

## The Effect of Adding Thymus Vulgaris and Cinnamomum Verum Essential Oils in Self- Cured Acrylic Blocks on Adhesion of Candida Albicans

Elham Kazemi<sup>1</sup>, Saham Ansari<sup>2</sup>, Sedigheh Sheikhzadeh<sup>3\*</sup>, Jalal Jafarzadeh<sup>4</sup>, Mojtaba Taghizadeh Armaki<sup>4\*</sup>, Samaneh Gharekhani<sup>5</sup>, Mohammad Chehrazi<sup>6</sup>, Abazar Pournajaf<sup>4</sup>

1. Oral Health Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
2. Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Dental Materials Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
4. Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
5. Oral Health Research Center, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
6. Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Public Health, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Received: September 03, 2022; Accepted: October 24, 2022

### Abstract

**Background and Aim:** Oral candidiasis is the most common opportunistic infection of the oral mucosa with *Candida* spp. *Candida* species form a biofilm in patients who need orthodontics with removable plaque, and this structure can lead to Candidemia. It is important to find effective plant compounds, which have fewerside effects and are natural, to prevent biofilm formation. The aim of the present study was to determine the effect of adding *Thymus vulgaris* and *Cinnamomum verum* essential oils to self- cure acrylic blocks on *Candida albicans* colonization.

**Methods:** In this experimental study, the antifungal activity of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum verum* and nystatin against of *Candida albicans* ATCC10231 was evaluated in order to determine MIC according to CLSI-M27S4 guidelines. Powder and monomer were poured into tablet molds to make self-cure acrylic plaques. A total of 144 self- cure acrylic plaques were divided into 24 groups of 6 in petri dish. Three groups contained powder and monomer, three groups contained nystatin drug, and 18 groups contained different concentrations of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Cinnamomum verum*. Then, the samples were incubated in artificial saliva enriched, with *Candida albicans* at 37°C and the effects of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Cinnamomum verum* on the binding of *Candida albicans* were reported by the cfu/ml count method. Statistical analysis of data was done using Stata-15 software. ANOVA and Tukey's test were used to confirm the results.

**Results:** The evaluating the sensitivity of *Candida albicans* ATCC10231 to essential oils of *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum verum* and Nystatin were obtained as MIC= 120µg/ml, MIC= 340µg/ml and MIC= 1µg/ml, respectively. The attachment of yeast cells to self- cure acrylic blocks for *Cinnamomum verum* essential oil was significant in MIC= 340 µg/ml (p= 0.02), MIC= 680 µg/ml (p= 0.01) and nystatin 1 µg/ml (p= 0.00) compared to the negative control group. However, this amount was not statistically significant for *Thymus vulgaris* essential oil (p= 0.14).

**Conclusion:** Adding essential oil of *Cinnamomum verum* to acrylic resin prosthesis can be effective in controlling the proliferation of *Candida albicans* on the surface of the prosthesis. However, its effects on the physical properties of acrylic resin dentures need further studies.

**Keywords:** *Thymus vulgaris*; *Cinnamomum verum*; *Candida albicans*; Acrylic resins; Orthodontic Appliances Removable

**Please cite this article as:** Kazemi E, Ansari S, Sheikhzadeh S, Jafarzadeh J, Taghizadeh Armaki M, Gharekhani S, Chehrazi M, Pournajaf A. The Effect of Adding *Thymus Vulgaris* and *Cinnamomum Verum* Essential Oils in Self- Cured Acrylic Blocks on Adhesion of *Candida Albicans*. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(1):34-42.

\* **First Corresponding Author:** Sedigheh Sheikhzadeh; Email: se.sheikhzadeh@gmail.com

\* **Second Corresponding Author:** Mojtaba Taghizadeh Armaki; Email: M.Taghizadeh@mubabol.ac.ir

## بررسی اثر افزودن اسانس آویشن باغی و دارچین به پلاک‌های آکرلیکی Self-cure بر

### کلونیزاسیون کاندیدا آلبیکنس

الهام کاظمی<sup>۱</sup>، سهام انصاری<sup>۲</sup>، صدیقه شیخ‌زاده<sup>۳\*</sup>، جلال جعفرزاده<sup>۴</sup>، مجتبی تقی‌زاده ارمکی<sup>۴\*</sup>، سمانه قره‌خانی<sup>۵</sup>، محمد چهارزی<sup>۶</sup>، اباذر پورنجف<sup>۴</sup>

- ۱- مرکز تحقیقات سلامت و بهداشت دهان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
- ۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.
- ۳- مرکز تحقیقات مواد دندان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
- ۴- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
- ۵- مرکز تحقیقات سلامت دهان، گروه دندانپزشکی اطفال، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
- ۶- گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۲

