Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 63, Volume 16, Issue 3

Check for updates

Research Article

In vitro Evaluation of the Combined Effect of Different Concentrations of the Calcium Hydroxide and Ethanolic Extract of *Allium hirtifolium* on the Oral Pathogen (*Enterococcus faecalis*)

Shaghayegh Mohebali[1], Vahideh Motamedosanaye[2*], Samaneh Mollazadeh[3**], Parastoo Zarghami Moghaddam[4], Alireza Afshari-Safavi[5]

[1] Dentistry Student, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[2] Assistant Professor of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Assistant Professor of Pharmaceutical Biotechnology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] Ph.D. in Microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[5] Assistant Professor of Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, Faculty of Health, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

***Corresponding author:** Vahideh Motamedosanaye, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: motamedv871@yahoo.com.
****Corresponding author:** Samaneh Mollazadeh, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: samanehmollazadeh@yahoo.com.

DOI: **10.32592/nkums.16.3.86**

How to Cite this Article:
Mohebali Sh, Motamedosanaye V, Mollazadeh S, Zarghami Moghaddam P, Afshari-Safavi A. *In vitro* Evaluation of the Combined Effect of Different Concentrations of the Calcium Hydroxide and Ethanolic Extract of *Allium hirtifolium* on the Oral Pathogen (*Enterococcus faecalis*). J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(3):86-92. DOI: 10.32592/nkums.16.3.86

Received: 17 Apr 2024
Accepted: 28 May 2024

Keywords:
Allium hirtifolium
Antibacterial effects
Calcium hydroxide
Enterococcus faecalis

Abstract

Introduction: One of the important issues in root canal treatment is the elimination of the microorganisms in the root canal before obturation. This study aimed to experimentally investigate the combined effects of ethanol extract of *Allium hirtifolium* (shallot) and calcium hydroxide on the biofilm structure of the resistant bacterium *Enterococcus faecalis*.

Method: Dried *Allium hirtifolium* was extracted with ethanol. Various concentrations (0-20-40-50-60-80-100 mg/ml) of the extract and calcium hydroxide were prepared. Antibacterial effects of these compounds were evaluated against *Enterococcus faecalis* using disc-diffusion, well-diffusion, and biofilm formation inhibition assays, along with optical absorption measurements.

Results: The results showed that in disc-diffusion and well-diffusion methods, the highest antibacterial effects were observed in the positive control group (antibiotics amoxicillin and co-amoxiclav), 100 mg/ml calcium hydroxide, and combined concentrations of calcium hydroxide and *Allium hirtifolium* (80/20, 60/40 and 50/50 mg/ml). Other concentrations of these compounds did not affect *Enterococcus faecalis*. Regarding biofilm formation, the study revealed that the ability of *Enterococcus faecalis* to form biofilm was weak at concentrations of 100, 80, and 60 mg/ml of calcium hydroxide, while other concentrations of the studied substances showed average inhibition.

Conclusion: The present study revealed that in disc diffusion and well-diffusion methods, ethanol extract of *Allium hirtifolium* alone or in combination with calcium hydroxide did not significantly inhibit the growth of *Enterococcus faecalis*, while calcium hydroxide exhibited the highest (100%) antibacterial effect.

Copyright *© 2024 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

بررسی آزمایشگاهی اثر ترکیبی غلظت‌های مختلف کلسیم هیدروکساید و عصاره اتانولی گیاه موسیر (*Allium hirtifolium*) بر روی پاتوژن داخل دهانی (*انتروکوکوس فکالیس*)

شقایق محب علی[۱]، وحیده معتمد الصنایع[۲*]، سمانه ملازاده[۳**]، پرستو ضرغامی مقدم[۴]، علیرضا افشاری صفوی[۵]

[۱] دانشجوی دکترای عمومی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] استادیار دندانپزشکی ترمیمی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] استادیار، دکترای بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] دکترای تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۵] استادیار آمار زیستی، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** وحیده معتمدالصنایع، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: motamedv871@yahoo.com.
[**] **نویسنده مسئول:** سمانه ملازاده، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: samanehmollazadeh@yahoo.com.

DOI: 10.32592/nkums.16.3.86

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸

واژگان کلیدی:
موسیر
کلسیم هیدروکساید
انتروکوکوس فکالیس
اثر ضد باکتریایی

چکیده

مقدمه: یکی از موضوع‌های مهم در درمان ریشه دندان، از بین بردن میکروارگانیسم‌های موجود در کانال ریشه قبل از پرکردن آن است. هدف از این مطالعه، بررسی آزمایشگاهی اثر ترکیبی عصاره اتانولی گیاه موسیر (Allium hirtifolium) و کلسیم هیدروکساید بر ساختار بیوفیلمی باکتری انتروکوکوس فکالیس است.

