بررسی قابلیت عصاره آبی زرشک در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم میکروبی توسط باکتری انتروکوکوس فکالیس در شرایط آزمایشگاهی

سیده ساره هندی [۱]، هانیه حقیقی [۲]، شهریار شهریاری [۳]*

[۱] استادیار، گروه اندودانتیکس، دانشکده ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۲] دندانپزشک عمومی، دانشکده ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۳] دانشیار، گروه اندودانتیکس، دانشکده ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۹/۱۱/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۹

Evaluation of the Ability of Barberry Liquid Extract to Prevent the Formation of Microbial Biofilm by Enterococcus Faecalis: An In Vitro Study

Seyedeh Sareh Hendi [1], Haniyeh Haghighi [2], Shahriar Shahriari [3]*

[1] Assistant Professor, Department of Endodontics, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

[2] General Dentist, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

[3] Associate Professor, Department of Endodontics, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 21 February 2021; Accepted: 31 August 2021

Introduction: Enterococcus faecalis (E. faecalis) is one of the microbes of the normal flora of the oral cavity, which is one of the common factors in the failure of root canal treatment. This in vitro study aimed to evaluate the ability of barberry extract to prevent the formation of microbial biofilm by E. faecalis.

Materials and Methods: Initially, E. faecalis was cultured simultaneously with barberry bark and root extract, and biofilm formation was evaluated after 48 h. In the second stage of the active culture of the bacteria (48 h), all root and bark concentrations had similar growth inhibition with the control group. The same results were observed after two weeks. Fluorescence staining with SYPRO® Ruby (Invitrogen, USA, 2010) was used to confirm the formation of biofilm. Subsequently, all samples were examined by fluorescence microscope, and the results were reported using Relative Fluorescence Unit.

Results: In the simultaneous cultivation of barberry and E. faecalis, root (30%), growth medium (50%), and bark (30%) had similar growth inhibition with the control group. After adding barberry bark and root extract (48 h), all concentrations of barberry bark and root showed similar growth inhibition with the control group. After two weeks of E. faecalis culture, the results were the same as those of the first group. However, wide and thick biofilms were formed in the samples without treatment and those treated with normal saline.

Conclusion: Due to the positive effects of barberry bark and root extract, it can be used to sterilize dental canals and can be considered a suitable alternative to hypochlorite.

Key words: Barberry, Biofilm, Enterococcus faecalis, Root canal therapy

Corresponding Author: Dr.ss.hendi@umsha.ac.ir , shahriar_shahriari@yahoo.com

J Mash Dent Sch 2021; 45(3): 289-98.

چکیده

مقدمه: باکتری انتروکوکوس فکالیس (ا.فکالیس) جزو میکروب های فلور نرمال حفره دهان است که یکی از عوامل رایج در عدم موفقیت در درمان کانال ریشه، مربوط به آن می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی قابلیت عصاره زرشک در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم میکروبی توسط باکتری ا.فکالیس در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها: در مرحله اول باکتری ا.فکالیس به همراه عصاره پوست و ریشه زرشک کشت داده شد و تشکیل بیوفیلم بعد از ۴۸ ساعت ارزیابی گردید. در مرحله دوم از کشت فعال باکتری در زمان های ۴۸ ساعت، کلیه غلظت های ریشه و پوسته، مهار رشدی مشابه با گروه کنترل داشتند. ۲ هفته پس از فعال سازی نیز نتایج مانند مرحله اول بود. برای تأیید تشکیل بیوفیلم از رنگ آمیزی فلورسانس با SYPRO® Ruby

---

* مولف مسؤول، نشانی: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دندانپزشکی، گروه اندودانتیکس، تلفن: ۰۸۱۳۸۳۸۱۰۵۹

E-mail: Dr.ss.hendi@umsha.ac.ir , shahriar_shahriari@yahoo.com

(Invitrogen, USA, 2010) استفاده شد و سپس کلیه نمونه ها توسط میکروسکوپ فلورسانس تحت بررسی قرار گرفتند و نتایج با واحد Relative fluorescence unit (RFU) گزارش گردید.

یافته ها: در کشت همزمان زرشک و ا.فکالیس محیط های کشت ۳۰ و ۵۰ درصد ریشه و محیط کشت ۳۰ درصد پوسته مهار رشدی مشابه با گروه کنترل داشتند. پس از اضافه نمودن عصاره پوسته و ریشه زرشک در زمان های ۴۸ ساعت، کلیه غلظت های ریشه و پوسته، مهار رشدی مشابه با گروه کنترل داشتند. در دو هفته پس از کشت ا.فکالیس نتایج مشابه گروه اول بود. در حالی که در نمونه درمان با نرمال سالین و نمونه بدون درمان شبکه ای گسترده و ضخیم از بیوفیلم ها تشکیل شده بود.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات مثبت عصاره ریشه و پوسته زرشک می توان از آن برای استریل کردن کانال های دندانی استفاده نمود و می تواند جایگزین مناسبی برای هیپوکلریت تلقی گردد.

کلمات کلیدی: زرشک، انتروکوک فکالیس، بیوفیلم، درمان ریشه

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۴۰۰ دوره ۴۵ / شماره ۳ : ۹۸-۲۸۹ .