#### خلاصه

**سابقه و هدف:** کاندیدایزیس دهانی شایع‌ترین عفونت مخاط دهان با عوامل کاندیدا/ است. گونه‌های کاندیدا/ در بیماران نیازمند ارتودنسی با پلاک متحرک تشکیل بیوفیلم داده که این ساختار می‌تواند منجر به کاندیدا شود. یافتن ترکیبات گیاهی مؤثر به دلیل کمتر بودن عوارض جانبی و طبیعی بودن ترکیبات آنها برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم حائز اهمیت است. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر افزودن اسانس آویشن باغی و دارچین به بلوک‌های آکرلیکی از نوع self-cure بر کلونیزاسیون کاندیدا/ آلبیکنس بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، حساسیت اسانس آویشن، دارچین و نیستاتین نسبت به کاندیدا/ آلبیکنس ATCC10231 به منظور تعیین MIC با روش CLSI-M27S4 تعیین شد. پودر و مونومر برای ساخت پلاک‌های آکرلیک self-cure درون قالب‌های قرص ریخته شد. تعداد ۱۴۴ پلاک در ۲۴ گروه شش‌تایی تقسیم شد. سه گروه حاوی پودر و مونومر، سه گروه داروی نیستاتین و ۱۸ گروه حاوی غلظت‌های مختلف آویشن باغی و دارچین بودند. سپس نمونه‌ها در بزاق مصنوعی غنی از کاندیدا/ آلبیکنس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و تأثیر آویشن و دارچین بر اتصال کاندیدا/ آلبیکنس با روش تعیین شمارش کلنی Cfu/ml گزارش شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Stata-15 انجام شد. از آزمون ANOVA و تست توکی برای تأیید نتایج استفاده شد.

**یافته‌ها:** ارزیابی حساسیت ایزوله کاندیدا/ آلبیکنس ATCC10231 نسبت به اسانس‌های آویشن باغی و دارچین و نیستاتین به ترتیب  $MIC=120 \mu g/ml$ ،  $MIC=340 \mu g/ml$  و  $MIC=1 \mu g/ml$  به دست آمد. کاهش اتصال سلول‌های مخمری به بلوک‌ها برای اسانس دارچین با غلظت  $MIC=340 \mu g/ml$  ( $p=0/02$ ) و  $MIC=680 \mu g/ml$  ( $p=0/01$ ) و نیستاتین  $MIC=1 \mu g/ml$  ( $p=0/00$ ) نسبت به گروه کنترل منفی معنادار بود. در حالی که این میزان برای اسانس آویشن از لحاظ آماری معنادار نبود ( $p=0/14$ ).

**نتیجه‌گیری:** افزودن اسانس دارچین به پروتز آکرلیک رزین می‌تواند در کنترل تکثیر کاندیدا/ آلبیکنس روی سطح پروتز مؤثر باشد. با این حال، اثر آن روی خواص فیزیکی دندان مصنوعی رزین آکرلیک نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

**واژگان کلیدی:** آویشن، دارچین، کاندیدا/ آلبیکنس؛ رزین‌های آکرلیک؛ پلاک متحرک ارتودنسی

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Kazemi E, Ansari S, Sheikhzadeh S, Jafarzadeh J, Taghizadeh Armaki M, Gharekhani S, Chehrizi M, Pournajaf A. The Effect of Adding Thymus Vulgaris and Cinnamomum Verum Essential Oils in Self-Cured Acrylic Blocks on Adhesion of Candida Albicans. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(1):34-42.

\*اولین نویسنده مسئول مکاتبات: صدیقه شیخ‌زاده؛ آدرس پست الکترونیکی: se.sheikhzadeh@gmail.com

\*دومین نویسنده مسئول مکاتبات: مجتبی تقی‌زاده ارمکی؛ آدرس پست الکترونیکی: M.Taghizadeh@mubabol.ac.ir

