

تأثیر آدامس حاوی کلپوره بر کاهش میزان استرپتوکوک موتانس بزاق

سمیه خرمیان طوسی^{۱*}، احمد جعفری^۲، سید محمود امین مرعشی^۳، سالومه فرامرزی نیکنام^۴، ملیحه فریده^۵
 استادیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۲دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۳گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
^۴دندانپزشک، تهران، ایران

^۵گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۶/۶/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۹

Effect of Teucrium Polium-Containing Chewing Gum on Reducing Salivary Streptococcus Mutans Counts

Somayeh Khoramian Tusi^{1*}, Ahmad Jafari², Seyed Mahmoud Amin Marashi³,
 Salomeh Faramarzi Niknam⁴, Malihe Farid⁵

¹Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

²Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Alborz University of Medical Sciences Karaj, Iran

³Department of Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁴Dentist, Tehran, Iran

⁵Dept of Community Medicine, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Received: 10 September 2017; Accepted: 3 September 2017

Introduction: Several studies have reported the antibacterial effect of Teucrium polium extract. In this study, we sought to determine the effect of a chewing gum containing the aqueous extract of Teucrium polium on the level of salivary Streptococcus mutans.

Materials and Methods: In this double-blind clinical trial, 20 dental students were randomly assigned to two groups of intervention and control. The intervention group received a chewing gum containing the aqueous extract of *Teucrium polium*, and the control group received a chewing gum without any plant extract. Each person chewed the gum for 20 minutes three times a day (after each meal) for three weeks. Unstimulated saliva samples were collected at the beginning of the experiment before the use of the gums and one day after the final gum consumption. The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique was employed to determine the bacterial level. The colonization rate of *Streptococcus mutans* was compared between the two groups by using t-test in SPSS, version 21.

Results: There was no significant difference between the two groups in terms of *Streptococcus mutans* counts before the intervention ($P > 0.05$). The consumption of *Teucrium polium* extract-containing chewing gum in comparison with the placebo gum significantly diminished the number of *Streptococcus mutans* colonies ($P = 0.002$).

Conclusion: The results of this study showed that the chewing gum containing the aqueous extract of *Teucrium polium* significantly lowered the colonization rate of *Streptococcus mutans* in human saliva.

Keywords: Chewing gum, Streptococcus mutans, Salvia, Teucrium polium extract.

*Corresponding Author: DrKhoramian@Abzums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2018; 42(2): 141-50.

چکیده

مقدمه: در مطالعات متعددی اثر ضدباکتری عصاره گیاه کلپوره (*Teucrium polium*) گزارش شده است. هدف از تحقیق حاضر، تعیین اثر آدامس حاوی عصاره آبی گیاه دارویی کلپوره بر تعداد استرپتوکوک موتانس بزاق بود.

مواد و روشها: در این کارآزمایی بالینی دوسویه کور، تعداد ۲۰ دانشجوی دندانپزشکی به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول، آدامس حاوی عصاره آبی گیاه کلپوره دریافت نمودند. گروه دوم، آدامس بدون عصاره گیاه کلپوره دریافت نمودند. هر فرد به مدت سه هفته و هر روز سه بار بعد از هر وعده غذایی، آدامسها را به مدت ۲۰ دقیقه استفاده کردند. نمونه بزاق غیرتحریکی افراد در شروع آزمایش و قبل از مصرف آدامسها و یک روز پس از مصرف آدامس نهایی و اتمام دوره جمع آوری شد. برای تعیین میزان باکتری از روش qPCR استفاده شد. مقایسه میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس بین گروهها با استفاده از آزمون T و نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت. ($\alpha = 0/05$)

یافته ها: دو گروه مورد بررسی از نظر تعداد کلونیهای استرپتوکوک موتانس قبل از مصرف آدامس اختلاف آماری معنی داری با یکدیگر نداشتند ($P > 0.05$). مصرف آدامس حاوی کلپوره در مقایسه با آدامس دارونما به طور معنی داری باعث کاهش تعداد کلونیهای استرپتوکوک موتانس گردید ($P = 0.002$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آدامس حاوی عصاره آبی کلپوره میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس را در بزاق انسان به طور قابل توجهی کاهش داد.