مقدمه

عامل اصلی ایجاد بیماری‌های پالپ و پری رادیکولار، میکروارگانیسم‌ها مخصوصاً باکتری‌ها و محصولات جانبی آن‌ها می‌باشند.[۱و۲] درمان کانال ریشه اقدامی است که جهت کاهش حداکثری این عوامل پاتولوژیک از سیستم کانال ریشه انجام می‌شود.[۱] لذا هدف اصلی درمان ریشه پیشگیری از ایجاد یا از بین رفتن پریودنتیت اپیکال با تمرکز بر حذف کلنی های میکروبی از سیستم کانال ریشه و جلوگیری از ورود میکروارگانیسم های جدید می باشد. در واقع موفقیت درمان بسته به این است که دندانپزشک تا چه حد به این اهداف نزدیک شود.[۳و۴] البته برخی میکروارگانیسم ها نظیر باکتری های گرم مثبت و برخی قارچ ها ممکن است پس از آماده سازی شیمیایی- مکانیکی سیستم کانال ریشه هم زنده مانده و عفونت های داخل ریشه ای مقاوم ایجاد کنند.[۵] مانند ا.فکالیس که نقش اساسی در عفونت های ثانویه پس از درمان ریشه دارد.[۶و۷] گاهی تنها گونه باکتری در کانال ریشه ی دندان های دارای ضایعه پری رادیکولار پایدار، همین باکتری است زیرا می تواند به توبول های عاجی نفوذ کرده و برای مدت طولانی در کانال ریشه ی درمان شده زنده بماند و با شرایط مختلف غذایی سازگاری یابد.[۸و۹] ظرفیت این باکتری برای تشکیل بیوفیلم بر روی دیواره های کانال ریشه و به عنوان یک عفونت تک میکروبی در کانال‌های درمان ریشه شده، بدون حمایت هم‌افزایی از باکتری‌های دیگر، باعث می‌شود یک پاتوژن بسیار مقاوم در برابر درمان ریشه باشد.[۹]

بیوفیلم یک لایه چسبناک است که به طور طبیعی زمانی که باکتری ها به یک سطح جامد متصل می شوند، شکل می گیرد و شامل پلی ساکاریدهای خارج سلولی و دیگر مواد ارگانیک است که به عنوان سوخت برای سلول های غیرمتحرک عمل می کند. حذف بیوفیلم های باکتریایی مشکل است و مقاومت زیادی در برابر انواع مختلفی از ترکیبات ضدمیکروبی دارند.[۱۰]

پس برای دستیابی به این امر مهم، پاکسازی کامل مکانیکی و شیمیایی سیستم کانال ریشه ضروری می باشد.[۶] شستشودهنده هایی که در درمان کانال ریشه استفاده می شوند باید دارای فعالیت ضدمیکروبی وسیع و حداقل سمیت برای بافت های پری اپیکال سالم باشند.[۱۱] هیپوکلریت سدیم رایج ترین شستشودهنده کانال با گستره ای از غلظت های مختلف (۰/۵ تا ۶٪) است. این ماده یک عامل ضدمیکروبی قوی می باشد و به طور موثر دبری های آلی را حل می کند.[۱۲] اما نکته قابل توجه این است که اثر ضد باکتریایی آن ممکن است به وسیله عاج و

توده بیولوژیک از بین برود. همچنین شستشو با هیپوکلریت سدیم می تواند باند بین رزین و عاج را کاهش دهد[۱۳] و کشش سطحی بالای این ماده از تماس مستقیم آن با پیچیدگی های آناتومیک دیواره های عاجی جلوگیری می کند.[۱٤] از طرفی این ماده دارای اثرات سمی روی سلول ها به ویژه سلول های عصبی در صورت تماس با بافت می باشد.[۱۱]

طی سال ها به دلیل افزایش گونه های مقاوم به آنتی بیوتیک در اثر استفاده نامناسب از آنتی بیوتیک ها و اثرات شست و شو دهنده های مصنوعی، اخیرا تمایل به سمت جایگزین های گیاهی تغییر کرده است.[۱٦و۱٥] شست و شو دهنده های طبیعی بدون ضرر و غیرسمی هستند، سازگاری بیشتری با بدن انسان دارند، اثرات آنتی باکتریال خوبی را نشان داده اند و قیمت کمتری دارند.[۱٦]

"زرشک" نام فارسی Berberis vulgaris (B.vulgaris) است که به میزان وسیعی در ایران مخصوصا شهرهای بیرجند و قاین کشت می شود.[۱۷] بربرین یک آلکالوئید گیاهی بنزیل ایزوکواینولون چهارتایی و از ترکیبات زرشک می باشد.[۱٥] قسمت های مختلف این گیاه شامل میوه، برگ و ریشه در پزشکی سنتی به مدت طولانی استفاده شده اند.[۱۷] و اثرات فارماکولوژیک متنوعی مانند اثرات ضدسرطانی، ضد تب، ضد التهاب دارد و در درمان بسیاری از بیماری ها مثل دیابت و فشارخون مورد استفاده قرار گرفته است.[۲۰-۱۸] فعالیت ضدمیکروبی وسیع آن علیه باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها، پروتوزوآ و کلامدیا در مطالعات نشان داده شده است. ضمن اینکه اثر موتاژن و سمی قابل توجه بر سلول های انسانی ندارد.[۲۱]

با این حال مطالعه ای که اثر مستقیم بربرین ولگاریس را به صورت همزمان بر تشکیل و تجزیه بیوفیلم ا.فکالیس نشان بدهد، انجام نشده است. فرضیه این مطالعه اثر مهاری عصاره ی ریشه و پوست زرشک ۳۰ و ٥۰ درصد بر تشکیل و تجزیه بیوفیلم ا.فکالیس بود.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی به صورت in vitro و به منظور تعیین اثر عصاره آبی زرشک بر مهار بیوفیلم ا.فکالیس انجام شد. مطالعه در ٥ مرحله تهیه عصاره ی B.vulgaris، کشت ا.فکالیس، تشکیل و کشت بیوفیلم ا.فکالیس، درمان با عصاره های B.vulgaris و سدیم هیپوکلریت و رنگ آمیزی فلورسانس بیوفیلم، انجام گردید.

