



مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره اسفند با هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ بر روی بیوفیلم انتروکوک فکالیس

مهدی تبری زی زاده^۱، هنگامه زندی^۲، محمدحسین مصدق مهرجردی^۳، حسین محمودی زاده^{۴*}

- ۱- دانشیار گروه اندودانتیکس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
- ۲- استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
- ۳- دانشیار گروه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
- ۴- دانشجوی دکتری تخصصی اندودانتیکس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۴

چکیده

مقدمه: با توجه به اهمیت کلینیکی بیوفیلم‌های میکروبی در ایجاد عفونت اندودانتیک و نقش شوینده‌ها در تخریب آنها هدف از انجام این مطالعه مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره اسفند با هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ در از بین بردن بیوفیلم انتروکوک فکالیس موجود در کانال ریشه دندان است.

روش بررسی: جهت انجام این مطالعه آزمایشگاهی تعداد ۴۵ عدد دندان کشیده شده با فایل دستی شکل‌دهی شده و پس از اتوکلاو کردن، بیوفیلم انتروکوک فکالیس در کانال ریشه‌ها کشت داده شد. دندان‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه با نرمال سالین، گروه دوم با هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ و گروه سوم با عصاره اسفند و جمعاً هر کانال با ۱۵ سی‌سی محلول شوینده در عرض ۱۵ دقیقه شسته شدند. پس از آن براده عاجی به دست آمده از تراش داخل کانال جمع‌آوری شده و در نرمال سالین جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی حل گردید. در نهایت کشت حاصل از محلول میکروبی جهت شمارش CFU بررسی گردید. داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون‌های آماری کروسکال-والیس و من-ویتنی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج: کاهش معنی‌داری در تعداد CFU در گروه‌های هیپوکلریت سدیم و عصاره اسفند در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p < 0.05$). اختلاف معنی‌دار آماری بین گروه‌های هیپوکلریت سدیم و عصاره اسفند ملاحظه نشد ($p > 0.05$). نتیجه‌گیری: هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ و عصاره اسفند دارای قدرت ضد میکروبی همسانی بر روی بیوفیلم انتروکوک فکالیس می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: ضد میکروبی، هیپوکلریت سدیم، عصاره اسفند، انتروکوک فکالیس

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۸۶۶۷۸-۰، پست الکترونیکی: hmahmodi32@yahoo.com

- این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

مقدمه

نقش میکروارگانسیم‌ها و محصولات ویرانگر آنها، به عنوان عامل اصلی بیماری‌های پالپ و پری‌آپیکال شناخته شده است (۱،۲). مهمترین هدف درمان ریشه دندان، حذف این میکروارگانسیم‌ها از فضای کانال ریشه است و جهت دستیابی به این امر پاکسازی کامل مکانیکی و شیمیایی کانال ضروری به نظر می‌رسد (۱،۲).

انتروکوک فکالینس شایع‌ترین و گاهی اوقات تنها باکتری جدا شده از داخل کانال‌های با پری‌دونتیت پری آپیکال مقاوم می‌باشد. مقاومت ذاتی به ضد میکروب‌ها، قدرت تطابق به محیط‌های خشن و قدرت تشکیل بیوفیلم بر دیواره کانال ریشه این میکروب را مسئول خیلی از شکست‌های درمان ریشه ساخته است (۳).

بیوفیلم یک ساختمان شدیداً ارگانیزه خود ساخته توسط باکتری‌ها است که شامل باکتری‌های محصور شده در ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. این ماتریکس به عنوان محافظ در برابر نفوذ مواد شوینده به باکتری‌ها عمل می‌کند و اثرشان را فقط به لایه‌های سطحی محدود می‌کنند (۳،۴).

انواع مختلفی از مواد شوینده در درمان ریشه استفاده می‌شود که یکی از مهمترین خصوصیات آنها داشتن قدرت ضد میکروبی است. خاصیت ضد میکروبی بیشتر این مواد بر روی باکتری‌ها در حالت پلانکتونیک آزمایش شده است، در حالی که باکتری‌ها در حالت بیوفیلم تا هزار مرتبه مقاوم‌تر از حالت پلانکتونیک آنها می‌باشند. به همین علت مطالعات اخیر سعی دارند که خاصیت ضد میکروبی مواد شوینده را بر روی بیوفیلم بررسی کنند (۳،۵،۶).