کلمات کلیدی: آدامس، استرپتوکوک موتانس، بزاق، عصاره کلپوره. مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۷ دوره ۴۲ / شماره ۲: ۵۰-۱۴۱.

مقدمه

یک مطالعه در زمینه استفاده از این گیاه در حیطه دندانپزشکی و به عنوان دهانشویه انجام شده است.^(۲) استفاده از آدامس در جامعه رایجتر و پرفرودارتر از استفاده از دهانشویه می باشد. به علاوه، نتایج تعدادی از تحقیقات، جویدن آدامس فاقد فند مضر را، در کاهش تجمع پلاک دندانی، کاهش تعداد استرپتوکوک موتانس بزاق و پلاک، افزایش ترشح بزاق و کاهش پوسیدگی موثر نشان داده است.^(۳و۴) با توجه به اینکه اثر گیاه دارویی کلپوره در قالب آدامس مصرفی بر بهداشت دهان و دندان مورد ارزیابی قرار نگرفته است؛ لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر آدامس حاوی عصاره آبی کلپوره بر تعداد استرپتوکوک موتانس بزاق انجام شد.

مواد و روشها

این آزمایش از نوع کارآزمایی بالینی تصادفی با گروههای موازی بود که مسائل اخلاقی آن مورد تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز با شماره تصویب Abzums.rec.1396,24 قرار گرفت. در مجموع ۲۰ دانشجوی دندانپزشکی (۱۵ دختر، ۱۵ پسر) که ضایعه پوسیدگی فعال نداشتند، پس از امضای رضایت نامه، آگاهانه انتخاب شدند. از نظر سنی نیز، دانشجویان ۲۰ تا ۳۰ ساله انتخاب شدند. برای تهیه عصاره کلپوره در دانشکده داروسازی دانشگاه البرز، سرشاخه های گلدار گیاه پس از تمیز کردن، با آب معمولی سرد و سپس با آب

از آن جایی که گونه های پاتوژن استرپتوکوکها همانند استرپتوکوک موتانس مسبب ایجاد پوسیدگی در دهان بوده و در نهایت باعث تحمیل هزینه های درمانی و یا از دست رفتن دندانها می شوند، لذا یافتن موادی که توانایی حذف و یا به حداقل رساندن این گونه های میکروبی را داشته باشد، از هر نظر اهمیت خاصی می یابد. در سالهای اخیر استفاده از داروهای گیاهی و گیاهان دارویی بر اساس دانش بومی طب سنتی در جلوگیری و درمان بیماریها شتاب بیشتری به خود گرفته است. علم دندانپزشکی نیز همگام با سایر تخصصهای علوم پزشکی روز به روز بر میزان استفاده از داروهای گیاهی و طب سنتی در بهداشت دهان و دندان می افزاید. استفاده از دهانشویه، خمیردندان و آدامسهای حاوی عصاره های گیاهی از جمله این موارد است. گیاه کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* از تیره نعناع است که جزء گیاهان خوشبو و معطر می باشد و حاوی مقادیری تانن، ترپنوئید، ساپونین، فلاونوئید، گلیکوزید-آلفا، استرول، لوکوآنتوسیانین، بتاکاریوفیلن، همولن، کاریوفیلن اکساید، دی ترپنوئید، آسپاراژین و دیتیرین است که برخی از این ترکیبات اثرات ضدالتهابی دارند.^(۱) گیاه کلپوره از جمله گیاهان دارویی طب سنتی است که برای درمان التهاب، روماتیسم و زخم مورد استفاده قرار می گیرد. تاکنون تنها

برای تشکیل دو گروه مداخله و شاهد از تخصیص تصادفی ساده استفاده شد. بدین ترتیب که دو گروه آدامس در ظرفی ریخته شده و بیماران به صورت دلخواه خودشان بسته مورد نظر را انتخاب می کردند. به گروه اول، آدامس حاوی کلپوره و به گروه دوم آدامس بدون کلپوره داده شد و هر فرد به مدت ۳ هفته، هر روز سه بار بعد از هر وعده غذایی، آدامسها را به مدت ۲۰ دقیقه می جوید. در هر وعده، فقط یک قطعه آدامس استفاده می شد.