روش کار: گیاه موسیر خشک‌شده با حلال اتانول عصاره‌گیری شد. سپس، غلظت‌های تام و ترکیبی (۲۰-۴۰-۵۰-۶۰-۸۰ mg/ml) از عصاره موسیر و کلسیم هیدروکساید تهیه شدند. اثر ضد باکتریایی این ترکیبات در کنار گروه‌های کنترل مثبت (آموکسی‌سیلین و کواموکسی‌کلاو) و گروه کنترل منفی (دی‌متیل‌سولفوکساید) بر باکتری انتروکوکوس فکالیس با روش‌های انتشار دیسک، چاهک پلیت و سنجش میزان بیوفیلم بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که در روش دیسک و چاهک، بیشترین اثر ضد باکتریایی به‌ترتیب مربوط به گروه کنترل مثبت، غلظت ۱۰۰ mg/ml کلسیم هیدروکساید و غلظت‌های ترکیبی ۸۰/۲۰، ۶۰/۴۰ و ۵۰/۵۰ نسبت کلسیم هیدروکساید به موسیر است و غلظت‌های ترکیبی دیگر اثر ضد باکتریایی نداشتند. درباره تشکیل بیوفیلم نتایج نشان داد که قدرت تشکیل بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس به‌ترتیب در غلظت‌های ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ mg/ml از کلسیم هیدروکساید، ضعیف بوده و میزان آن در غلظت‌های دیگر از ترکیبات متوسط ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در روش‌های دیسک و چاهک، عصاره اتانولی گیاه موسیر به‌صورت تام و در ترکیب با نسبت‌های پایین کلسیم هیدروکساید تأثیری بر مهار رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس ندارد و کلسیم هیدروکساید در غلظت ۱۰۰٪ بیشترین اثر ضد باکتریایی را از خود نشان می‌دهد.

مقدمه

یکی از موضوع‌های مهم در درمان ریشه دندان، از بین بردن میکروارگانیسم‌های موجود در کانال ریشه، قبل از پرکردن آن است [۱]. در صورت مواجهه بافت پالپ با میکروارگانیسم‌ها، ضایعات پری‌اپیکال می‌توانند ایجاد شوند که در این صورت دندان نیازمند درمان اندودانتیک است. اصول اساسی اندودانتیک شامل اینسترومنتیشن مکانیکی، دبریدمان و پرکردن و مهر و موم کردن کانال دندان است که منجر به موفقیت طولانی‌مدت درمان اندودانتیک می‌شود. دبریدمان مکانیکی با استفاده از وسایل دستی و چرخشی به همراه پاکسازی شیمیایی با محلول‌های شوینده و داروهای ضد باکتریایی در میان جلسات درمان انجام می‌شود [۲-۴].

یکی از مواد پرکاربرد در اندودانتیکس، کلسیم هیدروکساید است که ترکیب

Copyright © 2024 *The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

آن با نرمال سالین داخل کانال در درمان پالپ زنده، ضدعفونی کردن کانال و ... کاربرد دارد و قراردهی آن به مدت یک هفته داخل کانال با کاهش التهاب و مهار باکتری‌ها همراه است. مکانیسم اثر کلسیم هیدروکساید به pH بالا و داشتن یون هیدروکسیل مرتبط است [۵، ۶]. کلسیم هیدروکساید از طریق ایجاد محیط بازی و دناتوره کردن پروتئین‌های باکتریایی اثر می‌کند [۷]. با این حال، استفاده از داروی کلسیم هیدروکساید با محدودیت‌هایی همراه است؛ زیرا این دارو تمامی میکروارگانیسم‌ها را از سیستم کانال ریشه حذف نکرده و به مدت زمان زیادی جهت اعمال اثرات ضد میکروبی خود نیاز دارد. به‌علاوه، این ماده به‌دلیل pH بالا، بالقوه سمی بوده و می‌تواند منجر به تخریب بافت نرم شود[۸].

باکتری انتروکوکوس فکالیس (Enterococcus faecalis) یک باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی و متداول‌ترین باکتری موجود در کانال‌های درمان ریشه شده است و شیوع آن ۹ برابر موارد عفونت اولیه است. این باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و کلسیم هیدروکساید مقاوم بوده و قابلیت سازگاری با شرایط نامساعد، نفوذ به توبول‌های عاجی و تشکیل بیوفیلم را دارد و می‌تواند موجب شکست درمان شود. مقاومت انتروکوکوس فکالیس نسبت به کلسیم هیدروکساید به این دلیل است که این باکتری می‌تواند درجات بالای pH را به‌خوبی تحمل کند [۹].