امروزه مواد مختلفی از قبیل هیپوکلریت سدیم، کلرهگزیدین، نرمال سالین جهت شستشوی کانال مورد استفاده قرار می‌گیرند که هیپوکلریت سدیم یکی از رایج‌ترین آنها می‌باشد. در پژوهش‌های گوناگون اثرات ضد میکروبی این محلول در غلظت‌های متفاوت به اثبات رسیده است. هیپوکلریت سدیم علاوه بر خاصیت ضد میکروبی در حالت پلانکتونیک، خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌ها در بیوفیلم را

نیز از خود نشان داده است (۷،۸). این محلول سمیت شدیدی دارد و چنانچه به صورت اتفاقی از آپکس به ناحیه پری‌آپیکال وارد شود، درد و ناراحتی زیادی برای مریض ایجاد می‌کند. بنابراین جستجو برای یافتن موادی با بیشترین اثر و کمترین ضرر همواره ادامه دارد. در این بین استفاده از گیاهان دارویی در درمان ریشه در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۹،۱۰).

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان بوده است. محصولات طبیعی یا گیاهی از هزاران سال پیش به علت خاصیت ضد میکروبی، ضد درد، ضد سرطان، آنتی‌اکسیدان، سازگاری محیطی و ضد التهابی مورد استفاده بوده‌اند (۱۱-۱۳) و در دندانپزشکی نیز برای مواردی از قبیل درمان آفت، التهاب لثه و ... کاربرد داشته‌اند. در رشته اندودنتیک نیز گیاهان دارویی جهت ضد عفونی کردن کانال و برداشتن لایه اسمیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۴، ۱۰).

در زمینه خواص ضد میکروبی گیاه اسفند از قدیم مطالعات مختلفی انجام شده است ولی در دندانپزشکی مطالعات چندانی در دسترس نمی‌باشد و این مطالعات بیشتر در کشورهای عربی انجام گرفته است که استفاده از اسفند رایج است. Nenaah اثر ضد میکروبی اسفند بر روی *Bacillus subtilis* و *Candida albicans* را نشان داد (۱۵). در مطالعه Cowan اثر مناسب عصاره اسفند بر روی لاکتوباسیل (۱۶) و در مطالعه Al-Mizrakchi اثر آن بر روی استرپتوکوک میوتانس نشان داده شد (۱۷).

از آنجایی که عصاره گیاه اسفند اثر ضد میکروبی قوی بر روی باکتری انتروکوک فکالینس در حالت پلانکتونیک دارد (۱۷-۱۱، ۱۵). هدف از این مطالعه بررسی اثر آن بر روی بیوفیلم این میکروب است.

روش بررسی

جهت انجام این مطالعه آزمایشگاهی تعداد ۴۹ عدد دندان کشیده شده تک ریشه و تک کاناله با آپکس بسته و ریشه مستقیم انتخاب گردید (۱۸). تاج تمام دندان‌ها توسط دیسک

الماسی بریده شد، طوری که ریشه باقیمانده ۱۲ میلی متر طول داشت. با استفاده از فایل 15k (Mani-Japan) طول کارکرد تعیین شد. آماده سازی ناحیه کروئال با فرزهای گیتس گلیدن شماره های ۱،۲،۳،۴ (Mani-Japan) و با استفاده از روش کروئال داون صورت گرفت. آماده سازی ناحیه آپیکال توسط k-file تا شماره ۶۰ و به روش Step-back کامل گردید (۱۸). از ۵ میلی لیتر محلول نرمال سالین (ثامن-ایران) جهت شستشو بعد از هر فایل استفاده شد. پس از پایان آماده سازی کانال ها جهت حذف لایه اسمیر از ۳ میلی لیتر محلول ۵/۲۵٪ هیپوکلریت سدیم (شمین-ایران) به مدت ۳ دقیقه و بعد از آن از ۳ میلی لیتر محلول ۰.۱٪ EDTA (Ident-Lithuania) به مدت ۳ دقیقه استفاده شد (۱۸). دو عدد از دندان ها جهت بررسی باز بودن توبول های عاجی به طور طولی برش داده شدند و با میکروسکوپ الکترونی (VEGA3-SEM TESCAN-Czech Repuplic) بررسی شدند.