## مقدمه

یکی از گونه‌های شایع فلور قارچی دهان، *کاندیدا آلبیکنس* است که در بیش از ۶۰ درصد جمعیت افراد سالم مشاهده می‌شود (۱). کاندیدیازیس دهانی و دنچر استوماتیت کاندیدای اشکال بالینی عفونت‌های فرصت طلب دهان است که به دنبال رشد بیش از حد قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، مرحله اتصال به سطوح با استفاده از ویروالانس *کاندیدا آلبیکنس*، مرحله اتصال به سطوح با استفاده از ادهسین است که با توجه به استفاده فراوان افراد مسن از پروتزهای دهانی این فاکتور ویروالانس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۴-۶). از آنجا که دنچر استوماتیت یک بیماری قارچی است، بسیاری از محققان روش‌های ضد قارچی مختلفی با ترکیبات متفاوت را برای درمان آن پیشنهاد داده‌اند (۷-۹). به طور مثال رایبا در سال ۲۰۱۹ در مطالعه‌ای اثربخشی درمان فتودینامیک در مقابل نیستاتین موضعی در درمان دنچر استوماتیت تایید کرد (۸) و افروزی در سال ۲۰۱۹ تاثیر درمان فتودینامیک با واسطه ایندوسیانیل سبز در درمان دنچر استوماتیت را گزارش کرد (۹). مطالعات نشان دادند مشکلی که در درمان *کاندیدا آلبیکنس* وجود دارد، افزایش مقاومت در برابر ضد میکروب‌ها و کاهش حساسیت به انواع داروهای ضد قارچ (از جمله فلوکونازول، نیستاتین، کلرهگزیدین، تربینافین، آموتریسین ب و تری آزول) است (۱۰، ۱۱). بسیاری از محققان سعی کردند با کنترل چسبندگی *کاندیدا آلبیکنس* روی سطوح رزین آکریلیک مشکل تشکیل بیوفیلم را روی سطوح پروتزهای دهانی مدیریت کنند (۱۲-۱۴). اسانس‌های روغنی مانند دارچین با نام علمی *Cinnamomum verum* و نیز گیاه آویشن با نام علمی *Thymus vulgaris* از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که خواص هیدروفوبیک داشته که با تخریب لیپیدهای غشای باکتری مانع از اتصال آنها به سطوح می‌شوند و همچنین خاصیت ضد قارچی و آنتی‌اکسیدان برای این دو گیاه گزارش شده است. (۱۵-۱۸). با توجه به تجمع *کاندیدا* در پلاک‌های آکریلی و اثر ضد میکروبی اثبات شده دو گیاه آویشن و دارچین، هدف مطالعه

حاضر تعیین اثر افزودن اسانس‌های گیاهان آویشن و دارچین به بلوک‌های آکریلی *self-cure* کلونیزاسیون *کاندیدا آلبیکنس* است.

## روش کار

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام شد. ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* ATCC10231 از دانشگاه علوم پزشکی مازندران و اسانس‌های آویشن باغی و دارچین از شرکت ایمن دارو تهیه شد. پودر (polymethacrylate) و مایع (methylmethacrylate) از شرکت آکروپارس خریداری شد. برای محاسبه حجم نمونه از فرمول زیر و همچنین نرم‌افزار PASS نسخه ۱۱ استفاده شد و تعداد ۱۴۴ پلاک رزین آکریلیک در ۲۴ گروه ۶ تایی آزمایش شدند. این پژوهش مطابق با پروتکل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل با کد اخلاق IR.MUBABOL.HRIREC.1398.215 انجام شده است.

$$n_1 = \frac{(s_1^2 + R * s_2^2)(z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta})^2}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2} \quad n_1 = Rn_2$$

## ارزیابی اثر ضد قارچی اسانس‌های گیاهان آویشن باغی و دارچین:

تست ارزیابی حساسیت ضدقارچی اسانس‌ها بر اساس دستورالعمل CLAI-M27-A3 به روش میکرودایلوشن برات<sup>۱</sup> انجام شد (۱۹) در این مطالعه از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف استفاده شد. از دو ردیف آخر به‌عنوان کنترل مثبت و منفی تست استفاده شد. کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی بوده و کنترل منفی فقط حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI بود. ابتدا به تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI به غیر از چاهک ردیف اول اضافه شد. در چاهک‌های ردیف اول ۲۰۰ میکرولیتر از

<sup>1</sup>. Microdilution Broth Method

اسانس‌های گیاهی با غلظت ابتدایی تعیین شده، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات ردیف اول برداشته و به ردیف دوم منتقل کرده و این عمل تا ردیف دهم تکرار شد و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از ردیف دهم دور ریخته شد. به این ترتیب رقت دارویی برای نیستاتین ( $16-0.32/0$ )، آویشن باغی ( $480-0.93/0$ ) و برای دارچین ( $1360-2/65$ ) تهیه شد. به تمامی چاهک‌ها (به جز چاهک کنترل منفی) ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری با طول موج ۷۷-۷۵ درصد اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بعد از اتمام این زمان، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی گزارش شد. بر اساس دستورالعمل استفاده شده ۵۰ درصد مهار رشد نسبت به کنترل مثبت به عنوان حداقل غلظت مهار (MIC) لحاظ شد (۲۰). پودر و مایع رزین‌های اکریلیک به طور مجزا در یک محفظه در بسته به همراه قرص فرمالین به مدت ۲۴ ساعت برای استریلیزاسیون قرار داده شد. سطح درونی روکش‌های قرص بعد از شست‌وشو خشک و به لایه نازکی از وازلین آغشته شد. هر قالب دایره‌ای دارای قطر ۲۰ mm و ضخامت ۱ mm بود. پودر و منومر را درون ۱۴۴ قالب قرص ریخته و بعد از مرحله خمیری شدن به ۲۴ گروه ۶ تایی تقسیم شد و بر اساس گروه‌بندی ذیل قطره‌های اسانس به آنها اضافه شد که هر قطره معادل ۵۰ میکرولیتر است.