نمونه بزاق غیرتحریکی افراد در شروع آزمایش، قبل از مصرف آدامسها و یک روز پس از مصرف آدامس نهایی و اتمام دوره جمع آوری شد. نمونه ها جهت تعیین تعداد کلونیهای استرپتوکوک موتانس به آزمایشگاه میکروپزشکی دانشگاه البرز ارسال شد. بزاق غیرتحریکی دهان به روش Spitting جمع آوری شد. از بیمار خواسته شد که یک دقیقه بزاق را در دهان جمع کرده و سپس در لوله مدرج فالكون استریل بریزد.^(۵) در طول دوره آزمایش، از افراد خواسته شد که رعایت بهداشت دهان و دندان متداول روزانه خود را تغییر ندهند و در روز دوبار با خمیر دندان Crest و مسواک Oral B توسط محقق در اختیار افراد قرار داده شده بود، مسواک بزنند. جهت تهیه نمونه های بزاق از داوطلبان خواسته شد که یک ساعت پیش از نمونه گیری، غذا و نوشیدنی مصرف نکنند. بزاق کامل غیرتحریکی در ساعت ۹ صبح به اندازه ۱/۵ میلی لیتر در لوله آزمایش جمع آوری شد.^(۶) در این تحقیق، سوش استاندارد باکتری استرپتوکوکوس موتانس (PTCC1683) از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفلیزه تهیه گردید.

دیونیزه (زالال طب شیمی، تهران، ایران) به خوبی شسته شده و در محل مناسب دور از نور، خشک گردیدند. نمونه خشک شده با آسیاب برقی آسیاب شده و از الک با مش ۳۲ عبور داده شد. ۲۵۰ گرم از پودر حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دو لیتر آب خیسانده شده و سپس با پمپ خلاء و کاغذ صافی واتمن صاف گردیدند. عصاره حاصله با روش تقطیر در خلاء به وسیله دستگاه روتاری در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد تغلیظ شدند. عصاره تغلیظ شده توسط آون در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت سه روز خشک گردیدند. عصاره خشک شده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۲- درجه سانتیگراد در فریزر نگهداری شدند. پس از تهیه عصاره، به شرکت مینو تحویل داده شد تا وارد آدامس گردد. ترکیبات آدامس تهیه شده شامل مواد زیر بود:

درصد	مواد
۳۶/۶۶	بیس (solsonat)
۴۱/۶۹	سوربیتول
۴	زایلیتول
۷	شریت مانیتول
۲	پودر مانیتول
۰/۶۶	اسانس پودر پرمینت
۱/۸	اسانس پرمینت
۰/۱۴	سولفام کا
۰/۰۶	سوکرالوز
۰/۰۵	ICE
۱۰٪ (جایگزین ۱۰٪ از کلپوره)	کلپوره

آدامسهای گروه شاهد از هر نظر شبیه آدامسهای گروه مداخله بود با این تفاوت که فقط فاقد عصاره کلپوره بودند.

استخراج شده، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه DNA کل استخراج شده، در روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید.

تعیین کمی استرپتوکوک موتانس بوسیله **Real-Time PCR**: پس از استخراج توتال DNA از نمونه‌های بزاق افراد به میزان ۲ μl از هر نمونه استخراج شده و به عنوان الگو در واکنش **Real-time PCR quantitative** استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی ژن *bgf* با همان ترادف قبل به اضافه پروب حاوی مولکولهای گزارشگر و خاموش‌کننده **SAM & TAMRA** مورد استفاده قرار گرفت.

پس از استخراج DNA سویه استاندارد استرپتوکوک موتانس با استفاده از کیت **DNeasy Blood & Tissue Kit** (Cat. No. 69504)، رفتهای ۱۰^۲ و ۱۰^۴ و ۱۰^۶ و ۱۰^۸ و ۱۰^{۱۰} جهت رسم منحنی استاندارد تهیه گردید. همچنین DNA نمونه‌های بزاق با استفاده از کیت فوق استخراج شده و در واکنش **Real-Time PCR** به عنوان الگو مورد استفاده قرار داده شد. هر نمونه به صورت سه تایی (**triplex**) مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتکل انجام **Real-Time PCR** بدین صورت بود که دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه برای فعال شدن آنزیم پلیمرز، چهل و پنج سیکل برای تکثیر DNA هدف با دمای ذوب ۹۴ درجه برای جدا شدن رشته‌های DNA و دمای **Annealing** ۶۰ درجه و دمای ۷۲ درجه برای تکثیر DNA هدف صورت گرفت. واکنش فوق با ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده و ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمر اختصاصی و پروب صورت گرفت. **Real-Time PCR** بوسیله دستگاه **ABI** (appaiad biosystem) و منحنی ذوب آن بوسیله دستگاه رسم و واکنش مورد تأیید مضاعف قرار گرفت. پس از دریافت نتایج **C_T** از هر