مطالعات زیادی درباره اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی نشان داده‌اند که این ترکیبات توانایی ممانعت از رشد باکتری‌ها را دارند. گیاه موسیر با نام علمی *Allium hirtifolium* متعلق به جنس آلیوم و از خانواده آلیاسه می‌باشد. این گیاه بومی کشور ایران است و به صورت خودرو در نواحی مرتفع و کوهستانی می‌روید. مطالعه آل ابراهیم و همکاران نشان داد که این گونه اسانس‌دار اثر مهارکنندگی و کشندگی قابل قبولی بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پیوژنز دارد و دارای خواص دارویی و ضد میکروبی است [۱۰]. خواص ضد میکروبی گیاه موسیر به وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مرتبط است که از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارند [۱۱].

با توجه به عوارض جانبی عوامل ضد میکروبی و به منظور بهبود خواص مواد مورد مصرف در درمان ریشه دندان، کاهش سمیت مواد شیمیایی و شکست درمان ناشی از مقاومت باکتری‌ها، در این تحقیق به بررسی اثر ترکیب غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه موسیر با کلسیم هیدروکساید بر روی باکتری پاتوژن دهانی پرداخته شد. برای این منظور، میزان مهار رشد میکروبی عصاره، با استفاده از تست‌های میکروبی انتشار از دیسک، چاهک پلیت و روش بیوفیلم ارزیابی شد.

روش کار

تهیه گیاه

گیاه موسیر (IBRC-P 1007067) محصول استان همدان، پس از تهیه از عطاری معتبر و تأیید کارشناس گیاه‌شناسی، خشک و پودر آن تهیه شد.

تهیه باکتری

باکتری انتروکوکوس فکالیس (IBRC-M 10740) به‌صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز ذخایر ژنتیک ایران در تابستان ۱۴۰۲ خریداری شد.

عصاره‌گیری

برای تهیه عصاره موسیر از روش ماسراسیون یا خیساندن به مدت ۴۸ ساعت با حلال اتانول (۱۰۰٪) استفاده شد. برای انجام این روش، پودر گیاه با حلال اتانول خیسانده شد. سپس، عصاره دو روز تمام در دمای اتاق قرار داده شد و بعد از این زمان که تعادل غلظت مواد موجود در حلال و بافت گیاهی برقرار شد، عمل عصاره‌گیری متوقف شد. سپس، عصاره حاصل با کاغذ دالتون صاف شد. عصاره‌گیری سه بار تکرار شده و در پایان کار، عصاره‌های حاصل با کمک دستگاه تبخیر روتاری (evaporator rotary) (هایدولف، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند. حلال عصاره حاصل با کمک دستگاه آون (ممرت، آلمان) تا حد امکان خارج شد. در نهایت، عصاره‌ای با بازده ۹ درصد به دست آمد. پودر عصاره تا زمان آزمایش در یخچال ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی غلظت‌ها

میزان اثر ضد باکتریایی پودر کلسیم هیدروکساید (کارخانه گلچادنت، ایران)، عصاره اتانولی تام موسیر و غلظت‌های مختلف ترکیب کلسیم هیدروکساید و عصاره موسیر (۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با استفاده از روش انتشار دیسک، چاهک پلیت و میکروتیتر پلیت و رنگ سنجی با استفاده از کریستال ویوله بررسی شد (جدول ۱).

جدول ۱. غلظت‌های ترکیبی مختلف کلسیم هیدروکساید و عصاره اتانولی موسیر

نوع تیمار	غلظت‌های ترکیبی (mg/ml)						
عصاره اتانولی موسیر	100	80	60	50	40	20	0
کلسیم هیدروکساید	0	20	40	50	60	80	100

روش چاهک پلیت

اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه موسیر و کلسیم هیدروکساید با غلظت‌های (۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به روش چاهک پلیت انجام شد. در این روش از پلیت‌های حاوی محیط کشت تریپتون سوی آگار (شرکت صنعت آزمون پارس کشور ایران) آغشته به باکتری انتروکوکوس فکالیس استفاده شد. با یک پیت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد شده و داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت‌های مختلف به‌طور جداگانه ریخته شد. سپس، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (شرکت بهداد کشور ایران) ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن میزان مناطق مهاری ارزیابی شد و بر اساس میلی‌متر محاسبه شد. از چاهک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (سوسپانسیون آموکسی‌سیلین ۲۵۰ میلی‌گرم در ۵

میلی‌لیتر ساخت شرکت داروسازی دانا، ایران) و کوآموکسی‌کلاو (سوسپانسیون کواموکسی کلاو ۱۲۵/۳۱,۲۵ میلی‌گرم در ۵ میلی‌لیتر ساخت شرکت داروسازی دانا، ایران) به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید (شرکت صنعت آزمون پارس کشور ایران) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۲].