جهت تهیه یک سوسپانسیون استاندارد در وهله اول کشت خالصی از میکروارگانیسم با انکوبه کردن میکروب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت در حضور ۱۰٪ دی اکسیدکربن در محیط BHI (Merk-Germany) تهیه گردید. باکتری های کشت شده جوان به محلول BHI منتقل شده و غلظت میکروبی به محلول استاندارد ۰/۵ Mc Farland (۱۰^۸ cell/mm) با کمک اسپکتروفوتو متر ماوراء بنفش رسانده شد.

جهت تشکیل بیوفیلم انتروکوک فکالیس، ریشه های آماده سازی شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ psi جهت حذف تمام میکروارگانیسم های موجود اتوکلاو شدند. جهت اطمینان از استریل بودن، ریشه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در BHI کشت داده شدند. در مرحله بعدی هر کدام از ریشه ها به یک میکروتیوب حاوی ۲ میلی لیتر سوسپانسیون استاندارد انتروکوک فکالیس منتقل شدند. محیط کشت یک روز در میان جهت تأمین تغذیه تجدید می شد. این عمل به مدت ۶ هفته ادامه داشت. در طی این مدت دندان ها در دمای ۳۷ درجه

سانتی گراد انکوبه بودند. بعد از ۶ هفته جهت اطمینان از وجود بیوفیلم بر دیواره کانال ریشه دو عدد از ریشه ها توسط میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند (۱۸).

جهت برای تهیه عصاره اسفند ۱۰ گرم دانه اسفند توسط آسیاب برقی پودر گردید و در ۱۰۰ سی سی آب و اتانول خالص (۵۰/۵۰) حل شده و محلول در ارلن ۲۵۰ سی سی ریخته شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه همزن قرار گرفت. پس از این مدت با استفاده از پمپ خلا و صافی واتمن محلول صاف گردید. نهایتاً با تبخیر الکل محلول آبی به دست آمد. با اضافه کردن آب مقطر غلظت محلول به ۱۰٪ رسانده شد.

نمونه های آماده سازی شده به صورت تصادفی به ۳ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل: کانال ریشه ها با ۵ سی سی نرمال سالین به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. این عمل ۳ بار تکرار شد، بدین ترتیب در نهایت هر کانال با ۱۵ سی سی محلول در مدت ۱۵ دقیقه شسته شد.

۲- گروه هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪: همانند گروه ۱ ولی توسط هیپوکلریت سدیم انجام شد.

۳- گروه عصاره اسفند ۱۰٪: شستشو همانند گروه های قبلی ولی از عصاره اسفند جهت شستشوی کانال ها استفاده شد.

برای بررسی میزان قدرت ضد میکروبی مواد از براده عاجی تراشیده شده از دیواره های کانال توسط گیتس های شماره ۵ و ۶ استفاده شد. از هر کانال جمعاً ۱۰ میلی گرم براده عاجی تهیه شد و در میکروتیوب های از قبل وزن شده جمع آوری گردید. نمونه ها به تیوب های حاوی ۲ سی سی نرمال سالین استریل منتقل شد و به هم زده شدند. در مرحله بعد از هر یک از لوله ها رقت های متوالی تا ۱۰-۷ تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از هر رقت به محیط کشت مولر-هینتون (Merk-Germany) تلقیح گردید و به صورت چمنی کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس تعداد کولنی ها در هر پلیت شمارش شد و CFU تعیین شد. داده های به دست آمده با استفاده از آزمون های آماری کروسکال-والیس و من-ویتنی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

این مطالعه با هدف مقایسه اثر عصاره اسفند ۱۰٪ با هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ بر روی بیوفیلیم انتروکوک فکالایس انجام گرفت. تعداد کلونی تشکیل شده در محیط کشت بعد از اعمال مواد شوینده کانالی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: تعداد CFU در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	تعداد نمونه	استاندارد \pm میانگین
نرمال سالین	۱۵	$198 \pm 113/61$
هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪	۱۵	۰
عصاره اسفند ۱۰٪	۱۵	$2/53 \pm 5/54$

آزمون کروسکال-والیس اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد ($p < 0/001$).

آزمون من-ویتنی اختلاف معنی‌داری بین گروه نرمال سالین با گروه‌های هیپوکلریت سدیم و عصاره اسفند نشان داد ($p < 0/001$). ولی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های هیپوکلریت سدیم و عصاره اسفند مشاهده نشد ($p = 0/126$).