تهیه عصاره های Berberis vulgaris

جوانه های B.vulgaris (حدود ٤ هفته) از دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه و گونه آنها از نظر تاکسونومی توسط یکی از اساتید دانشکده تائید شدند. در مرحله بعد قسمت های ریشه و پوست آن به دقت جدا و در هاون خرد شد. سپس حدود ٦ گرم از هر قسمت با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه و به کمک همزن مغناطیسی به مدت ٦ ساعت مخلوط شد. در مرحله بعد در rpm ۹۰۰۰ و به مدت ٥ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ و محلول رویی در یک فالکون ٥۰ میلی لیتری ریخته شد و تا قبل از استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید.[۲۲]

کشت ا.فکالیس

کشت خالص ا.فکالیس (ATCC 47077) را به محیط کشت BHI انتقال داده و بعد از انکوبه گذاری بر روی محیط کشت بلادآگار به روش کشت خطی کشت داده شدند. بعد از ٢٤ ساعت، کلنی های رشد کرده به سرم فیزیولوژی استریل اضافه شدند تا کدورتی معادل با کدورت نیم مک فارلند تهیه گردید.

تشکیل و کشت بیوفیلم ا.فکالیس

مقداری از سوسپانسیون باکتری (۱۰۰µL) با دقت به چاهک های پلیت میکروتیتر انتقال داده شد. این مطالعه در سه مرحله انجام پذیرفت. مرحله اول: کشت ا.فکالیس و اضافه کردن همزمان عصاره پوست و ریشه و ارزیابی تشکیل بیوفیلم بعد از گذشت ٤٨ ساعت. مرحله دوم: کشت ا.فکالیس و اضافه کردن عصاره پوست و ریشه بعد از گذشت ٤٨ ساعت از رشد باکتری و ارزیابی تشکیل بیوفیلم. مرحله سوم: کشت ا.فکالیس و اضافه کردن عصاره پوست و ریشه بعد از گذشت دو هفته از رشد باکتری و ارزیابی تشکیل بیوفیلم. در تمامی مراحل از سدیم هیپوکلریت (NaOCl) نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای تأیید تشکیل بیوفیلم از رنگ آمیزی فلورسانس SYPRO® Ruby (Invitrogen, USA, 2010) استفاده شد.

تیمار با عصاره های B.vulgaris و سدیم هیپوکلریت

ا.فکالیس و عصاره پوست و ریشه کشت داده شد. در یک مطالعه ی آزمایشی اثر مهاری غلظت های ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۲۵٪، ۱۲/۵٪ و ٦٪ مورد بررسی قرار گرفت و از آن جا که بهترین نتیجه در غلظت بین ۲۵ تا ۵۰ درصد بدست آمد، از هر عصاره غلظت های مشخص ۳۰ و ۵۰ درصد (ترکیب عصاره و سرم فیزیولوژی) تهیه[۲۲] و از کشت در حضور سدیم هیپوکلریت به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بعد از ٤٨ ساعت انکوباسیون، بیوفیلم با SYPRO Ruby رنگ آمیزی شد و با میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. برای چاهک های حاوی بیوفیلم که به ترتیب ظرف ٤٨ ساعت و دو هفته تشکیل شده بودند، بیوفیلم تشکیل شده به مدت ۱۰ دقیقه در معرض غلظت های ذکر شده از عصاره ها قرار گرفتند.[۲۳] از چاهک هایی که جداگانه با سدیم هیپوکلریت درمان شدند، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نمونه کنترل منفی در تمامی این موارد عبارت بودند از چاهک های دارای باکتری که با نرمال سالین ۰/۹ درصد تیمار شده بودند. در مرحله بعد، محیط مصرف شده با دقت و به کمک میکروپیپت از هر چاهک خارج شد، و قبل از رنگ آمیزی بیوفیلم، با آب مقطر دیونیزه تحت شستشو قرار گرفتند.

رنگ آمیزی فلورسانس بیوفیلم

برای رنگ آمیزی فلورسانس بیوفیلم از SYPRO® Ruby استفاده شد. به این ترتیب که 10µl از محلول رنگ آمیزی با دقت به بیوفیلمی که قبلا شستشو داده شده بود، اضافه شد و برای اطمینان از اتصال رنگ، ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. در مرحله بعد به منظور حذف رنگ های اضافه زمینه، نمونه با آب مقطر دیونیزه شست و شو داده شد و سپس با میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت و شدت فلورسانس با استفاده از GIMP2.6 (15) اندازه گیری شد. واحد اندازه گیری شدت فلورسانس Relative fluorescence unit (RFU) بود.