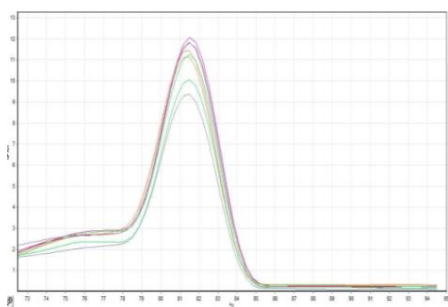
طراحی پرایمر و انجام **PCR**: ژن اختصاصی به نام *gtfb* مسئول متابولیسم گلوکز در سویه استاندارد **Streptococcus mutans ATCC 25175** از سایت **NCBI** انتخاب شد و ترادف آن استخراج شد و بوسیله نرم افزار **Allel ID 6**، یک جفت پرایمر و پروب طراحی گردید. ترادف پرایمرها به صورت زیر بود.

gtf-f 5'-CCCCATCGATAGACTGTTGTTTGGTTG-3'
gtf-r 5'-CCCCTCTAGACCATTAGGAACCTCCAA-3'
 5'-SAM-TACTGACTTGACTATTCTAGCATGC-TAMRA-3'

پس از کشت باکتری استاندارد در محیط بلاد آگار همراه در جار **CO₂** دار و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کلونی باکتری پس از ۴۸ ساعت پدیدار گردید. برای انجام کار، ژنوم باکتری استاندارد توسط تکنیک جوشاندن استخراج گردید.

برای تنظیم **PCR**، پرایمر سنتز شده را به صورت شیب حرارتی در یک واکنش **PCR** تنظیم نموده (**Gradient PCR**) و دمای **annealing** هریک از پرایمرها بدست آمد. این واکنش در دستگاه **PCR** مدل **Eppendorf** انجام گرفت. در انتها، دمای مشترک **annealing** را در یک واکنش **PCR** بدست آورده و میزان غلظت پرایمر و الگوی باکتری استاندارد تعیین گردید. پس از خاتمه، از محصولات واکنش **PCR Gradient** بر روی ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی DNA با اتیدیوم بروماید بررسی لازم انجام گرفت. برای تایید نهایی محصولات **PCR** تعیین توالی صورت گرفت.

استخراج **Total DNA** از بزاق: استخراج DNA باکتری **Streptococcus mutans ATCC 25175** با استفاده از کیت **DNeasy Blood & Tissue Kit** (Cat. No. 69504) و انجام پروتکل آن صورت گرفت. برای تعیین کیفیت DNA

تصویر ۲. منحنی ذوب مربوط به ژن *gtfB*

مقایسه میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس قبل و بعد از کارآزمایی در هر کدام از گروهها به روش آزمون تی زوجی (Paired sample T-Test) انجام گرفت (جدول ۱). میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس قبل و بعد از کارآزمایی در گروه مداخله اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$) به طوری که میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس قبل از کارآزمایی بیشتر بود. میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس قبل و بعد از کارآزمایی در گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$) که میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس قبل از کارآزمایی بیشتر بود.

