بررسی اثر آنتی‌باکتریال اسانس دارچین (Cinnamon) بر رشد Porphyromonas gingivalis حاصل از پاکت‌های عمیق بیماران مبتلا به پریودنتایتیس مزمن (in vitro)

دکتر بابک عموئیان[۱]- دکتر شقایق نوری‌بیات[۲]+- زهرا مولانا[۳]- دکتر علی‌اکبر مقدم‌نیا[۴]- فریبا اصغرپور[۵]

۱- استادیار گروه آموزشی پریودنتیکس و عضو مرکز تحقیقات مواد دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲- دستیار تخصصی گروه آموزشی پریودنتیکس و عضو کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳- استادیار گروه آموزشی میکروب شناسی و عضو مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴- استاد گروه آموزشی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۵- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

Assessment of antibacterial effect of cinnamon on growth of porphyromons gingivalis in chronic periodontitis patients with deep pockets

Babak Amoian[1], Shaghayegh Noori Bayat[2†], Zahra Molana[3], Ali Akbar Moghaddam Nia[4], Fariba Asgharpoor[5]

1- Assistant Professor, Department of Peridontics/ Member of Dental Materials Research Center, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

2†- Post-graduate Student, Department of Peridontics/ Member of Research Committee, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran (dr.sh.noori@gmail.com)

3- Assistant Professor, Department of Microbiology/Member of Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, School of Paramedicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

4- Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

5- Master of Biochemistry, Department of Laboratory, School of Paramedical, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Background and Aims: Antibiotics are commonly used for controlling the growth of porphyromons gingivalis (P.g) which is one of the most important etiologic factors in the periodontal diseases. Different side effects of synthetics and chemical drugs such as increasing the drug resistancy in the human pathogens have led to study on the herbal antibacterial effect. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of cinnamon on the growth of porphyromons gingivalis in chronic periodontitis patients with deep pockets.

Materials and Methods: In this experimental study, samples were provided from patients having pockets. After culturing the microorganism and diagnosis of P.g by gram staining and biochemical tests, cinnamon in different concentrations (10, 50, 100, 250, 500, 750 and 1500 mg/ml) with oil solvent were prepared and placed by disks in the cultures medium. Positive controls were amoxicillin, metronidazole, ciprofloxacin, amikacin and gentamycin. Oil was negative control. Then the plates were incubated for 24 hours in 37°C and then non-growth halos by disk diffusion method, MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) were determined. Data were analyzed using One-way ANOVA test.

Results: The results showed that the cinnamon at the concentration of MIC=750 mg/ml had the inhibitory effects of bacteria and at the concentration of MIC=1500 mg/ml had killing effect. However, this antibacterial effect compared with commonly used antibiotics (amoxicillin, metronidazole), was much weaker ($P<0.001$).

Conclusion: Cinnamon showed an antimicrobial effect on porphyromonas gingivalis in chronic periodontitis patients with deep pockets.

Key Words: Chronic periodontitis, Porphyromonas gingivalis, Patients

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2014;27(1):8-15

+ مؤلف مسؤول: نشانی: بابل- دانشگاه علوم پزشکی بابل- دانشکده دندانپزشکی- گروه آموزشی پریودنتیکس

تلفن: ۲۲۰۱۱۴۰۸ نشانی الکترونیک: dr.sh.noori@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده

زمینه و هدف: پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس همواره یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجاد بیماری پریودنتال بوده که برای مهار آن به صورت رایج از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌گردد. عوارض متعدد داروهای سنتتیک و نیز گسترش مقاومت دارویی موجب تمایل به مواد ضدمیکروبی با منشأ طبیعی مثل گیاهان شده است. هدف از این تحقیق بررسی اثر آنتی‌باکتریال اسانس دارچین در رشد این باکتری، در پاکت‌های عمیق بیماران مبتلا به پریودنتایتیس مزمن بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی پس از نمونه‌برداری از پاکت‌های عمیق بیماران مبتلا به پریودنتایتیس مزمن پیشرفته، کشت و تشخیص باکتری با رنگ‌آمیزی گرم و تست بیوشیمیایی انجام شد. اسانس دارچین در غلظت‌های گوناگون (mg/ml ۱۵۰۰و۲۵۰،۵۰۰،۷۵۰، ۱۰،۵۰،۱۰۰،۲۵۰) با حلال روغنی تهیه و توسط دیسک در محیط کشت قرار داده شد. از دیسک آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، مترونیدازول، سیپروفلوکسازین، آمیکاسین و جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت و از دیسک بلانک آغشته به روغن (حلال) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها براساس متد انتشار دیسک و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین گردید. برای مقایسه نتایج از تست One-way ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اسانس دارچین در غلظت MIC=۷۵۰ mg/ml، اثر مهارکنندگی باکتری و در غلظت MIC=۱۵۰۰ mg/ml اثر کشندگی نشان داد که البته این اثر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده (آموکسی‌سیلین، مترونیدازول)، بسیار ضعیف‌تر بوده است (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: بر طبق یافته‌ها، اسانس دارچین در محیط آزمایشگاهی اثر آنتی‌میکروبیال بر روی میکروارگانیسم پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس حاصل از بیماران مبتلا به پریودنتایتیس دارد.