در پایان داده ها بصورت مقادیر میانگین فلورسانس برای بیوفیلم گزارش شدند. برای بررسی معنادار بودن آنالیز بین گروه ها از آزمون کروسکال والیس (Kruskal–Wallis) و جهت مقایسه دو به دو گروهها از آزمون من ویتنی (Mann Whitney U) استفاده شد. برای تست های آماری، سطح معنادار بودن P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در گروه اول ا.فکالیس همراه با عصاره ریشه و پوسته زرشک با غلظت های ۳۰ و ۵۰ درصد به صورت همزمان وارد محیط کشت شد و پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه دوم کشت ا.فکالیس به مدت ٤٨ ساعت انجام شد و سپس عصاره زرشک با غلظت های ۳۰ و ۵۰ درصد به آن اضافه شد و در گروه سوم پس از

گذشت ۲ هفته از کشت ا.فکالیس و تشکیل بیوفیلم، عصاره زرشک با همان غلظت های ذکر شده به آن اضافه گردید.

نتایج مرحله اول نشان داد که اختلاف معنی داری بین ۵ نوع محیط کشت مورد بررسی وجود داشت (جدول ۱). مقایسه دو به دو گروه ها توسط آزمون من ویتنی نشان داد که محیط کشت با ۵۰ درصد پوسته زرشک بطور معنی داری کمترین مهار رشد را داشت، سایر محیط های کشت، میزان مهار رشد مشابه داشته و اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۲). به عبارتی محیط های کشت ۳۰ و ۵۰ درصد ریشه و محیط کشت ۳۰ درصد پوسته مهار رشدی مشابه با گروه کنترل هیپوکلریت سدیم NaOCl داشتند (شکل ۱).

جدول ۱ : مقایسه میزان RFU در گروههای مورد مطالعه

محیط کشت	تعداد	RFU			آزمون فریدمن
		مرحله اول	مرحله دوم	مرحله سوم	
محیط کشت با عصاره ی ۳۰٪ ریشه زرشک	۵	۲۳۳±۱۲	۲۵۰±۱۱	۴۰±۸	< ۰/۰۰۱
محیط کشت با عصاره ی ۵۰٪ ریشه زرشک	۵	۲۳۶±۲۱	۲۵۴±۲۴	۳۸±۱۱	< ۰/۰۰۱
محیط کشت با عصاره ی ۳۰٪ پوسته زرشک	۵	۲۴۳±۸	۲۴۹±۱۴	۴۳±۶	< ۰/۰۰۱
محیط کشت با عصاره ی ۵۰٪ پوسته زرشک	۵	۲۹۳±۲۲	۲۵۸±۲۸	۷۸±۱۶	< ۰/۰۰۱
محیط کشت با NaOCl	۵	۲۴۵±۱۳	۲۴۴±۲۳	۳۱±۱۰	< ۰/۰۰۱
آزمون کروسکال-والیس		۰/۰۲۸	۰/۱۶۹	۰/۰۳۷	< ۰/۰۰۱

مرحله اول (کشت همزمان) ، مرحله دوم (۴۸ ساعت پس از کشت) ، مرحله سوم (۲ هفته پس از کشت)

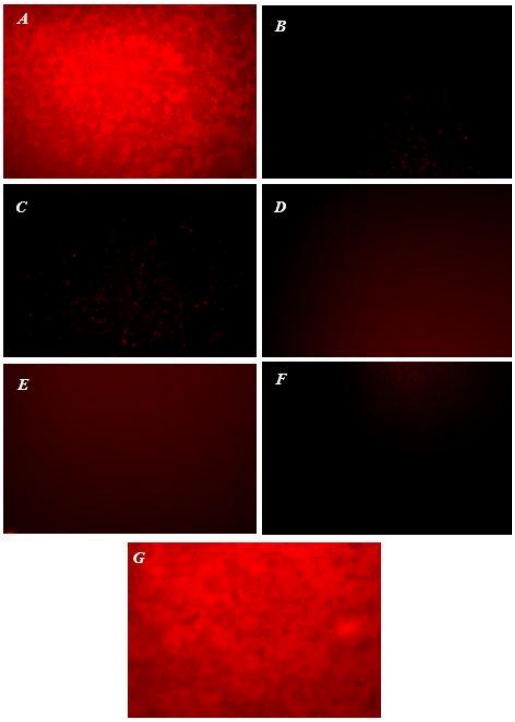
جدول ۲ : مقایسه دوبه دو گروه ها از نظر میزان RFU در سه مرحله

محیط کشت (i)	محیط کشت (j)	مرحله اول		مرحله دوم		مرحله سوم	
		اختلاف میانگین	P-value	اختلاف میانگین	P-value	اختلاف میانگین	P-value
۳۰٪ ریشه	۵۰٪ ریشه	۳	۰/۷۴۹	۴	۰/۸۰۵	۲	۰/۸۶۱
۳۰٪ ریشه	۳۰٪ پوسته	۱۰	۰/۵۲۱	۱	۰/۹۰۱	۳	۰/۸۲۲
۳۰٪ ریشه	۵۰٪ پوسته	۶۰	۰/۰۰۸	۸	۰/۷۰۱	۳۸	۰/۰۳۴
۳۰٪ ریشه	NaOCl	۱۲	۰/۵۰۱	۶	۰/۷۲۹	۹	۰/۴۳۳
۵۰٪ ریشه	۳۰٪ پوسته	۷	۰/۶۳۸	۵	۰/۷۷۸	۵	۰/۶۱۶
۵۰٪ ریشه	۵۰٪ پوسته	۵۷	۰/۰۱۲	۴	۰/۸۰۵	۴۰	۰/۰۲۵
۵۰٪ ریشه	NaOCl	۹	۰/۶۰۴	۱۰	۰/۶۰۷	۷	۰/۵۸۲
۳۰٪ پوسته	۵۰٪ پوسته	۵۰	۰/۰۳	۹	۰/۶۸۲	۳۵	۰/۰۳۹
۳۰٪ پوسته	NaOCl	۲	۰/۸۴۹	۵	۰/۷۷۲	۱۲	۰/۳۶۹
۵۰٪ پوسته	NaOCl	۴۸	۰/۰۳۹	۱۴	۰/۵۱۶	۴۷	۰/۰۱۸