بحث

باکتری‌ها و محصولات آنها عامل اصلی بیماری‌های پالپ و پری رادیکلر بوده و حذف آنها نقش مهمی در موفقیت معالجه ریشه دارد (۵). انتروکوک فکالایس یک باکتری بی‌هوازی اختیاری گرم مثبت که معمولاً در ریشه‌های درمان شده با ضایعه اپیکالی دیده می‌شود. این باکتری در برابر آماده‌سازی کانال به روش مکانیکی و شیمیایی مقاومت می‌کند و قسمت اعظم این مقاومت به خاطر تشکیل بیوفیلیم است. در نتیجه مطالعات آزمایشگاهی اخیر تأثیر مواد شوینده کانالی را بر روی این میکروب بررسی می‌کنند (۵،۶). در این مطالعه مانند دیگر مطالعات مشابه از انتروکوک فکالایس برای تهیه بیوفیلیم استفاده شد.

تاکنون روش‌های متعددی جهت مقایسه قدرت ضد میکروبی مواد شوینده کانال ابداع شده‌اند (۳)، ولی روش *In vivo* قطعی‌ترین و مطمئن‌ترین نتایج به همراه دارد. هر چند این مطالعات محدودیت‌های اخلاقی داشته و جهت هماهنگی بین

عوامل متعدد دخیل، نیاز به جمعیت وسیعی از نمونه‌ها می‌باشد که از نظر مالی و زمانی مقرون به صرفه نیست (۳،۴). در این حالت مطالعات *In vitro* جایگاه ارزشمندی دارند. هر چه شرایط محیط آزمایشگاهی با شرایط کلینیکی موجود در ریشه نزدیک‌تر باشد، می‌توان با شدت بیشتری به آنها اعتماد کرد (۴). لذا جهت مطابقت محیط *In vitro* و *In vivo* در مطالعات باید موارد متعددی از جمله نوع میکروب، حالت کشت میکروبی، محیط کشت، مدت زمان کشت، روش‌های نمونه‌گیری را مدنظر قرار داد.

روش‌های متعددی جهت مقایسه اثر ضد میکروبی مواد شوینده بر باکتری‌ها در حالت پلانکتونیک و بیوفیلیم در *In vitro* ابداع شدند. معمولاً در بیشتر این مطالعات در نهایت تعداد کلونی‌های میکروبی (CFU) تعیین می‌گردد. CFU یک استاندارد طلایی جهت تعیین تعداد باکتری‌های زنده بعد از اعمال شوینده‌ها محسوب می‌شود. دو روش که در حالت پلانکتونیک استفاده می‌شوند، شامل تماس مستقیم مواد ضد میکروبی با باکتری‌ها در لوله آزمایش و انتشار در محیط آگار می‌باشند. در روش لوله آزمایش CFU محاسبه می‌شود و در انتشار در محیط آگار هاله عدم رشد میکروبی اندازه‌گیری می‌گردد (۴). در بیشتر مطالعات انجام شده برای بررسی اثر ضد میکروبی مواد شوینده کانال مانند مطالعه Jayahari و همکاران از حالت پلانکتونیک میکروب در کشت آگار استفاده شده است (۱۹) در صورتی که مقاومت بیوفیلیم بسیار بیشتر از حالت پلانکتونیک میکروبی آن می‌باشد (۳). در بعضی از مطالعات *In vitro* که جنبه بیوفیلیمی باکتری را در نظر می‌گیرند جهت کشت میکروبی و القای تشکیل بیوفیلیم از بلوک‌های کامپوزیتی (در مطالعه Oliveira و همکاران (۲۰) از پلاک آکریلی و در مطالعه Gupta و همکاران (۲۱) از بیوفیلیم بر روی غشاء نیترات سلولزی) سرامیکی و کشت میکروبی داخل دندان کشیده شده استفاده شده است (۲۶-۲۲). با وجودی که بیوفیلیم بر روی بلوک‌های کامپوزیتی و سرامیکی تشکیل می‌شود ولی این مواد حالت واقعی کانال ریشه را نشان نمی‌دهند و فاقد توبول‌های عاجی و مسیره‌های پیچیده موجود

در کانال ریشه هستند (۴).