گروه ۱: افزودن یک قطره اسانس آویشن باغی با غلظت MIC.  
گروه ۲: افزودن دو قطره اسانس آویشن باغی با غلظت MIC.  
گروه ۳: افزودن سه قطره اسانس آویشن باغی با غلظت MIC.  
گروه ۴: افزودن یک قطره اسانس آویشن باغی با دو غلظت پایین‌تر از MIC.  
گروه ۵: افزودن دو قطره اسانس آویشن باغی با دو غلظت پایین‌تر از MIC.  
گروه ۶: افزودن سه قطره اسانس آویشن باغی با دو غلظت پایین‌تر از MIC.

گروه ۷: افزودن یک قطره اسانس آویشن باغی با دو غلظت بالاتر از MIC.  
گروه ۸: افزودن دو قطره اسانس آویشن باغی با دو غلظت بالاتر از MIC.  
گروه ۹: افزودن سه قطره اسانس آویشن باغی با دو غلظت بالاتر از MIC.  
گروه ۱۰: افزودن یک قطره اسانس دارچین با غلظت MIC.  
گروه ۱۱: افزودن دو قطره اسانس دارچین با غلظت MIC.  
گروه ۱۲: افزودن سه قطره اسانس دارچین با غلظت MIC.  
گروه ۱۳: افزودن یک قطره اسانس دارچین با دو غلظت پایین‌تر از MIC.  
گروه ۱۴: افزودن دو قطره اسانس دارچین با دو غلظت پایین‌تر از MIC.  
گروه ۱۵: افزودن سه قطره اسانس دارچین با دو غلظت پایین‌تر از MIC.  
گروه ۱۶: افزودن یک قطره اسانس دارچین با دو غلظت بالاتر از MIC.  
گروه ۱۷: افزودن دو قطره اسانس دارچین با دو غلظت بالاتر از MIC.  
گروه ۱۸: افزودن سه قطره اسانس دارچین با دو غلظت بالاتر از MIC.  
گروه ۱۹: افزودن یک قطره نیستاتین به عنوان کنترل مثبت.  
گروه ۲۰: افزودن دو قطره نیستاتین به عنوان کنترل مثبت.  
گروه ۲۱: افزودن سه قطره نیستاتین به عنوان کنترل مثبت.  
گروه ۲۲، ۲۳ و ۲۴: به ترتیب افزودن یک، دو و سه قطره پلاسبو (آب مقطر) به عنوان کنترل منفی.

بعد از ۱۵ دقیقه دیسک‌ها از روکش خارج شده و تمام سطوح هر یک توسط کاغذ سمباده و هندپیس پالیش شدند تا سطحی صاف و صیقلی ایجاد شود. در پایان ۱۳۲ دیسک رزین آکریلی ساخته شده برای خارج سازی مونومر اضافه، به مدت ۴۸ ساعت درون سرم فیزیولوژی (NaCl، ۰/۸۵ درصد) غوطه‌ور شدند.

سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس تعداد کلنی‌های تشکیلی روی محیط سابوروی دکستروز آگار شمارش شد.