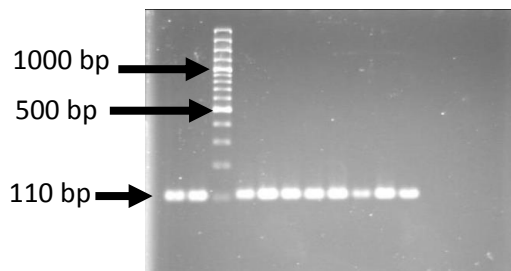
مقایسه میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس در گروه مداخله و شاهد قبل و بعد از کارآزمایی با استفاده از آزمون تی تست (Independent Sample T-Test) انجام گرفت (جدول ۱). میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس در گروه مداخله و شاهد قبل از کارآزمایی، اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس در گروه مداخله و شاهد بعد از کارآزمایی، اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). به طوری که کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس در گروه مداخله کمتر از شاهد بود. همچنین اختلاف تعداد

نمونه و مقایسه آن با C_T نمونه های استاندارد با غلظتهای مشخص، تعداد استرپتوکوک موتانس در هر نمونه (که بصورت triplex انجام شده) تعیین گردید.

در این مطالعه به منظور تحلیل داده‌ها از آزمونهای تی، من ویتنی و آزمون دقیق فیشر استفاده شد. محاسبات با نرم افزار SPSS Ver.21 انجام گرفت. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

تصویر ۱ و ۲، باند تکثیر یافته مربوط به ژن *gtfB* و منحنی ذوب مربوط به این ژن را نشان می دهد. تعداد شرکت کننده‌ها در هر گروه، ۱۰ نفر بود. با استفاده از آزمون دقیق فیشر جنس بین دو گروه مداخله و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=1$). در گروه مداخله، میانگین سن $26 \pm 1/8$ سال و در گروه شاهد، میانگین سن $25/13 \pm 2/13$ سال بود. با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف مقادیر سن در دو گروه مورد و شاهد توزیع نرمال نداشت ($P < 0.05$). آزمون من ویتنی اختلاف معنی‌داری بین سن در دو گروه نشان نمی داد ($P=0/19$). با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف مقادیر کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس در قبل و بعد مداخله در دو گروه مورد و شاهد توزیع نرمال داشت ($P > 0.05$). و آزمون تی اختلاف معنی‌داری بین مقادیر استرپتوکوک موتانس قبل از مداخله بین دو گروه نشان نمی داد ($P=0/5$)

تصویر ۱. باند تکثیر یافته مربوط به ژن *gtfB*

این متغیر در دو گروه مداخله و شاهد دیده شد و این تفاوت در گروه مداخله بیشتر بود $t=3.351$ $p=0.004$ (جدول ۱).

استرپتوکوک موتانس قبل و بعد از مداخله در گروه مداخله $4/3/72/44$ و در گروه شاهد $6/6/2693/32$ بود که از نظر آماری با آزمون تی تست تفاوت معنی داری در مورد

جدول ۱. مقایسه تعداد کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس دو گروه مداخله و شاهد قبل و بعد از کارآزمایی

زمان	مداخله	شاهد	نتیجه آزمون t مستقل
قبل از کارآزمایی	$64823/3 \pm 14496/4$	$69615/3 \pm 16655$	$t=0/786$ $p=0/501$
بعد از کارآزمایی	$20751 \pm 7553/72$	$36918/6 \pm 12370/5$	$t=3/527$ $p=0/002$
اختلاف	$44072/3 (8793/3)$	$32696/6 (6158/8)$	$t=3/351$ $p=0/004$
نتیجه آزمون t زوجی	$t=15/84$	$t=16/78$	$p<0/001$

بحث

با تغییر نگرش در درمانهای دندانپزشکی، بخش قابل توجهی از تحقیقات، معطوف به بررسی تاثیر مواد مختلف جهت پیشگیری از پوسیدگی دندان در مرحله اولیه گردیده است. از آنجا که استرپتوکوک موتانس، باکتری موثر بر آغاز روند دمنیزاسیون مینا و شروع روند پوسیدگی می باشد، لذا استفاده از راه حل مناسب، جهت کنترل یا حذف این باکتری می تواند باعث جلوگیری از ایجاد پوسیدگی شود.^(۶) از آنجا که مطالعات کلینیکی، به عنوان استاندارد طلایی تلقی می شوند، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آدامس کلپوره بر استرپتوکوک موتانس بزاق به صورت کلینیکی انجام گردید.