تشکیل و رشد بیوفیلم به نوع سوبسترای محیط بستگی دارد. کلاژن نوع یک موجود در دندان بستر بسیار مهمی جهت اتصال و رشد بیوفیلم انتروکوک فکالیس و گسترش آن به داخل توبول‌های عاجی می‌باشد. مطمئناً بیوفیلم تشکیل شده بر روی مواد مصنوعی با نوع دندانی آن فرق دارد. علاوه بر توبول‌های عاجی موجود در عاج طبیعی دندان که محل امنی برای میکروبه‌هاست، خود ساختمان عاج اثر تضعیف‌کنندگی بر بعضی از محلول‌های شوینده کانال دارد. در مطالعه حاضر از دندان‌های کشیده شده انسانی برای رشد بیوفیلم میکروبی استفاده شد (۴، ۵).

در مطالعات بر روی بیوفیلم به عامل مهم زمان هم باید توجه کرد. نشان داده شده است که بیوفیلم انتروکوک فکالیس در دو هفته اول کشت به هیپوکلریت سدیم، کلرهگزیدین و ترکیبات ید حساس می‌باشد ولی در هفته سوم و بعد، مقاومت آن به این محلول‌ها خیلی زیاد می‌شود لذا تبدیل حالت حساس به مقاوم بین هفته دوم و سوم صورت می‌گیرد (۴). در برخی مطالعات انجام شده مدت زمان انکوباسیون باکتری ۳ تا ۴ روز بوده است (۲۰، ۲۳). در حالی که در مطالعه حاضر مدت زمان انکوباسیون ۶ هفته بود.

نحوه نمونه‌گیری از بیوفیلم داخل کانال ریشه نیز از دیگر عوامل مهم می‌باشد. این در مطالعات مختلف به کمک فایل و گیتس گلیدن، مخروط کاغذی و یا آسپیره کردن محلول از داخل کانال انجام گرفته است (۴، ۱۸). این نمونه‌ها بعداً جهت تعیین CFU به کار می‌روند. به جز روش نمونه‌گیری با فایل و گیتس بقیه روش‌ها تداعی‌کننده حالت کلینیکی نمی‌باشند به عنوان مثال نمونه‌گیری با کن کاغذی فقط شامل حالت پلانکتونیک باکتری می‌باشد. با توجه به این که باکتری انتروکوک فکالیس می‌تواند تا عمق ۶۰۰ میکرون به داخل توبول‌های عاجی نفوذ کند، استفاده از گیتس‌های شماره ۵ و ۶ که شعاع آنها ۰/۷۵-۰/۶۵ میلی‌متر است، جهت اطمینان از دسترسی به براده‌های عاجی حاوی باکتری جهت تعیین اثر ضد میکروبی محلول‌های شوینده عاقلانه به نظر می‌رسد. در

مطالعه حاضر جهت جمع‌آوری براده عاجی از گیتس گلیدن استفاده گردید (۴).

عامل دیگری که بر روی نفوذ باکتری‌ها به داخل توبول‌های عاجی اثر می‌کند وجود اسمیر لایر است. در این مطالعات اسمیر لایر ممکن است از نفوذ باکتری‌ها به داخل توبول‌های عاجی جلوگیری کند لذا قبل از کشت داخل کانالی بهتر است اسمیر لایر حذف شود. در برخی از مطالعات دندان‌ها قبل از کشت آماده‌سازی می‌گردند و اسمیر لایر حذف و سپس کشت میکروبی انجام می‌گیرد در مواردی دیگر اول کشت انجام می‌شود و بعداً اینسترومنتیشن انجام می‌شود. در مطالعه Siqueira نشان داده شد که بیشتر از ۹۰٪ بار میکروبی توسط اینسترومنتیشن و شستشوی کانال با نرمال سالین از کانال ریشه برداشته شد، لذا آماده‌سازی کانال در ابتدا و بعد از اعمال مواد شوینده قضاوت بهتری در مورد قدرت ضد میکروبی آنها به ما می‌دهد (۴). در مطالعه Xie بعد از کشت بیوفیلم، ریشه‌ها اینسترومنت شده و سپس عصاره گیاهی اعمال گردید (۲۵). در این موارد مقدار زیادی از بیوفیلم توسط اینسترومنتیشن از بین می‌رود و نمی‌تواند به طور کامل اثر عصاره نشان دهد. در مطالعه حاضر بعد از آماده‌سازی کانال‌ها جهت نفوذ هرچه بیشتر باکتری به داخل توبول‌های عاجی لایه اسمیر حذف شد.