### یافته‌ها

نتایج تست ارزیابی حساسیت ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به اسانس آویشن باغی، دارچین و نیستاتین به ترتیب  $MIC = 1 \mu g/ml$  و  $MIC = 340 \mu g/ml$ ،  $MIC = 120 \mu g/ml$  گزارش شد (جدول ۱). در ادامه، اتصال سلول‌های مخمری *کاندیدا* به بلوک‌های آکرلی حاوی یک غلظت بالا و یک غلظت پایین  $MIC$  ارزیابی شد. براساس نتایج تست تعقیبی توکی کاهش اتصال سلول‌های مخمری به بلوک‌های آکرلی حاوی اسانس دارچین با غلظت  $340 \mu g/ml$  ( $p = 0/02$ ) و  $680 \mu g/ml$  ( $p = 0/01$ ) و نیستاتین  $1 \mu g/ml$  ( $p = 0/00$ ) نسبت به گروه کنترل منفی معنادار بود. در حالی که این میزان برای اسانس آویشن از لحاظ آماری معنادار نبود ( $p = 0/14$ ). اتصال سلول‌های مخمری به بلوک‌ها با افزایش تعداد قطره‌های اسانس دارچین از یک به سه ( $P = 0/02$ ) و دو به سه قطره ( $P = 0/01$ ) و در سه حالت داروی نیستاتین ( $P = 0/00$ ) به میزان قابل توجهی کاهش یافت ( $P = 0/00$ ). نتایج مقایسه اثر یک قطره اسانس آویشن باغی با یک قطره اسانس دارچین در کاهش اتصال سلول‌های مخمری به بلوک‌های آکرلی از لحاظ آماری معنادار نبود ( $P = 0/83$ )، همچنین عدم معناداری در مقایسه حالت‌های دو قطره ( $P = 0/87$ ) و سه قطره ( $P = 0/93$ ) اسانس‌های گیاهی با یکدیگر نیز مشاهده شد. نتایج نشان داد در بین تمامی گروه‌های بررسی شده به ترتیب نیستاتین با  $MIC = 1 \mu g/ml$  و دارچین با  $MIC = 680 \mu g/ml$  (حجم سه قطره) بیشترین اثر ممانعت از اتصال سلول‌های مخمری *کاندیدا* به بلوک‌های آکرلی داشته‌اند ( $p = 0/00$ )، اما مقایسه اثر نیستاتین و دارچین از لحاظ آماری معنادار نبود ( $p = 1/00$ ).

دیسک‌ها خشک شده و پس از آن توسط آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند (۲۱، ۲۲).

### تهیه سوسپانسیون قارچی:

ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* ATCC10231 در پلیت حاوی محیط سابورد دکستروز آگار مکمل به کلرامفنیکل (SC) کشت داده شد. پلیت در انکوباتور (بهداد، ۵۰ لیتری) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و برای آزمایش استفاده شد. سوسپانسیون مخمری با ترانس‌میتنس ۷۵-۷۷ (تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در هر میلی‌لیتر) با سرم فیزیولوژی و کلنی مخمری تهیه شد (۲۳).

### ساخت بزاق مصنوعی:

برای تهیه بزاق مصنوعی در مرحله اول ۱۰ گرم سدیم هیدروکسی متیل سلولز را در ۲۰۰ سی‌سی آب‌جوش حل شد. در ادامه در پنج لوله مجزا ۲۰۰ سی‌سی از محلول مرحله اول را ریخته و به هر یک از لوله‌ها به ترتیب ۰/۶۲۵ گرم پتاسیم کلراید، ۰/۵۹ گرم منیزیم کلراید، ۰/۱۶۶ گرم از کلسیم کلراید، ۰/۸۰۴۷ دی پتاسیم فسفات و ۰/۳۲۶ مونوپتاسیم فسفات (مرک، آلمان) اضافه شد. در انتها محلول لوله دوم به لوله اول منتقل شد و به ترتیب محلول لوله‌های بعدی به لوله قبلی اضافه و مخلوط شدند (۲۴، ۲۵).

### ارزیابی اتصال سلول *کاندیدا* به پلاک‌های آکرلیک رزینی:

برای تعیین اتصال *کاندیدا آلبیکنس* به پلاک‌های آکرلیک رزینی مراحل ذیل انجام شد: پلاک‌ها در لوله‌های آزمایش استریل حاوی ۶ ml بزاق مصنوعی شامل سوسپانسیون *کاندیدا آلبیکنس* ( $10^7 \text{ cfu/ml}$  × ۶-۷) قرار داده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته انکوبه (بهداد ۵۰ لیتری، ایران) شد. پلاک‌ها توسط پنس استریل برداشته و با آب مقطر استریل شسته شد. سپس پلاک‌ها را در یک میلی‌لیتر محیط سابوروی دکستروز براث برای مدت ۱۰ دقیقه گذاشته و بعد به مدت یک دقیقه با ورتکس مخلوط شد. ۵۰ میکرولیتر از محیط سابوروی دکستروز براث (مرک، آلمان) به محیط سابوروی دکستروز آگار (مرک، آلمان) منتقل و در دمای ۳۷ درجه

جدول ۱- میزان MIC اسانس آویشن باغی، دارچین و نیستاتین نسبت به ایزوله کاندیدا آلبیکنس