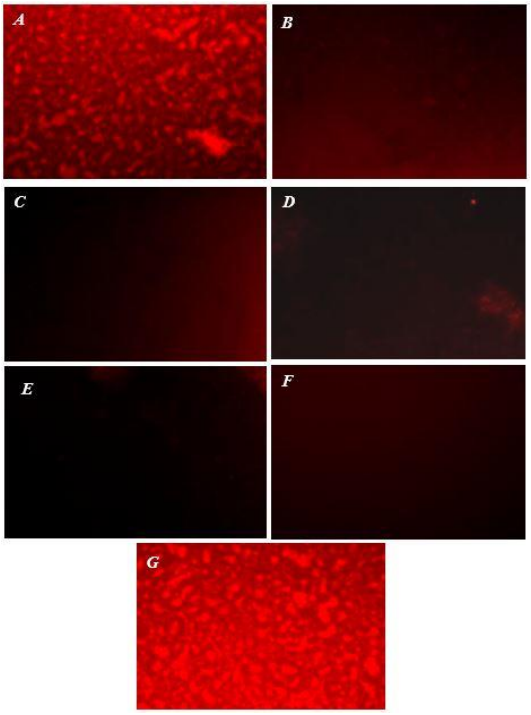
P-value: من ویتنی

نتایج مرحله دوم نشان داد که اختلاف معنی داری بین ۵ نوع محیط کشت مورد بررسی وجود نداشت (جدول ۱). مقایسه دو به دو گروه ها توسط آزمون من ویتنی نیز نشان داد که گروهها از نظر میزان مهار رشد مشابه بودند (جدول ۲). کلیه غلظت های ریشه و پوسته مهار رشدی مشابه با گروه کنترل NaOCl داشتند (شکل ۲).

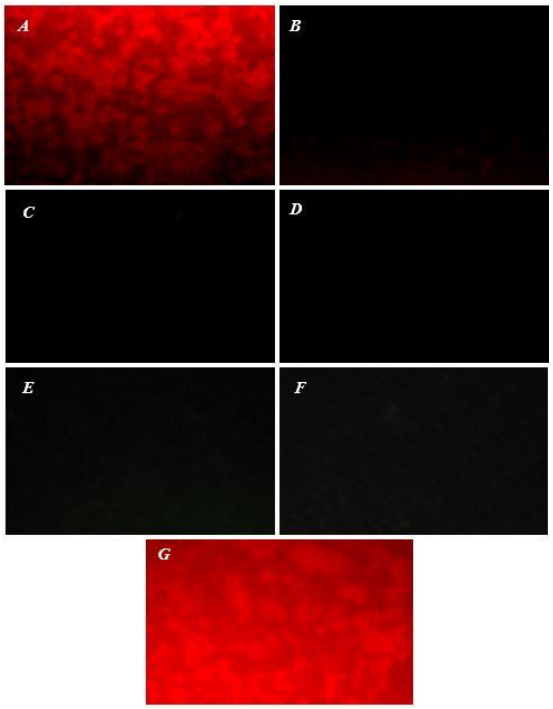
نتایج مرحله سوم نشان داد که اختلاف معنی داری بین ۵ نوع محیط کشت مورد بررسی وجود داشت (جدول ۱). مقایسه دو به دو گروهها توسط آزمون من ویتنی نشان داد که محیط کشت با ۵۰ درصد پوسته زرشک بطور معنی داری کمترین مهار رشد را داشت، سایر محیط های کشت، میزان مهار رشد مشابه داشته و اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۲). به عبارتی محیط های کشت ۳۰ و ۵۰ درصد ریشه و محیط کشت ۳۰ درصد پوسته مهار رشدی مشابه با گروه کنترل NaOCl داشتند (شکل ۳).



شکل ۱ : رنگ آمیزی SYPRO® Ruby بیوفیلم ها در کشت همزمان ا.فکالیس و عصاره زرشک به مدت ٤٨ ساعت :A بدون درمان، B: درمان با ۳۰٪ ریشه زرشک، C: درمان با ۵۰٪ ریشه زرشک، D: درمان با ۳۰٪ پوسته زرشک، E: درمان با ۵۰٪ پوسته زرشک، F: درمان با NaOCl، G: درمان با نرمال سالین



شکل ۲ : رنگ آمیزی SYPRO® Ruby بیوفیلمها در افزودن عصاره زرشک پس از گذشت ٤٨ ساعت از کشت ا.فکالیس ، A: بدون درمان ، B: درمان با ۳۰٪ ریشه زرشک ، C: درمان با ۵۰٪ ریشه زرشک ، D: درمان با ۳۰٪ پوسته زرشک ، E: درمان با ۵۰٪ پوسته زرشک ، F: درمان با NaOCl ، G: درمان با نرمال سالین



شکل ۳ : رنگ آمیزی SYPRO® Ruby بیوفیلم ها در افزودن عصاره زرشک پس از گذشت ۲ هفته از کشت ا.فکالیس، A: بدون درمان، B: درمان با ۳۰ درصد ریشه زرشک، C: درمان با ۵۰ درصد ریشه زرشک، D: درمان با ۳۰ درصد پوسته زرشک، E: درمان با ۵۰ درصد پوسته زرشک، F: درمان با NaOCl، G: درمان با نرمال سالین

