشتر لایه آگزوپلی 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 فارتزول با غلظت MBC، به میزان ۵۰٪ است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۹). Unnanuntana و همکاران کاهش جمعیت باکتری های زنده بیوفیلم استافیلوکوک اورئوس به میزان یک سوم را در غلظت ۳۰ میلی مولار فارتزول و نزدیک به غلظت MBC گزارش دادند (۳۰).

چیتوزان همانند فارتزول دارای بار مثبت است و به علت جذب الکترواستاتیک می تواند جذب لایه آگزوپلی

ساکاریدی بیوفیلم شود. همچنین به علت سایز مولکولی بسیار پایین، مولکول های چیتوزان می توانند 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 باکتری های 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 باکتری های زنده در ساختار بیوفیلم را نشان داد که تفاوت آن نسبت به مطالعه حاضر احتمالاً 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 درصد های 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 فارتزول 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 فارتزول و چیتوزان و بررسی خواص آنتی

### نتیجه گیری

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 آن‌ها به عنوان ماده شست و شو دهنده نهایی کانال ریشه می‌تواند جهت حذف باکتری‌های موجود در بیوفیلم اتروکوکوس فکالیس ریشه دندان در درمان ریشه در عفونت‌های اولیه و مقاوم به درمان مفید باشد. همچنین می‌توان 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

بدین وسیله 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 منافی برای انتشار مقاله ندارند.

باکتریال آن‌علیه بیوفیلم اتروکوکوس فکالیس با توجه به مکانیسم‌های اثر هرکدام از این ترکیبات آنتی باکتریال قابل توجه است. در این مطالعه ابتدا نمونه‌ها ۳ دقیقه در معرض فارنزول قرار گرفتند، سپس شست و شو 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 آگزوپلی ساکارید با بار منفی می‌شود، سپس به علت سایز مولکولی بسیار پایین، فارنزول می‌تواند از این لایه عبور کند و در مجاورت باکتری‌های 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 می‌شود. چیتوزان نیز با مکانیسمی مشابه می‌تواند از لایه آگزوپلی ساکارید بیوفیلم عبور کند و وارد ساختار بیوفیلم شود (۳۵، ۱۹). به دلیل اینکه مهمترین مکانیسم آنتی باکتریال چیتوزان، تخریب DNA باکتری است؛ بنابراین نفوذپذیری 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 آگزوپلی ساکارید و بیشتر بودن جمعیت باکتری‌های بیوفیلم است.

### 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.

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-Marrufu-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.

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 Bargaen 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.