روش انتشار از دیسک

روش انتشار از دیسک به این‌صورت است که دیسک بلانک آغشته به عصاره با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از گیاه موسیر و کلسیم هیدروکساید، دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و کوآموکسی‌کلاو به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی به مدت ۱ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا خشک شود. سپس، بر روی محیط کشت تریپتون سوی آگار که قبلاً با تلقیح میکروبی آغشته شده، در فواصل مناسب قرار داده شد. در مرحله بعد، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در ادامه، اثر ضد باکتریایی دیسک حاوی عصاره گیاه موسیر و کلسیم هیدروکساید با دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها مقایسه شد [۱۲] .

بررسی تشکیل بیوفیلم

به منظور اندازه‌گیری میزان اثر ضد بیوفیلمی عصاره اتانولی گیاه موسیر و کلسیم هیدروکساید از روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌سنجی با کریستال ویوله استفاده شد. روش اندازه‌گیری میزان تأثیر ضد بیوفیلمی عصاره به این صورت است که ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتون سوی براث مایع (شرکت صنعت آزمون پارس کشور ایران)، داخل چاهک‌های میکروتیترپلیت ۹۶ خانه ریخته شد و چاهک اول محیط کشت بدون عصاره، شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از نسبت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه موسیر و کلسیم هیدروکساید به محیط کشت اضافه شد. یک چاهک هم شاهد منفی بدون عصاره و باکتری در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، از کشت ۲۴ ساعته میکروارگانیسم‌ها، نیم مک فارلند تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون میکروبی به همه چاهک‌ها به جز چاهکی که شاهد منفی در نظرگرفته شده بود، اضافه شد. میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. میکروتیتر پلیت در دمای اتاق خشک شده و در مرحله بعد با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هر چاهک، باکتری‌های متصل به سطح داخلی دیواره چاهک‌ها، که همان جمعیت بیوفیلمی هستند، تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه محتویات چاهک‌ها دور ریخته شد و پلیت در درجه حرارت اتاق خشک شد. به منظور رنگ‌آمیزی به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. سپس، رنگ اضافی به‌طور کامل با جریان ملایم آب شسته شده و میکروپلیت در دمای اتاق خشک شد. بعد از این مرحله، برای سنجش میزان رنگ متصل‌شده به دیواره، که نمایانگر میزان بیوفیلم است، به هرچاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ اضافه و چند بار با سمپلر به خوبی هم زده شد تا رنگ‌های متصل به چاهک که بیانگر میزان تشکیل بیوفیلم هستند به خوبی حل شود. پس از یکنواخت شدن محلول هر چاهک، میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر با دستگاه الایزا (شرکت بایوتک کشور آلمان) قرائت شد[۱۲].

سنجش میزان تشکیل بیوفیلم

وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها نیز بر طبق فرمول زیر محاسبه شد که ODC(Optical Density of control) میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل مثبت و OD(Optical Density) میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار است.

عدم تشکیل بیوفیلم $ODC \geq OD$

قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف $ODC < OD \leq 2ODC$

قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط $2ODC < OD \leq 4ODC$

قدرت تشکیل بیوفیلم قوی $4ODC < OD$

آنالیز آماری

نتایج سه بار تکرار شد. در تمام آزمون‌ها سطح معناداری ۵ درصد در نظر گرفته شد و برای تحلیل نتایج از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون کروسکال والیس استفاده شد.

یافته‌ها

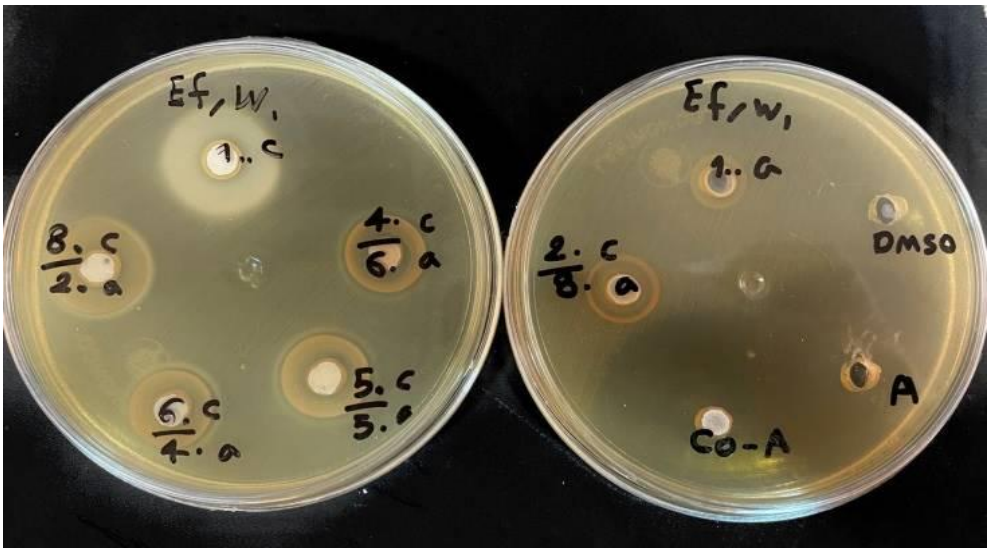
در این مطالعه اثر ضد باکتریایی غلظت‌های ترکیبی مختلف عصاره اتانولی گیاه موسیر و کلسیم هیدروکساید و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و کوآموکسی‌کلاو (کنترل مثبت) بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس بررسی شد.