بحث

حضور ا.فکالیس از مهمترین عوامل رایج در عدم موفقیت درمان کانال ریشه می باشد. این امر به دلیل ویژگی ذاتی آن در تشکیل اجتماعات بیوفیلم و همچنین استفاده طولانی مدت یا کوتاه مدت از داروهای آنتی بیوتیک است.[۶] بیوفیلم ها از طریق ممانعت از فاگوسیتوز، شناسایی آنتی بادی و تماس ترکیبات ضد باکتری، (در مقایسه با ارگانیسم های فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم) مانع از بین رفتن باکتری ها می شوند.[۸]

زرشک حاوی سیتریک اسید و مالئیک اسید است و به همین دلیل دارای اثرات ضدالتهابی است و در فرم ژل برای گلودرد مفید است. آبمیوه ی تازه ی آن به استحکام لثه ها کمک می کند و اگر همراه با مسواک زدن باشد در کاهش التهاب لثه موثر است. بربرین و ترکیبات مرتبط با آن مثل اکسی کانتین، آنتی باکتریال هستند. بربرین چسبیدن باکتری ها را به سلول های انسانی مهار کرده و از این طریق از عفونت جلوگیری می کند و بعضی سلول های ایمنی را تحریک می کند تا عملکرد بهتری داشته باشند[۱۳] و با کاهش اثر آبگریزی سطح سلول از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می کند.[۲۰] Sortaz A آنزیمی است که جهت بقای باکتری ا.فکالیس لازم می باشد و در بیوفیلم این باکتری به میزان بسیار بیشتری نسبت به فرم پلانکتونیک وجود دارد. از آن جا که اثر مهاری بربرین بر Sortaz A در استرپتوکوک اورئوس گزارش شده است، یک مکانیسم احتمالی اثر مهاری بربرین بر باکتری ا.فکالیس می تواند همین باشد.[۱۸]

B.vulgaris دارای پروتوبربرین و آلکالوئید های بیس بنزیل ایزوکوانولون (برامین، تتراندرین و کندوکورین) می باشد که اثرات ضد میکروبی، ضد تب، ضد فشار خون، ضد آریتمی، ضد کولینرژیک و آنتی اکسیدان آن ها گزارش شده است.[۲۴] این اثرات را از طریق فعالیت فارماکولوژیکی وسیعی که دارد شامل فعالیت آنتی اکسیدانی تا تنظیم نوروترنسمیترها، آنزیم ها، هدف های مولکولی و تنظیم ایمنی انجام می دهد.[۱۵] با توجه به اهمیت ضدعفونی کردن کانال ریشه، استفاده از شست و شو دهنده های غیرسمی و سازگارتر با بدن و خواص گزارش شده زرشک فعالیت ضدباکتریایی ریشه و پوست زرشک بر تشکیل و تجزیه بیوفیلم باکتری ا.فکالیس در این مطالعه ارزیابی گردید.

در مطالعه حاضر اثرات مفید زرشک مشاهده گردید. به این صورت که در کشت همزمان زرشک و ا.فکالیس، محیط های کشت ۳۰ و ۵۰ درصد ریشه و محیط کشت ۳۰

درصد پوسته مهار رشدی مشابه با گروه هیپوکلریت داشتند. در اضافه نمودن عصاره پوسته و ریشه زرشک پس از گذشت ٤٨ ساعت، کلیه غلظت های ریشه و پوسته مهار رشدی مشابه با گروه کنترل داشتند و ۲ هفته پس از کشت ا.فکالیس نیز نتایج مشابه گروه اول بود. در حالی که در نمونه درمان با نرمال سالین و نمونه بدون درمان شبکه ای گسترده و ضخیم از بیوفیلم ها تشکیل شده بود.

پس طبق نتایج این مطالعه، استفاده از عصاره پوسته و ریشه زرشک با غلظت های ۳۰ و ۵۰ درصد از رشد ا.فکالیس جلوگیری می نماید و حضور زرشک باعث می شود که بیوفیلمی تشکیل نشود. ضمن اینکه تفاوت چشمگیری بین اثرگذاری عصاره ریشه و پوسته زرشک وجود ندارد و هر دو به یک میزان بر روی عدم تشکیل و ازبین بردن بیوفیلم ها مؤثر می باشند.

در مطالعه Xie و همکاران[۲۰] اثرات آلکالوئید ضد میکروبی بربرین mg/ml ۲ به عنوان شستشودهنده ی حفره داخلی ریشه دندان در برابر بیوفیلم چندگونه ای فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، پروتلا اینترمدیا و انتروکوک فکالیس، همراه با برخی شست و شو دهنده های رایج مانند هیپوکلریت ۵/۲۵ درصد، کلرهگزیدین ۲ و ۱ درصد، نرمال سالین و ترکیب بربرین mg/ml ۲ و کلرهگزیدین ۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد تمام گروه ها از جمله بربرین به طور معنی داری در کاهش جمعیت میکروبی موثرتر از گروه کنترل (نرمال سالین) بودند. اما در مقایسه ی گروه ها باهم، گروه بربرین به تنهایی کمترین اثر را داشت. این تفاوت نتایج با مطالعه ی حاضر شاید به دلیل استفاده از بیوفیلم چندمیکروبی در این مطالعه باشد. ضمن اینکه روش کار در دو مطالعه متفاوت بود.