MIC range (µg/ml)			نوع اسانس
یک غلظت کمتر از MIC	MIC	یک غلظت بیشتر از MIC	
۶۰	۱۲۰	۲۴۰	آویشن باغی
۱۷۰	۳۴۰	۶۸۰	دارچین
۰/۵	۱	۲	نیستاتین

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دارچین در غلظت ۳۴۰ و ۶۸۰ میکروگرم / میلی‌لیتر به طور معناداری سبب ممانعت از کلونیزاسیون و چسبندگی کاندیدا آلبیکنس شده است و می‌تواند در تولید محیط ضد میکروبی علیه کاندیدا آلبیکنس مؤثر باشد درحالی‌که این حالت در مورد آویشن صادق نبود. Nawasrah و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با استفاده از دو روش شمارش کلنی و آگار دایلوژن نشان دادند که تغییرات کاندیدا زنده بین گروه شاهد و گروه B (غلظت پودر حنا ۱درصد) با  $p\text{-value} = ۰/۰۰۰۱$  از نظر آماری معنی‌دار بود و اثرات ضد قارچی پودر حنا را گزارش کردند (۲۲) و همین‌طور Christophe و همکارانش در سال ۲۰۰۹، اثر مهارتی ترکیب رزین آکریلیک و مونومر با کلرگزیدین گلوکونات را در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت با  $(P < ۰/۰۵)$  در تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس روی پلاک آکریلی و عدم رشد کاندیدا آلبیکنس در سطح پروتزها گزارش کردند (۲۶). با وجود تفاوت در روش‌های تهیه اسانس، روش انجام آزمایش و گونه‌های گیاهی مورد استفاده، در مطالعه ما نیز همانند مطالعات فوق اثر ضد قارچی عصاره گیاهان ترکیب شده با رزین آکریلیک وی مخمر کاندیدا آلبیکنس گزارش شد. در سال ۲۰۱۷ نیز Yamala و Raghunath اثر عصاره گیاه زردچوبه بر چسبندگی کاندیدا آلبیکنس به رزین آکریلیک حرارت داده شده در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند که تاثیر محلول کورکومین ۰/۳ درصد موجود در گیاه زردچوبه روی چسبندگی کاندیدا آلبیکنس به پروتز آکریلیک، از نظر آماری معنادار بود

( $P < ۰/۰۵$ ) و همانند نتایج مطالعه حاضر برای اسانس دارچین سبب کاهش چسبندگی سلول‌های مخمری به سطوح شد (۲۷) با این تفاوت که از روش رشد در محیط سابورو دکستروز آگار به جای روش میکرودایلوژن برات استفاده کرده بودند. در مطالعه Goncalves و همکاران (۲۰۱۹)، اثر ضد بیوفیلمی ترکیب آن- بوتانول موجود در گیاه بادام هندی را روی میزان اتصال و کلونیزاسیون کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا به سطوح رزین آکریلیک با استفاده از روش غوطه‌وری‌سازی بررسی کردند. نتایج مطالعه فوق نشان داد که غوطه‌وری رزین آکریلیک در ترکیب آن بوتانول موجود در گیاه مذکور در کاهش اتصال سلول‌های مخمری به سطوح با  $P=۰/۰۰۱$  معنادار بوده و مؤثر است (۲۸). در این مطالعه همانند نتایج مطالعه حاضر در مورد اسانس دارچین آثار مؤثر اسانس‌های گیاهی در کاهش اثر بیوفیلمی ایزوله‌های مخمری گزارش شد. در مطالعه میبیدی و همکارانش که تأثیر دهانشویه زنجبیل Vi-one بر گونه‌های کاندیدا آلبیکنس PTCC ۵۰۲۷ در مقایسه با نیستاتین و با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بررسی شد، قطر منطقه بازدارندگی گروه نیستاتین ۴/۰۸ میلی‌متر و نیز دهانشویه Vi-one ۱/۱۶ میلی‌متر بود و نتایج از نظر آماری معنادار بود و همچنین در بررسی قدس و همکارانش که در سال ۲۰۲۱ اثر ضد قارچی دهانشویه زنجبیل و نیستاتین روی مخمر کاندیدا آلبیکنس به دو روش انتشار چاهک آگار و انتشار دیسک آگار بررسی شد، نتایج از نظر آماری معنادار بود ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ) و یافته‌های مطالعه قبل مبنی بر اثر اندک زنجبیل روی رشد گونه‌های مخمری تأیید شد که بر خلاف نتایج مطالعه حاضر بود. از دلایل اختلاف در نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با مطالعات

## نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر به نظر می‌رسد استفاده از عوامل ضد قارچی موجود در اسانس گیاهی دارچین اضافه شده در پلاک‌های متحرک آکریلی بر خلاف اسانس گیاه آویشن به صورت طبیعی می‌تواند در کاهش اتصال سلول‌های مخمری و کلونیزاسیون قارچ به سطوح در کنار مصرف داروهای ضدقارچی مؤثر باشد. با توجه به تفاوت تاثیرگذاری دارچین نسبت به آویشن و همین‌طور تفاوت معنادار مشاهده شده در غلظت‌های مؤثره می‌توان نتیجه گرفت میزان غلظت و اسانس نوع گیاه در کاهش اتصال سلول‌های مخمری به سطوح پروتزی اهمیت ویژه‌ای دارد که نیاز به بررسی‌های بیشتر روی گیاهان متنوع در غلظت‌های متفاوت است.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از سرکار خانم مریم السادات شفیعی که در تمام مراحل اجرای پایان‌نامه همکاری داشته‌اند، سپاسگزاری می‌شود. ابن مطالعه حاصل پایان‌نامه با شماره کد رهگیری ۷۲۴۱۳۲۵۳۱ خانم دکتر الهام کاظمی برای دریافت دکتری عمومی در رشته دندانپزشکی از دانشکده داندنپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل بود.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی بابل بررسی و با کد اخلاق IR.MUBABOL.HRIREC.1398.215 ثبت شده است.

## تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

انجام شده، می‌توان به تفاوت اسانس‌های گیاهان بررسی شده و نیز استفاده از روش‌های مختلف ارزیابی حساسیت ضد قارچی اشاره کرد. لازم به ذکر است که سطح پروتزی‌های دندانی و پلاک‌های متحرک ساخته شده از رزین آکرلیک (PMMA) با قرار گرفتن در محیط دهان، توسط پلیکل متشکل از پروتئین‌های بزاقی، پوشانده می‌شوند. این پلیکل خواص سطحی PMMA را تغییر می‌دهد و سبب پیوستگی بعدی میکروارگانیسم‌ها از جمله گونه‌های کاندیدا در سطح پروتزی می‌شود. گزارش شده است که زبری سطح به دلیل تأثیر آن بر چسبندگی میکروبی، یک ویژگی حیاتی است (۲۶). برخی مطالعات نشان دادند که اعمال تغییراتی روی سطح پلاک‌های آکریلی با یک سری مواد خاص به منظور کاهش چسبندگی کاندیدا/آلبیکنس، دارای اثر ضد میکروبی روی رزین‌های آکریلی است (۱۲). اساس این ایده، در نظر گرفتن سطح رزین آکرلیک به عنوان مکانی مناسب سبب چسبندگی و کلونیزاسیون پلاک است (۲۹). همچنین پیشنهاد شد مواد پوشاننده آب دوست ممکن است در کاهش چسبندگی کاندیدا/آلبیکنس مؤثر باشد (۳۰). با توجه به تفاوت‌های موجود در نوع گیاه، غلظت‌های استفاده شده و روش‌های تهیه و انجام آزمایش در مطالعات بررسی شده با مطالعه حاضر نتایج در مجموع نشان‌دهنده کاهش اتصال سلول‌های مخمری به سطوح رزین‌های آکرلیک در مجاورت اسانس‌های گیاهی بوده است. استفاده از روش میکرو دایلوژن برات و همچنین استفاده از اسانس دو گیاه مختلف از نقاط قابل توجه و مثبت مطالعه بود. از طرفی عدم استفاده از گونه‌های استاندارد کاندیدای غیر آلبیکنس در کنار گونه کاندیدا/آلبیکنس را می‌توان از نقاط ضعف مطالعه دانست. برای تأیید نتایج، باید مطالعات بیشتری با تعداد بیشتری از ایزوله‌های مخمری در شرایط مدل‌های آزمایشگاهی و حیوانی انجام شود. چشم‌اندازهای آینده این مطالعه همچنین می‌تواند شامل استفاده از این منابع ضد قارچ طبیعی موجود در سیستم تحویل دارو باشد.