در این مطالعه با توجه به تاثیر پوسیدگی بر تعداد باکتریهای بزاق از جمله استرپتوکوک موتانس، کلیه نمونه ها از نظر پوسیدگی تحت معاینه کلینیکی قرار

گرفتند و افراد دارای پوسیدگی فعال از مطالعه حذف شدند. ضمناً با همسان سازی برنامه های بهداشتی، سعی گردید متغیرهای مداخله گر تا حد امکان حذف گردد که این شیوه آماده سازی نمونه ها، با مطالعات امامیه و همکاران^(۶) و نیز Caglar و همکاران^(۸) و مطابقت داشت. در این مطالعه، از افراد خواسته شد که به مدت سه هفته و هر روز سه بار بعد از هر وعده غذایی، آدامسها را به مدت ۲۰ دقیقه بچوند که مشابه مطالعات امامیه و همکاران^(۶) و نیز کرمی نوگورانی و همکاران^(۹) بود. بر طبق برخی از مطالعات^(۱۰،۱۱)، جویدن آدامس به مدت ۲۰ دقیقه، میزان ترشح بزاق را سه برابر افزایش می دهد. در این مطالعه، جهت تعیین میزان استرپتوکوک موتانس بزاق از روش qPCR استفاده شد که روش بسیار دقیقی می باشد. در صورتی که در تعدادی از مطالعات^(۶) از روش کشت میکروبی و شمارش با میکروسکوپ استفاده شد.

زنده و قابل کشت باشند در صورتی که DNA، PCR، میکروارگانیسرها را مشخص می کند و نیازی به زنده بودن آنها نیست. این تفاوت در نمونه‌هایی که قبل از شمارش، منجمد شده‌اند و به مدت طولانی نگهداری شده اند اهمیت دارد.^(۱۴)

تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثرات ضد میکروبی کلپوره به صورت آدامس انجام نشده است و مطالعه مشابهی موجود نمی‌باشد. بنابراین یافته‌های این مطالعه با یافته‌های مطالعاتی که اثر ضد میکروبی عصاره کلپوره را بر سایر میکروارگانیسرها بررسی نموده‌اند مقایسه می‌گردد.

یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که آدامس کلپوره در مقایسه با آدامس دارونما باعث کاهش میزان استرپتوکوک موتانس بزاق می‌شود. در مطالعه خرمیان طوسی و همکاران^(۱۵) نیز، کاهش میزان استرپتوکوک موتانس بزاق پس از مصرف دهانشویه کلپوره مشاهده گردید. تشخیص مکانیسم اثر آدامس کلپوره بر استرپتوکوک موتانس نیاز به مطالعات گسترده‌ای دارد. شاید بتوان علت کاهش استرپتوکوک موتانس را ترکیبات فنلی موجود در کلپوره دانست. Bravo^(۱۶) مشاهده نمود که باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در برابر ترکیبات فنولیک حساس هستند. ترکیبات فنلی در بسیاری از گیاهان وجود دارد و اثر ضد میکروبی آنها بستگی به محل و تعداد گروههای هیدروکسیل روی حلقه فنلی دارد و ادعا شده است که ارتباط مستقیمی بین تعداد گروههای هیدروکسیل و سمیت آنها روی میکروارگانیسرها موجود است. همچنین ادعا شده که اثر ضد میکروبی این ترکیبات، مهار آنزیمی از طریق واکنش با گروههای سولفیدریل یا واکنشهای غیراختصاصی با پروتئینهای میکروبی است. یکی از خواص مطلوب ترکیبات فنلی،