دنیوی و همکاران[۱۶] نیز مطالعه ای با عنوان و گروه های مشابه با مطالعه ی آقای Xie و همکاران[۲۰] انجام دادند. اما بیوفیلم متشکل از باکتری های استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و انتروکوک فکالیس بود. در این مطالعه تفاوتی بین گروه ها در میانگین کاهش تعداد باکتری ها دیده نشد و تمام گروه ها به طور معناداری بر بیوفیلم باکتری موثر بودند. در این مطالعه از بربرین با غلظت مشابه با مطالعه ی قبل استفاده شده بود، اما در گروه ترکیبی بربرین از کلرهگزیدین ۲٪ استفاده شد. لذا از مقایسه ی نتایج این دو مطالعه می توان نتیجه گرفت کلرهگزیدین ۱ درصد ترکیب موثرتری با بربرین می باشد.

در مطالعه ی Chen و همکاران[۱۸] بربرین هیدروکلراید به طور موثری از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کرد و تجزیه ی آن را از طریق مهار بیان Sortase A بهبود بخشید. Sortase یک آنزیم Membrane-anchored transpeptidase می باشد که در بیشتر باکتری های گرم مثبت یافت می شود و مسئول چسبندگی و ویرولانس باکتری می باشد. در این مطالعه که از غلظت های مختلف بربرین استفاده شد، بربرین هیدروکلراید تشکیل و تجزیه بیوفیلم را به صورت وابسته به دوز کاهش داد و با افزایش دوز اثر افزایش پیدا کرد.

اما در مطالعه ی دیگر Dziedzic و همکاران[۲۱] مهار رشد استرپتوکوک های دهانی را توسط بربرین کلراید نشان دادند. هم چنین بیان کردند فعالیت ضدباکتریایی بربرین می تواند با اثر هم افزایی آنتی بیوتیک های رایج بهبود یابد که می تواند یک روش درمانی جایگزین و یک ماده ی امیدوارکننده برای کنترل میکروبی برای افراد با نقص سیستم ایمنی و ریسک بالای عفونت های فرصت طلب یا پوسیدگی های دندانی باشد.

مطالعات متعددی جهت پیدا کردن ماده ای با پایه ی گیاهی با اثرات ضد میکروبی در ریشه دندان انجام شده است[۲۵]؛ از جمله Behravan و همکاران[۱۹] که از برگ و ریشه ی بربرین ولگاریس جهت بیوسنتز ذرات نانونقره

استفاده کردند و اثر ضد باکتریایی آن را بر باکتری های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی قرار دادند. زیرا نسبت به روش های شیمیایی سنتز نانوذرات، روشی ارزان تر، ایمن تر و غیر سمی و سازگار با محیط می باشد. ضمن اینکه مقاومت آنتی بیوتیکی در اثر استفاده نامناسب به یکی از نگرانی های مهم سلامت عمومی تبدیل شده است و نیاز به روش های موثر دیگر جهت کنترل عفونت احساس می شود. نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات تهیه شده با این روش فعالیت ضدباکتریایی بالایی دارند.

هم چنین شریفیان و همکاران[۲۶] نیز نشان دادند که توانایی امولسیون کارواکرول ۰/٦ درصد در حذف باکتری ا.فکالیس با هیپوکلریت ۵/۲۵ درصد تفاوتی ندارد و حتی MTAD اثر کمتری از کارواکرول داشت.

در مطالعه حاضر نیز اثرات مفید سدیم هیپوکلریت اثبات گردید و مشاهده شد که این ترکیب هم از تشکیل بیوفیلم ها جلوگیری می کند و هم می تواند بیوفیلم های تشکیل شده را تجزیه کند ولی با توجه به عوارضی مانند سمیت بافتی، مزه ی بد، عدم توانایی در حذف لایه ی اسمیر، نیاز به درمان جایگزین سدیم هیپوکلریت احساس می شود.

از آن جایی که در این مطالعه سمیت عصاره ریشه و پوست زرشک بر هیچ رده ی سلولی بررسی نشده است، بهتر است از غلظت ۳۰ درصد بجای ۵۰ درصد استفاده گردد. ضمنا این توصیه تنها بر اساس نتایج بدست آمده است و حتما قبل از استفاده در کلینیک نیاز به بررسی سمیت سلولی در مطالعات دیگر می باشد.

با توجه به اینکه زرشک بر ممانعت از تشکیل بیوفیلم ا.فکالیس نیز موثر بود، می توان در مطالعات بعدی، استفاده از آن در جلسات بین درمان را نیز مورد بررسی قرار داد. مدت زمان اثرگذاری عصاره زرشک و باقی ماندن آن در جلسات بین درمان و همچنین تاثیر آن به عنوان شست و شو دهنده ی نهایی نیز بایستی مورد ارزیابی قرار گیرد، با این هدف که در صورتی که پس از اتمام درمان ریشه هنوز باکتری در داخل کانال باقی مانده است، از تکثیر آن جلوگیری کند.

نتیجه گیری و پیشنهادات

با توجه به اثرات عصاره ریشه و پوسته زرشک در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم ها و همچنین از بین بردن و محو کردن بیوفیلم های تشکیل شده می توان از آن برای استریل کردن کانال های دندانی استفاده نمود و با در نظر گرفتن این مطلب که اثرات ایجاد شده توسط عصاره ریشه و پوسته زرشک بسیار همانند سدیم هیپوکلریت می باشد می تواند جایگزین مناسبی برای آن تلقی گردد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی همدان بابت تقبل هزینه این مطالعه تشکر می نماییم. مقاله، حاصل پایان نامه با شماره ۹۳۱۰۱٦۵۱۷٦ می باشد.