## References

- Berman J. *Candida albicans*. *Current biology*. 2012;22(16):R620-R2.
- Fatahi M, Shokohi T, Sooteh H, Hedayati M, Okhovatian A, Tamadoni A, et al. Molecular identification of *Candida albicans* isolated from the oncology patients at four university hospitals in Mazandaran province (2005-6). *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2007;17(61):1-11.
- Mahdavi Omran S, Rezaei Dastjerdi M, Zuashkiani M, Moqarabzadeh V, Taghizadeh-Armaki M. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from Iranian patients with denture stomatitis. *BioMed Research International*. 2018;2018.
- Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca P, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors—a large cohort. *Journal of oral rehabilitation*. 2007;34(6):448-55.
- Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Medical mycology*. 2011;49(2):208-11.
- Pires F, Santos E, Bonan P, De Almeida O, Lopes M. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *Journal of oral rehabilitation*. 2002;29(11):1115-9.
- Pattanaik S, Vikas B, Pattanaik B, Sahu S, Lodam S. Denture stomatitis: a literature review. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*. 2010;22(3):136.
- Alrabiah M, Alsahhaf A, Alofi RS, Al-Aali KA, Abduljabbar T, Vohra F. Efficacy of photodynamic therapy versus local nystatin in the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2019;28:98-101.
- Afrooz B, Zomorodian K, Lavaee F, Shahrabadi ZZ, Mardani M. Comparison of the efficacy of indocyanine green-mediated photodynamic therapy and nystatin therapy in treatment of denture stomatitis. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2019;27:193-7.
- Kuhn D, George T, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(6):1773-80.
- Coogan M, Fidel Jr P, Komesu M, Maeda N, Samaranyake L. (B1) *Candida* and mycotic infections. *Advances in dental research*. 2006;19(1):130-8.
- Ali AA, Alharbi FA, Suresh C. Effectiveness of coating acrylic resin dentures on preventing *Candida* adhesion. *Journal of Prosthodontics*. 2013;22(6):445-50.
- Yodmongkol S, Chantarachindawong R, Thaweboon S, Thaweboon B, Amornsakchai T, Sriksirin T. The effects of silane-SiO<sub>2</sub> nanocomposite films on *Candida albicans* adhesion and the surface and physical properties of acrylic resin denture base material. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2014;112(6):1530-8.
- Izumida FE, Moffa EB, Vergani CE, Machado AL, Jorge JH, Giampaolo ET. In vitro evaluation of adherence of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Streptococcus mutans* to an acrylic resin modified by experimental coatings. *Biofouling*. 2014;30(5):525-33.
- Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;130(1):107-15.
- Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, et al. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(1):65-70.
- Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2009;10(4):627-32.
- Braga PC, Ricci D. Thymol-induced alterations in *Candida albicans* imaged by atomic force microscopy. *Atomic Force Microscopy in Biomedical Research*: Springer; 2011. p. 401-10.
- Kazemi A, Nowrozi H, Badiie Moghadam M. Drug susceptibility testing of clinical isolates of *Candida albicans* against Amphotericin B and Ketoconazole by microdilution and disk diffusion methods. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2017;19(2):59-64.



20. Sokolonski AR, Fonseca MS, Machado BAS, Deegan KR, Araújo RPC, Umsza-Guez MA, et al. Activity of antifungal drugs and Brazilian red and green propolis extracted with different methodologies against oral isolates of *Candida* spp. *BMC complementary medicine and therapies*. 2021;21(1):1-14.
21. Khan MA, Dhaded S, Joshi S. Commercial and plant extract denture cleansers in prevention of *Candida albicans* growth on soft denture reliner: In vitro study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2016;10(2):ZC42.
22. Nawasrah A, AlNimr A, Ali AA. Antifungal effect of henna against *Candida albicans* adhered to acrylic resin as a possible method for prevention of denture stomatitis. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(5):520.
23. Lee H, Choi SH, Oh J, Koo J, Lee HJ, Cho SI, et al. Comparison of Six Antifungal Susceptibilities of 11 *Candida* Species Using the VITEK2 AST-YS08 Card and Broth Microdilution Method. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(2):e01253-21.
24. Arain SS, Kazi TG, Arain JB, Afridi HI, Brahman KD. Preconcentration of toxic elements in artificial saliva extract of different smokeless tobacco products by dual-cloud point extraction. *Microchemical Journal*. 2014;112:42-9.
25. Amal ASS, Hussain S, Jalaluddin M. Preparation of artificial saliva formulation. 2015.
26. Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Archives of oral biology*. 2009;54(6):588-94.
27. Yamala NYN, Raghunath VRV. Effect of *Curcuma longa* extract on *Candida albicans* adhesion to heat cure acrylic resin denture material: An in-vitro study. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*. 2017:18-23.
28. Gonçalves LM, Madeira PLB, Diniz RS, Nonato RF, Siqueira FSFd, de Sousa EM, et al. Effect of *Terminalia catappa* Linn. on Biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata* and on Changes in Color and Roughness of Acrylic Resin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019.
29. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics: Implant, Esthetic and Reconstructive Dentistry*. 2011;20(4):251-60.
30. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses*. 2010;53(3):221-6.