بررسی اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی موسیر و کلسیم هیدروکساید بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس با روش انتشار دیسک

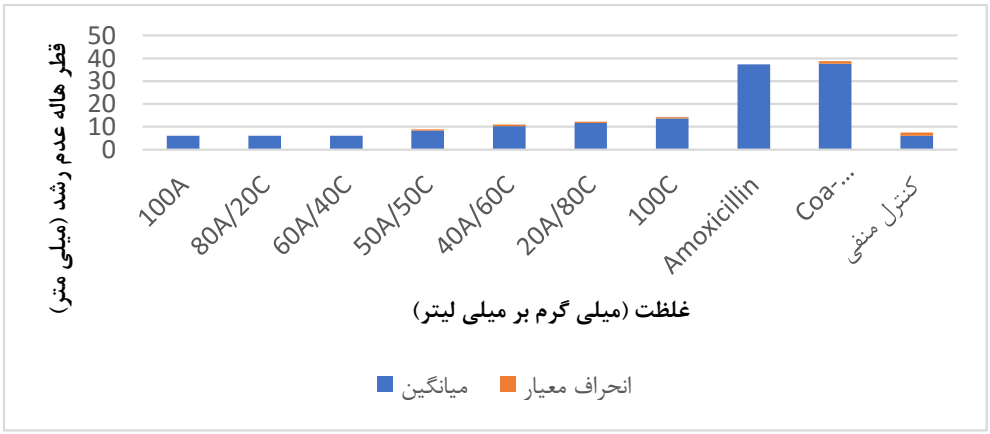
نتایج نشان داد که تفاوت آماری معناداری بین اثرات ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف ترکیبی با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک‌ها در روش انتشار از دیسک وجود داشت (P=0.002). به طوری که، بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و کوآموکسی‌کلاو بود. غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلسیم هیدروکساید نیز بیشترین اثربخشی را از بین ترکیبات مورد بررسی داشت (شکل ۱ و ۲).

بررسی اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی موسیر و کلسیم هیدروکساید بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس با روش چاهک پلیت

در روش چاهک پلیت، تفاوت آماری معنی‌داری بین اثرات ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف ترکیبی با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشت (P=0.002). بیشترین اثربخشی مشاهده شده مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بود و از بین ترکیبات نیز بیشترین اثربخشی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلسیم هیدروکساید مشاهده شد (شکل ۳).

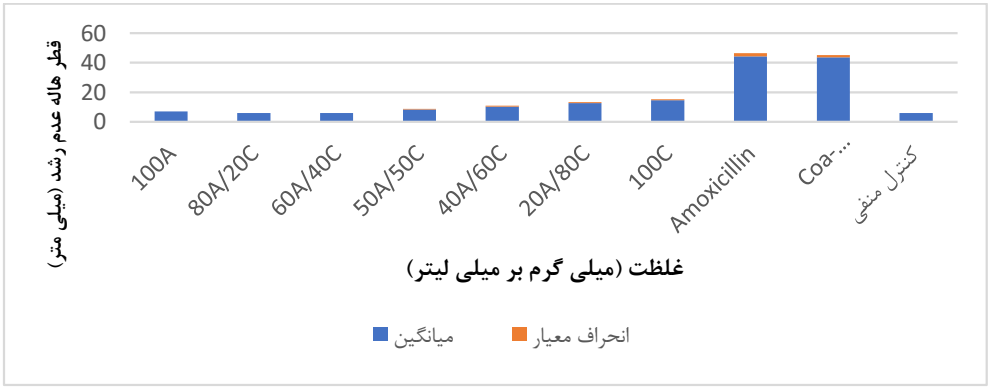


شکل ۱. پلیت آزمایش حاوی دیسک‌های آغشته به ترکیب کلسیم هیدروکساید و عصاره موسیر، گروه کنترل مثبت گروه و کنترل منفی