در بعضی مطالعات از قبیل مطالعه Bhardwaj و همکاران دندان‌ها به صورت عمودی برش داده شده و از یک نیمه دندان جهت کشت میکروبی و شستشو استفاده گردید (۲۳). این موضوع اثر نفوذ مواد شوینده به ناحیه آپیکال کانال توسط سرنگ که در دندان‌های عادی وجود دارد را از بین می‌برد و می‌تواند یک ضعف نسبت به کارهای کلینیکی باشد. در مطالعه حاضر از دندان کامل استفاده شد.

مواد شوینده کانال به طور مداوم در حال تغییر و تحول در جهت کارایی بهتر هستند، در حال حاضر هیچ محلول شوینده‌ای که دارای تمام خصوصیات مطلوب باشد، وجود ندارد، با این وجود مهمترین خاصیت یک محلول شوینده کانال خاصیت ضد میکروبی و سازگار بودن آن با انساج بدن می‌باشد (۳). هیپوکلریت سدیم یکی از رایج‌ترین محلول‌های

ضدمیکروبی آنها معمولاً با استخراج عصاره آبی یا الکلی آنها شروع شده و با روش‌های مختلف شناسایی اجزای مؤثر ارگانیک آنها ادامه می‌یابد (۱۶). در مطالعه حاضر از عصاره آبی دانه اسفند با غلظت ۱۰٪ با توجه به (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) آن استفاده شد. علت این مسئله حذف تأثیر الکل بر روی نتیجه واقعی اثر ضدمیکروبی عصاره اسفند بود که با توجه به این حقیقت که اجزای محلول در الکل گیاهان معمولاً از لحاظ ضدمیکروبی قوی‌تر از اجزای محلول در آب هستند، احتمالاً در صورت استفاده از عصاره الکلی در مطالعه حاضر، اثرات ضدمیکروبی قوی‌تری مشاهده می‌گردید. در مطالعه Al-Izzy به عنوان تنها مطالعه‌ای که اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی اسفند بر روی لاکتوباسیل و کاندیدا مقایسه شده، نیز مشاهده گردید که عصاره الکلی به نحو معنی‌داری قوی‌تر از عصاره آبی می‌باشد (۲۸). در این مطالعه که سعی شده تا حد امکان شرایط محیطی کشت با شرایط کلینیکی شباهت داشته باشد، اثر ضدمیکروبی قوی عصاره اسفند ۱۰٪ بر بیوفیلیم انتروکوک فکالیس نشان داده شد، به طوری که تفاوت معنی‌داری با هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ نداشت.

نتیجه‌گیری

با توجه به سمیت کم و ارزانی و همچنین برخورداری از خاصیت ضدالتهابی می‌توان استفاده از عصاره اسفند را به عنوان جایگزینی برای مواد شوینده رایج کانال مدنظر قرار داد. با این وجود این مطالعه به طور قطع جایگزین کاملی برای شرایط کلینیکی نیست و مطالعات دیگری جهت رد یا اثبات آن مورد نیاز است.

شوینده کانال مورد استفاده با تأثیر مطلوب بر حالت پلانکتونیک و بیوفیلیم میکروبه‌هاست. در اغلب مطالعات انجام شده هیپوکلریت سدیم بیشترین قدرت آنتی باکتریال نسبت به بقیه مواد مورد آزمایش را از خود نشان داده است (۳،۵،۶). البته با توجه به سمیت این ماده و احتمال ایجاد ناراحتی در صورت ورود به ناحیه پری آپیکال جستجو برای یافتن محلولی با بیشترین اثر و کمترین ضرر همواره ادامه دارد. در این بین استفاده از گیاهان دارویی در درمان ریشه در سال‌های اخیر در مقالات متعدد دیده شده است و بسته به گیاه مورد استفاده نتایج متفاوتی به دست آمده است.

Ali و همکاران با بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره اسفند روی گونه‌های متنوعی از باکتری‌ها این ماده را به عنوان یک ماده ضدمیکروبی مؤثر بر علیه باکتری‌های مقاوم به دارو توصیه کرد (۲۷). Al-Izzy و همکاران با مقایسه عصاره آبی و الکلی دانه اسفند با کلرهگزیدین، اثر آن را بر روی کلونی‌های لاکتوباسیل و کاندیدا قوی‌تر از کلرهگزیدین دیدند (۲۸). در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر ضدمیکروبی عصاره اسفند را بر روی بیوفیلیم انتروکوک فکالیس بررسی شده است.