منابع

1. de Miranda RG, Colombo APV. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. Clin Oral Investig 2018; 22(4):1751-61.
2. Chugal N, Mallya SM, Kahler B, Lin LM. Endodontic treatment outcomes. Dent Clin North Am 2017; 61(1):59-80.
3. Naghavi N, Rouhani A, Irani S, Naghavi N, Banihashemi E. Diode laser and calcium hydroxide for elimination of enterococcus faecalis in root canal. J Dent Mater Techniq 2014; 3(2):55-60.
4. Schoop U, Barylyak A, Goharkhay K, Beer F, Wernisch J, Georgopoulos A, et al. The impact of an erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet laser with radial-firing tips on endodontic treatment. Lasers Med Sci 2009; 24(1):59-65.

5. Dumani A, Guvenmez HK, Yilmaz S, Yoldas O, Kurklu ZG. Antibacterial efficacy of calcium hypochlorite with vibringe sonic irrigation system on enterococcus faecalis: an in vitro study. Biomed Res Int 2016; 2016:8076131.

6. Franzen R, Esteves-Oliveira M, Meister J, Wallerang A, Vanweersch L, Lampert F, et al. Decontamination of deep dentin by means of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation. Lasers Med Sci 2009; 24(1):59-65.

7. Khorasani MY, Dehnavi E. An antimicrobial effects of matrica and chlorehexidine mouthwashes compared with sodium hypochlorite on enterococcus faecalis and candida albicans: an in vitro study. J Mashhad Dent Sch 2016; 40(2):177-86.

8. Armand A, Khani M, Asnaashari M, AliAhmadi A, Shokri B. Comparison study of root canal disinfection by cold plasma jet and photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther 2019; 26:327-33.

9. 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):e7257.

10. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. Lasers Surg Med 2007; 39(1):59-66.

11. Nagayoshi M, Nishihara T, Nakashima K, Iwaki S, Chen KK, Terashita M, et al. Bactericidal effects of diode laser irradiation on Enterococcus faecalis using periapical lesion defect model. ISRN Dent 2011; 2011:870364.

12. Mathew J, Emil J, Paulaian B, John B, Raja J, Mathew J. Viability and antibacterial efficacy of four root canal disinfection techniques evaluated using confocal laser scanning microscopy. J Conserv Dent 2014; 17(5):444-8.

13. González-Luna IVP, Martínez-Castañón GA, Zavala-Alonso NV, Patiño-Marin N, Niño-Martínez N, Morán-Martínez J, et al. Bactericide effect of silver nanoparticles as a final irrigation agent in endodontics on Enterococcus faecalis: an ex vivo study. J Nanomaterials 2016; 2016:7597295.

14. Bago I, Plečko V, Gabrić Pandurić D, Schauperl Z, Baraba A, Anić I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. Int Endod J 2013; 46(4):339-47.

15. Kumar A, Chopra K, Mukherjee M, Pottabathini R, Dhull DK. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: an update. Eur J Pharmacol 2015; 761:288-97.

16. Donyavi Z, Arabestani RA, Dastan D, Esmaeilzadeh M, Shahsvand N. Comparison of antimicrobial effect of berberin as an endodontic irrigant with that of other common root canal irrigants on three microorganisms involved in persistent endodontic infections. J Mol Biol Res 2018; 8(1):153-8.

17. Tabeshpour J, Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. A review of the effects of Berberis vulgaris and its major component, berberine, in metabolic syndrome. Iran J Basic Med Sci 2017; 20(5):557-68.

18. Chen L, Bu Q, Xu H, Liu Y, She P, Tan R, et al. The effect of berberine hydrochloride on Enterococcus faecalis biofilm formation and dispersion in vitro. Microbiol Res 2016; 186-187:44-51.

19. Berhravan M, Panahi AH, Naghizadeh A, Ziaee M, Magdavi R, Mirzapour A. Facile green synthesis of silver nanoparticles using Berberis vulgaris leaf and root aqueus extract and its antibacterial activity. Int J Biol Macromol 2019; 124:148-54.

20. Xie Q, Johnson BR, Wenckus CS, Fayad MI, Wu CD. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. J Endod 2012; 38(8):1114-7.

21. Dziedzic A, Wojtyczka RD, Kubina R. Inhibition of oral streptococci growth induced by the complementary action of berberine chloride and antibacterial compounds. Molecules 2015; 20(8):13705-24.

22. Rezaei A, Oyong G, Borja V, Inoue M, Abe T, Tamamura R, et al. Molecular screening of anti-quorum sensing capability of salvadora persica on enterococcus faecalis. J Hard Tissue Biol 2011; 20(2):115-24.

23. Franzen R, Esteves-Oliveira M, Meister J, Wallerang A, Vanweersch L, Lampert F, et al. Decontamination of deep dentin by means of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation. Lasers Med Sci 2009; 24(1):75-80

24. Abd El-Wahab AE, Ghareeb DA, Sarhan EE, Abu-Serie MM, El Demellawy MA. In vitro biological assessment of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. BMC Complement Altern Med 2013; 13:218.

25. Arayne MS, Sultana N, Bahadur SS. The berberis story: Berberis vulgaris in therapeutics. Pak J Pharm Sci 2007; 20(1):83-92.

26. Sharifian M, Bolhari B, Nosrat A, Aligholi M. The effect of carvacrol on Enterococcus faecalis as an intracanal medicament-Invitro study. J Dent Med 2009; 1(22):35-40.