شکل ۲. قطر هاله عدم رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم هیدروکساید و موسیر با روش انتشار دیسک

A: موسیر و C: کلسیم هیدروکساید

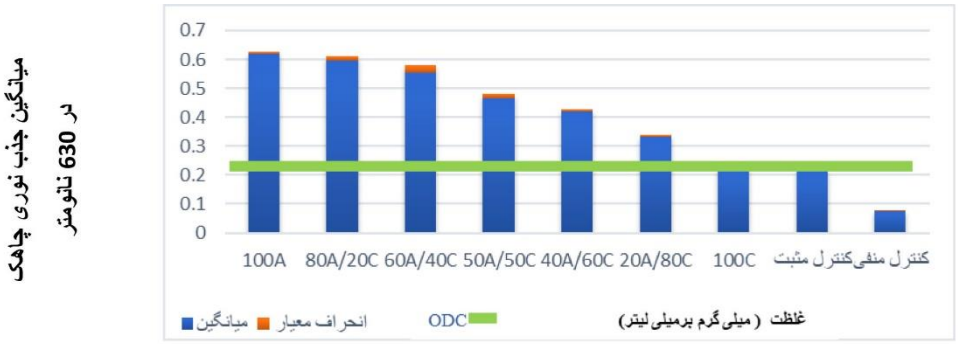


شکل ۳. قطر هاله عدم رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم هیدروکساید و موسیر با روش چاهک پلیت

A: موسیر و C: کلسیم هیدروکساید

بررسی اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی موسیر و کلسیم هیدروکساید بر ساختار بیوفیلمی باکتری انتروکوکوس فکالیس در روش بیوفیلم

در غلظت‌های mg/ml ۲۰-۴۰/۱۰۰-۶۰/۸۰ نسبت کلسیم هیدروکساید به عصاره موسیر، قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری ضعیف بوده و در غلظت mg/ml ۱۰۰ کلسیم هیدروکساید کمترین مقدار بیوفیلم باکتریایی تشکیل شد.



شکل ۴. توزیع اثر ضد باکتریایی غلظت‌های ترکیبی مختلف موسیر و کلسیم هیدروکساید بر ساختار بیوفیلمی باکتری انتروکوکوس فکالیس در روش بیوفیلم (A: موسیر و C: کلسیم هیدروکساید).

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که اثر ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید مقابل باکتری انتروکوکوس فکالیس در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه کمتر است و حدود ۳۰٪ عملکرد آن‌ها را دارد. همچنین، عصاره اتانولی گیاه موسیر تأثیری در افزایش خاصیت ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید نداشته و انتروکوکوس فکالیس می‌تواند به‌طور کامل مقابل عصاره اتانولی موسیر، مقاومت نشان دهد. در این آزمایش نشان داده شد که از بین غلظت‌های ترکیبی مختلف کلسیم هیدروکساید و عصاره اتانولی موسیر، بیشترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلسیم هیدروکساید است و پس از آن به‌ترتیب غلظت‌های (۸۰/۲۰، ۶۰/۴۰)میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت کلسیم هیدروکساید به موسیر، بیشترین خواص ضد باکتریایی را داشتند. در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی موسیر، هیچ‌گونه خاصیت ضد میکروبی مقابل باکتری مورد نظر یافت نشد. با این حال، اثر ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مقابل انتروکوکوس فکالیس، کمتر از اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و کواموکسی‌کلاو (کنترل مثبت) مقابل این باکتری است.

در تحقیق مشابهی، Awawdeh و همکاران به بررسی اثر کلسیم هیدروکساید و پروپولیس به‌عنوان یک داروی کوتاه مدت داخل کانال مقابل باکتری انتروکوکوس فکالیس پرداختند. در این آزمایش مشخص شد در مدت زمان ۱ الی ۲ روز، پروپولیس نسبت به کلسیم هیدروکساید اثر ضد میکروبی بیشتری مقابل انتروکوکوس فکالیس داشته و محدودیت اثر کلسیم هیدروکساید مقابل انتروکوکوس فکالیس تأیید شد[۱۳]. علت عدم کارایی مناسب عصاره موسیر در مطالعه حاضر را می‌توان مدت زمان کوتاه انجام آزمایش و گونه گیاهی مورد استفاده دانست. همچنین، سویه باکتری انتروکوکوس فکالیس تجاری ممکن است به‌دلیل پاساژهای مکرر ویژگی‌های مقاومت در برابر عوامل ضدمیکروبی معمول را کسب کرده باشد که شاید این علتی بر عدم کارایی عصاره مورد استفاده در مطالعه حاضر باشد.