جهت انتخاب یک داروی داخل کانال مناسب باید علاوه بر اثر ضدمیکروبی به میزان سمیت بافتی آن نیز توجه شود. با توجه به این که اغلب مواد ضدمیکروبی دارای اثرات سمی بر روی سلول‌های پستانداران هستند، استفاده از گیاهان دارویی با توجه به طبیعی بودن آنها و اثرات جانبی کمتر می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

غربالگری اولیه گیاهان برای بررسی اثرات احتمالی

References:

- 1- Seltzer S, Farber PA. *Microbiologic factors in endodontology*. Oral Surg 1994; 78(5): 634-45.
- 2- Moller A, Fabricius L, Dehlen G, Ohman AE, Heyden G. *Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys*. Scan J Dent 1981; 89(5): 475-84.
- 3- Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants*. J Endod 2009; 35(5): 711-4.

- 4- Shen Y, Gao Y, Lin J, Ma J, Wang Z, Heapasalo M. *Methods and models to study irrigation*. Endodontics Topics 2012; 27(1): 3-34.
- 5- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. *Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms*. J Endod 2006; 32(6): 527-31.
- 6- Estrela C1, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. *A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms*. J Appl Oral Sci 2009; 17(2): 87-91.
- 7- Bryce G, Ready D, Donnell D, Ng P, Pratten J, Gulabivala K. *Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants [abstract]*. Int Endod J 2008; 41(9): 814-5.
- 8- Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. *Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of Enterococcus faecalis*. J Endod 2009; 35(1): 95-7.
- 9- Berrougui H, Martín-Cordero C, Khalil A, Hmamouchi M, Ettaib A, Marhuenda, et al. *Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from Peganum harmala L. seeds in isolated rat aorta*. Pharmacol Res 2006; 54(2): 150-7.
- 10- Sadr Lahijani MS, Raoof Kateb HR, Heady R, Yazdani D. *the effect of german chamomile (Matricaria recutita L). extract and tea tree (Melaleuca altternifolia L) oil used as irrigants on removal of smear layer: a scanning electron microscopy study*. Int Endod J 2006; 39(3): 190-5.
- 11- Arshad N, Neubauer C, Hasnain S, Hess M. *Peganum Harmala can minimize Escherichia coli infection in poult, but long- term feeding may induce side effects*. Poult sci 2008; 87(2): 240-9.
- 12- Abdel-Fattah AF, Matsumoto K, Murakami Y. *Central serotonin level-dependent changes in body temperature following administration of tryptophan to pargyline- and harmaline-pretreated rats*. Gen Pharmacol 1997; 28(3): 405-9.
- 13- Adams SM. *The antineoplastic effects of prunusarmeniaca and peganum harmala in Marine P388 and L1210 leukemia models*. PhD[thesis]. Virginia Commonwealth University; 1983.
- 14- Pujar M, Macandar S. *Herbal usage in endodontics areview international*. Int Journal of Contemporary Dentistry 2011; 2(1): 34-37.
- 15- Nenaah G. *Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of Peganum harmala (L) seeds and their combination effects*. Fitoterapia 2010; 81(7): 779-82.
- 16- Cowan MM. *Plant products as antimicrobial agents*. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4): 564-82.
- 17- Al-Mizrakchi A. *Adherence of mutans streptococci on teeth surface*. PhD [thesis]. University Almustansiriya; 1998.
- 18- Rahimi S, Shahi Sh, Gholizadeh S, Shakouie S, Rikhtegaram S, Soroush Barhaghi MH, et al. *Bactericidal effects of Nd:YAG laser irradiation and sodium hypochlorite solution on enterococcus faecalis biofilm*. Photomed Laser Surg 2012; 30(11): 637-41