تکنیکهای مولکولی دارای این مزیت می‌باشند که میانگین قابل اعتمادتری از تعداد باکتریها را فراهم می کنند. روشهای کشت برای شمارش باکتریها دارای حساسیت کافی نیست، چون باکتریها تنها در شرایطی کشت می‌شوند که نیازهای فیزیولوژیکی و متابولیکی آنها در شرایط invitro کاملا تامین شده باشد. به عنوان مثال باکتری استرپتوکوکوس موتانس بر روی یکی از چندین محیط کشت انتخابی رشد می کند که ممکن است این محیط اثر بازدارندگی بر روی رشد باکتری داشته باشد. همچنین این تکنیک زمان‌بر است و ممکن است در مکانهایی که جامعه میکروبی متشکل از کمپلکس پیچیده‌ای از باکتریهاست (مانند زیستگاههای میکروبی در حفره دهانی) نتایج شمارش باکتریها با روشهای معمول کشت نتایج نادرستی را تولید نماید. شمارش سریع باکتریها با انواع روشهای مولکولی امکانپذیر است. اغلب روشها از چندین جفت پرایمر برای تشخیص باکتری مورد نظر استفاده می‌نمایند اما روش Real time با آزاد کردن رنگ فلورسانس در طول هر مرحله از تکثیر PCR، باعث شناسایی سریع و کمیت سنجی DNA بدون نیاز به انجام مراحل post-PCR مانند هیبریداسیون رادیواکتیو می‌شود^(۱۷) Chen و همکاران^(۱۸) ارتباط باکتری استرپتوکوک موتانس را با پوسیدگیهای دندانی توسط Real time PCR بررسی کردند و این تست را در مقایسه با روشهای معمول کشت باکتری روشی دقیقتر و حساستر دانستند. Yano و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ مزایای فراوانی برای روش real-time PCR نسبت به کشت میکروبی بیان کردند. آنها بیان نمودند این روش می‌تواند به راحتی میزان استرپتوکوک موتانس و سوپرینوس را به صورت جداگانه تعیین نماید. همچنین برای تعیین میزان میکروارگانیسرها محیط کشت، میکروارگانیسرها باید

یافت؛ گرچه این کاهش کمتر از گروه مورد بود. می توان علت کاهش در گروه شاهد را تاثیرات مکانیکال جویدن آدامس در کاهش پلاک میکروبی و افزایش ترشح بزاق و وجود زایلیتول دانست.

از محدودیتهای این مطالعه می توان به طعم نامطلوب آدامس کلپوره اشاره کرد که در مطالعه خرمیان طوسی و همکاران^(۲) نیز، این مشکل در خصوص طعم دهانشویه وجود داشت. با وجود کاربرد طعم دهنده ها جهت بهبود طعم تلخ عصاره کلپوره، طعم تلخ کاملاً برطرف نگردید که می تواند بر میزان مصرف آدامس توسط داوطلبان و عدم رعایت دستورالعمل مصرف آدامس اثر بگذارد. البته به دلیل همکاری دانشجویان دندانپزشکی در کاربرد منظم آدامس در این مطالعه، نتایج قابل اعتماد می باشد. از نقاط قوت این مطالعه می توان به کاربرد گیاه کلپوره در آدامس برای اولین بار و استفاده از تکنیک qPCR جهت شمارش استرپتوکوک موتانس اشاره نمود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره آبی گیاه کلپوره استفاده شده در آدامس، میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس را در بزاق انسان به طور قابل توجهی کاهش داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز جهت تامین هزینه های این طرح تقدیر و تشکر به عمل می آید. ضمناً این مقاله منتج از پایان نامه شماره ۱۱۵ است که در کتابخانه دانشکده دندانپزشکی البرز در دسترس می باشد.

تحریک ترشح بزاق می باشد که از این طریق نیز می تواند به کاهش پوسیدگی دندان کمک کند. یکی دیگر از ترکیبات ضد میکروبی موجود در کلپوره، تاننها می باشند. تاننها گروهی از ترکیبات فنلی هستند که اثر ضد میکروبی وسیعی دارند. اثر ضد میکروبی این ترکیبات را مربوط به مهار قدرت چسبندگی میکروبها و همچنین مهار فعالیت آنزیمی می دانند.^(۱۶)

Autore و همکارانش^(۱۷) با تجزیه عصاره متانولی گیاه کلپوره نشان دادند موادی به نام پولیوموزید، ورباسکوزید، توپولیوزید و یک گلیکوزید به نام فنیل پروپانویید در این گیاه وجود دارد که دارای خاصیت ضد باکتریایی بوده و بر باکتریهای شیگلا، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر مؤثر می باشند. در مطالعه حاضر از عصاره آبی گیاه کلپوره استفاده شد که دارای خاصیت ضد باکتریایی بود.