در مطالعه عادل و همکاران به مقایسه اثر ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید، کلرهگزیدین و کارواکرول (Carvacrol) مقابل انتروکوکوس فکالیس پرداخته و مشخص شد که هر سه گروه درمانی در از بین‌بردن انتروکوکوس فکالیس مؤثر بودند و تفاوت آماری معناداری بین آن‌ها یافت نشد [۱۴].

در این مطالعه، اشاره‌ای به هاله عدم رشد باکتری نشده بود. مدت زمان بررسی اثر ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید مشابه با مطالعه حاضر بود، ولی برخلاف مطالعه حاضر از هیچ نوع آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان کنترل مثبت استفاده نشده بود. به‌طورکلی، استفاده از گروه کنترل آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر باعث افزایش دقت مقایسه اثرات ضد میکروبی شد، اما استاندارد این اثر را به گونه‌ای افزایش داد که حتی اثرات ضد میکروبی نسبی اثبات‌شده کلسیم هیدروکساید نیز بروز عینی چندانی نیافته است؛ بنابراینممکن است در مطالعه عادل [۱۴] هر سه تیمار استفاده شده اثر ضد میکروبی محدودی نسبت به آنتی‌بیوتیک مقابل انتروکوکوس فکالیس از خود نشان داده باشند.

مطالعه آل ابراهیم و همکاران نشان داد که گیاه موسیر اثر مهارکنندگی و کشندگی قابل قبولی بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اسینتوباکتر بومانی دارد و دارای خواص دارویی و ضد میکروبی است [۱۰]. در حالی که، در مطالعه حاضر چنین اثری از گیاه موسیر بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس مشاهده نشد که می‌توان آن را به‌دلیل تفاوت در گونه گیاهی مورد استفاده، گونه باکتری مورد آزمایش و مدت زمان سنجش خواص ضد میکروبی دانست.

در مطالعه‌ی پوراسماعیلی مشخص شد که عصاره اتانولی موسیر بیشترین اثر ضد باکتریایی را مقابل باکتری‌های سودوموناس ائورژینوزا، انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین و آسینتوباکتر بومانی دارد، در حالی‌که باکتری کلبسیلا پنومونیه بیشترین مقاومت را مقابل عصاره داشت [۱۵]. با وجود مشابهت روش عصاره‌گیری گیاه موسیر و انتشار از دیسک با مطالعه حاضر، تفاوت در نتیجه به دست آمده در مطالعه پوراسماعیلی و این مطالعه را می‌توان به تفاوت در گونه باکتری مورد آزمایش و میزان و نوع مواد موثر موجود در گیاه موسیر استفاده‌شده بسته به محل رویش آن نسبت داد.

در مطالعه‌ای که Lana و همکاران انجام دادند، اثر کلسیم هیدروکساید مقابل انتروکوکوس فکالیس در کانال ریشه چنددندان تک‌کانال انسان بررسی شد که نتایج حاصل از آن نشان داد، کلسیم هیدروکساید در مدت زمان ۱۴ روز بیشترین اثر ضد باکتریایی را مقابل انتروکوکوس فکالیس دارد و به‌طور کامل باعث مهار رشد باکتری می‌شود [۱۶]. در مطالعه حاضر، اثر

کلسیم هیدروکساید مقابل باکتری در مدت زمان ۴۸ ساعت بررسی شد که علت تفاوت نتایج حاصل را می‌توان به تفاوت در مدت زمان بررسی اثر دارو بر باکتری انتروکوکوس فکالیس و همچنین روش آزمایشگاهی متفاوت در دو مطالعه نسبت داد. علاوه بر این، انتخاب گروه کنترل آنتی‌بیوتیک در مطالعه حاضر بستر سخت‌تری را برای معناداری خواص ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید ایجاد کرده است.

نتیجه‌گیری

آنالیز نتایج حاصل از مطالعه در روش‌های انتشار از دیسک، چاهک پلیت و روش بیوفیلم نشان داد که بیشترین اثر ضد باکتریایی مقابل انتروکوکوس فکالیس مربوط به غلظت 100 mg/ml کلسیم هیدروکساید است که تا حد زیادی قادر به مهار تشکیل بیوفیلم باکتری نیز است. پس از آن، بیشترین اثر ضد باکتریایی به‌ترتیب مرتبط با غلظت‌های mg/ml 80/20 و ۶۰/۴۰ نسبت کلسیم هیدروکساید به موسیر است. در مقابل، غلظت‌های دیگر از ترکیب عصاره موسیر و کلسیم هیدروکساید، کمترین فعالیت ضد باکتریایی را از خود نشان دادند.