- 19- Jayahari NK, Niranjana NT, Kanaparthi A. *The efficacy of passion fruit juice as an endodontic irrigant compared with sodium hypochlorite solution: an in vitro study*. J Investing Clin Dent 2014; 5(2): 154-60.
- 20- Oliveira SA, Zambrana JR, Di Iorio FB, Pereira CA, Cardoso-Jorge AO. *The antimicrobial effects of Citrus limonum and Citrus aurantium essential oils on multi-species biofilms*. Braz Oral Res 2013; 28(1): 22-27.
- 21- Gupta A, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Yadav A, Singh G, et al. *Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of Syzygium aromaticum, Ocimum sanctum and Cinnamomum zeylanicum plant extracts against Enterococcus faecalis: a preliminary study*. Int Endod J 2013; 46(8): 775-83.
- 22- Rosaline H, Kandaswamy D, Gogulnath D, Rubin M. *Influence of various herbal irrigants as a final rinse on the adherence of Enterococcus faecalis by fluorescence confocal laser scanning microscope*. J Conserv Dent 2013; 16(4): 352-5.
- 23- Bhardwaj A, Velmurugan N; Sumitha, Ballal S. *Efficacy of passive ultrasonic irrigation with natural irrigants (Morinda citrifolia juice, Aloe Vera and Propolis) in comparison with 1% sodium hypochlorite for removal of E. faecalis biofilm: an in vitro study*. Indian J Dent Res 2013; 24(1): 35-41.
- 24- Neelakantan P, Subbarao C, Sharma S, Subbarao CV, Garcia-Godoy F, Gutmann JL. *Effectiveness of curcumin against Enterococcus faecalis biofilm*. Acta Odontol Scand 2013; 71(6): 1453-7.
- 25- 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.
- 26- Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. *Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against Enterococcus faecalis biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study*. J Endod 2010; 36(1): 83-6.
- 27- Ali NH, Faizi S, Kazmi SU. *Antibacterial activity in spices and local medicinal plants against clinical isolates of Karachi, Pakistan*. Pharm Biol 2011; 49(8): 833-9.
- 28- AL-Izzy MY. *Antimicrobial effects of aqueous and alcoholic extract of peganum harmala L. Seeds on two types of salivary isolated microorganisms in Al-Ramadi city*. JKAU Med Sci 2010; 17(4): 3-17.

Comparing the Antibacterial Effect of Peganum Harmala Extract and 5/25% Sodium Hypochlorite on Enterococcus Faecalis Biofilm

Tabrizzadeh M(DDS, MS)¹, Zandi H(PhD)², Mosaddegh Mehrjardi MH(PhD)³,
Mahmodizadeh H(DDS)^{*4}

^{1,4}Department of Endodontics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

²Department of Bacteriology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

³Department of Pharmacology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Received: 5 Mar 2014

Accepted: 22 May 2014

Abstract

Introduction: Considering the clinical importance of microbial biofilms in endodontic infections and the role of the different irrigating solutions in their destruction, the present study aimed to investigate the efficacy of Peganum Harmala extract and Sodium Hypochlorite on the destruction of Enterococcus faecalis biofilm.

Methods: For conducting this lab trial, root canals of 45 extracted teeth were prepared and E. faecalis biofilms were formed within the root canals. Then the teeth were randomly divided into three groups of 15. Samples were irrigated with Normal Saline in group 1, to serve as controls. 5/25% sodium hypochlorite was applied in group 2 and Peganum Harmala extract was utilized in group 3. All of the roots were irrigated by 15 cc of irrigation solutions for 15 min. Dentin chips were collected from the root canal walls and were weighed as well. Then the chips were used to prepare a suspension. The colony-forming unit (CFU) counting technique was used to determine remaining bacterial counts. The data were analyzed via Mann-whitney and kruskal-wallis tests.

Results: A significant reduction of CFU was observed in the Peganum Harmala extract and sodium hypochlorite groups compared to the control group ($p < 0/05$). No significant difference was reported between Peganum Harmala extract and sodium hypochlorite groups ($p > 0.05$).

Conclusion: The antibacterial activity of Peganum Harmala extract is found to be comparable with that of 5/25% sodium hypochlorite on the Enterococcus faecalis biofilm.

Keywords: Antimicrobial; Enterococcus Faecalis; Peganum Harmala Extract; Sodium Hypochlorite

This paper should be cited as:

Tabrizzadeh M, Zandi H, Mosaddegh Mehrjardi MH, Mahmodizadeh H. *Comparing the antibacterial effect of peganum harmala extract and 5/25% sodium hypochlorite on enterococcus faecalis biofilm*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(3): 1256-64.

***Corresponding author: Tel: +98 351 8286687, Email: hmahmodi32@yahoo.com**