بر خلاف مطالعه حاضر، برخی مطالعات اثر ضد باکتریایی ضعیفی برای گیاه کلپوره گزارش کرده اند. در مطالعه مصدق و همکاران^(۱۵)، اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه کلپوره بر باکتریهای استافیلوکوک، میکروکوکوس لوتئوس و اشرشیاکلی ضعیف بود. همچنین Oganessian و همکاران^(۱۶) گزارش کردند که خاصیت ضد استافیلوکوکی گیاه کلپوره ضعیف می باشد. اختلاف در گزارشها احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع باکتری مورد مطالعه می باشد و جای آن دارد که در بررسیهای آتی، ماده یا مواد مؤثره گیاه بر هر باکتری شناسایی شود.

در مطالعه حاضر، میزان استرپتوکوک موتانس در گروه شاهد نیز پس از مصرف آدامس دارونما کاهش

منابع

1. Aburjai T, Hudaib M, Cavrini V. Composition of the essential oil from Jordanian germander (*Teucrium polium* L.). *J Essent Oil Res* 2006; 18(1):97-9.
2. KhoramianTusi S, Manzari Tavakoli Z, Bahram Abadi Nejhada R, Zeynali B. Evaluation of *teucrium polium* mouthwash effect on salivary streptococcus mutans count. *J Mashhad Dent Sch* 2015; 38(4):321-30. (Persian)
3. Vachirarojpisan T, Shinada K, Kawaguchi Y, Laungwechakan P, Somkote T, Detsomboonrat P. Early childhood caries in children aged 6-19 months. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004; 32(2):133-42.
4. Pourhashemi SJ, Mahmoodian J. Evolution of dental caries prevalence and prevention in Iran and other countries. *J Dent Med* 2008; 6(1):1-7.
5. Mahjoub S, Ghasempour, M, Mohammadi I. Salivary alkaline phosphatase activity and inorganic phosphorus concentration in children with different dental caries. *J Babol Univ Med Sci* 2006; 9(4):23-8. (Persian)
6. Emamieh S, Khaterizadeh Y, Goudarzi H, Ghasemi A, Baghban AA, Torabzadeh H. The effect of two types chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and xylitol on salivary streptococcus mutans. *J Conserv Dent* 2015; 18(3):192-5.
7. Vieira AR, Deeley KB, Callahan NF, Noel JB, Anjomshoaa I, Carricato WM, et al. Detection of *Streptococcus mutans* genomic DNA in human DNA samples extracted from saliva and blood. *ISRN Dent* 2011; 2011; 20(1):1-6.
8. Caglar E, Kavaloglu SC, Kusku OO, Sardalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig* 2007; 11(4):425-9.
9. Karami NM, Ghasemi SH, Ahadi A, Pursina F, Narimani T. Comparative study on the effects of four commercial chewing gums on pH, bacterial count and streptococcus mutans of saliva. *Majallah-I-Dandanpizishki* 2005; 17(2):40-7. (Persian)
10. Harris NO, Garcia-Godoy F, Nathe CN. Primary preventive dentistry. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall; 2004. P. 132-7.
11. Lijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res* 2004; 38(6):551-6.
12. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002; 148(Pt 1):257-66.
13. Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of streptococcus mutans in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 272(2):154-62.
14. Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 217(1):23-30.

15. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56(11):317-33.
16. Sharafatichaleshtori R, Sharafatichaleshtori F, Rafeiankoopae M, Daris F, Ashrafi K. Comparison of the antimicrobial effects ethanolic essence of leaf Iranian jipijapa chlorhexidine mouth washes in the *Streptococcus mutans* and *streptococcus sanguis*. *J Islamic Dent Assoc* 2010; 22(4):211-7. (Persian)
17. Autore G, Capasso F, De Fusco R, Fasulo MP, Lembo M, Mascolo N, et al. Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* (L.). *Pharmacol Res Commun* 1984; 16(1):21-9.
18. Mosadegh M, Dehmoubed SA, Nasiri P, Esmaeili S, Naghibi F. The study of phytochemical, antifungal and antibacterial effects of *Teucrium polium* and *Cichoriumintybus*. *J Kurdistan Univ Med Sci* 2002; 7(5):1-4. (Persian)
19. Oganesyanyan GB, Galstyan AM, Mnatsakanyan VA, Shashkov AS, Agababyan PV. Phenylpropanoid glycosides of *teucrium polium*. *Chem Nat Compd* 1991; 27(5):556-9.