پیشنهادها و محدودیت‌های مطالعه

از آن‌جایی که، هدف از تحقیقات گیاهی رسیدن به معادل‌هایی برای گلد استانداردهای شیمیایی است که برگرفته از طبیعت بوده و مضرات پیرامونی آن حداقل باشد، پیشنهاد می‌شود گیاهانی آزموده شوند که خصوصیات ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و pH قلیایی قابل قبولی دارند تا گزینه مناسبی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی کشف شود. قطعاً مسیر رسیدن به چنین ترکیباتی نیازمند پژوهش‌های متعدد آزمایشگاهی خواهد بود و نتایج این مطالعات، فهرست بزرگ خانواده گیاهی در دسترس را برای پژوهش‌های آتی، منسجم‌تر و محدودتر خواهد کرد. همچنین، می‌توان به بررسی اثر ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم و عصاره موسیر بر سایر پاتوژن‌های دهان برای به دست آوردن تصویر درست‌تر از خواص ضدباکتریایی و اثر غیرسمی آن بر سلول‌های فیبروبلاست دهان اشاره کرد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با کد پژوهشی و کد اخلاق IR.NKUMS.REC. 1402.063 مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی و با حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشکده دندان‌پزشکی خراسان شمالی انجام شده است. با سپاس از مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی که ما را در اجرای این طرح یاری کردند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافعی را بیان نمی‌کنند.

References

1. Harrison JW. Irrigation of the root canal system. Dent Clin of Nrth America.1984;28(4):797-808. [PMID: 6389200]
2. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endo J. 2011;44(8):697-730. [DOI: 10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x] [PMID: 21535021]
3. Torabinejad M, Fouad AF, Shabahang S. Endodontics e-book: Principles and practice: Elsevier Health Sciences. 2020. [Link]
4. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. Int Dnt J. 2005;55(5):293-301. [DOI: 10.1111/j.1875-595x.2005.tb00326.x] [PMID: 16245464]
5. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. Int Endo J. 2007;40(1):2-10. [DOI: 10.1111/j.1365-2591.2006.01197.x] [PMID: 17209826]
6. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. J Endod. 2007;33(2):114-18.
7. Dianat O, Saedi S, Kazem M, Alam M. Antimicrobial activity of nanoparticle calcium hydroxide against Enterococcus faecalis: an in vitro study. Iran Endod J. 2015;10(1):39. [PMID: 25598808]
8. Kumar H. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of Curcuma longa, Tachyspermum ammi, chlorhexidine gluconate, and calcium hydroxide on Enterococcus faecalis. J Conserv Dent. 2013;16(2):144. [DOI: 10.4103/0972-0707.108197] [PMID: 23716967]
9. Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of Enterococcus faecalis in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. Int J Oral Sci. 2012;4(1):19-23. [DOI: 10.1038/ijos.2012.17] [PMID: 22422085]
10. Aleebrahim-Dehkordi E, Ghasemi-Pirbalouti A, Rafieian-Kopaie M. Anti bacterial effect, extent of phenol compound, and anti oxidant operate of alcoholic essence of Allium hirtifolium Boiss. J Med Herb. 2016;7(3):209-14. [Link]
11. Ghasemi-pirbalouti A. Medicinal and aromatic plants (recognizing and evaluation of their effects). Published of Islamic Azad University Shahre kord Branch. 2008. [Link]
12. Abrishami MR, Alesheikh P, Gharaei S, Norozi Khalili M, Saadat Khaje M, Zarghami Moghaddam P. Synergistic effect of methanolic extracts of Rosmarinus Officinalis and Eugenia caryophyllata on Biofilm of oral pathogenic bacteria. J North Khorasan Univ Med Sci. 2020;12(3):1-9. [Link]
13. Awawdeh L, AL-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against Enterococcus faecalis: A laboratory study. Aust Endod J. 2009;35(2):52-58. [DOI: 10.1111/j.1747-4477.2008.00125.x] [PMID: 19703075]
14. Adel M, Sharifi M, Hamedi R, Rahmani N, Javadi A, Jahangiri F. Comparing the antimicrobial efficacy of carvacrol, chlorhexidine and calcium hydroxide on Enterococcus faecalis in root canal treatment: an in vitro study. J Maz Univ Med Sci. 2016;26(143):108-19. [Link]
15. Pouresmaeil O, Baledi F, Sherafati S, Sarafan A. The combined effects of shallot extract by the vacuum rotary evaporator technique with common antibiotics against multidrug-resistant bacteria. J Nutr. 2020;8(4):288-93. [Link]
16. Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi ALd, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on Enterococcus faecalis cultivated in root canal systems. Bra Dent J. 2009;20:32-36. [DOI: 10.1590/S0103-64402009000100005]