کلید واژه‌ها: پریودنتایتیس مزمن، پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس، بیماران

وصول: ۹۲/۰۴/۱۱ اصلاح نهایی: ۹۲/۱۱/۰۴ تأیید چاپ: ۹۲/۱۱/۲۴

مقدمه

پس از معرفی بیماری پریودنتال به عنوان شایع‌ترین بیماری سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ میلادی و با عنایت به اینکه براساس آمار و ارقام، شیوع این بیماری در سن ۴۵ سالگی می‌تواند به مرز ۱۰۰ درصد برسد (۱) و ایجاب می‌نماید که مطالعات و تحقیقات، هرچه بیشتر در راه دست‌یابی به استراتژی‌های مناسب درمانی جهت مداوای این بیماری صورت پذیرد. یکی از انواع بسیار مخرب بیماری‌های پریودنتال، Aggressive periodontitis می‌باشد. با پیشرفت‌هایی که در علم میکروبیولوژی حاصل گردیده وجود باکتری پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس به عنوان یکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های این بیماری به اثبات رسیده است (۲،۳). از آنجایی که این باکتری دارای قابلیت ژنتیکی بسیار بالایی به منظور ایجاد مقاومت در برابر انواع شرایط نامساعد در برابر رشد و تکثیر خویش می‌باشد، می‌تواند به آسانی در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج دارای مقاومت گردد. عمده مطالعاتی که تاکنون بر روی این باکتری انجام شده است نشان می‌دهد که زیستگاه خاص این باکتری (عمق پاکت‌های عمیق‌تر از ۵ میلی‌متر) پاسخ طولانی مدت دلخواهی در برابر درمان‌های غیرجراحی به منظور حذف باکتری پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس از خود نشان نمی‌دهد (۴،۵). اما از سوی دیگر بیماران مبتلا به پریودنتایتیس عموماً به دلیل بالا بودن هزینه درمان و ترس از درد تمایل کمتری برای درمان‌های جراحی از خود نشان می‌دهند. بنابراین اگر بتوان به یک استراتژی غیر جراحی مناسب دست یافت گامی بزرگ در جهت درمان این بیماران برداشته خواهد شد. در کشور ما با استناد به نتایج تحقیقات معتبر آمریکایی و اروپایی شایع‌ترین داروی مورد استفاده در جهت کنترل Aggressive periodontitis ترکیب آنتی‌بیوتیکی آموکسی‌سیلین و مترونیدازول می‌باشد. لکن در این میان یک نکته مهم درنظر گرفته نمی‌شود و آن شیوع مقاومت زیاد افراد ایرانی به هر دو نوع آنتی‌بیوتیک فوق (خصوصاً آموکسی‌سیلین) به دلیل موارد شایع تجویز پزشکی این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۵) و این درحالیست که یکی از مهم‌ترین شرطهای تجویز آنتی‌بیوتیک جهت درمان‌های پریودنتال، Narrow spectrum بودن آنتی‌بیوتیک و عدم استفاده بسیار رایج آن می‌باشد. در مطالعات بسیاری به صدمات معده‌ای- روده‌ای (Gastrointestinal adverse effects) ناشی از مصرف بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک‌ها پرداخته شده است (۶). مقاومت دارویی، ایجاد حساسیت، افزایش ریسک عفونت (۶)، افزایش خطر ابتلا به افسردگی، تاکی کاردی (۷)، ناتوانی آنتی‌بیوتیک‌ها در دستیابی به غلظت مناسب جهت تأثیر آنتی‌باکتریال در محل عفونت (۸)، افزایش خطر واکنش‌های ناخواسته دارویی (Adverse drug reaction) (۹،۱۰) از عوارض دیگر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست.

www.SID.ir
Archive of SID

بنابراین باتوجه به اینکه درحال حاضر اکثر مواد اولیه دارویی در ایران ساخته نشده و نیاز به واردات این کالاها وجود دارد و از طرفی مقاوم شدن باکتری‌ها نسبت به داروهای ساختگی شیمیایی، نیاز به بررسی و تولید انواع مواد ضدمیکروبی گیاهی به نظر منطقی می‌رسد (۱۱). دارچین با نام علمی Cinnamomum spp است که عصاره ساقه گیاه و سرشاخه‌های جوان و همچنین روغن برگ‌های این گیاه کاربرد درمانی دارند. دارچین دارای موسیلاژ، تانن، قند، رزین و اسانس است؛ اسانس دارچین مهم‌ترین قسمت آن است و به ویژه در پوست تنه گیاه یافت می‌شود. قسمت اعظم این اسانس را سینامیک آلدهید تشکیل می‌دهد (۱۲). علاوه بر این اثر آنتی‌باکتریال دارچین در مطالعات بسیاری مورد توجه قرار گرفته و به اثبات رسیده است (۱۳،۱۴). لذا با توجه به عوارض ذکر شده آموکسی‌سیلین و مترونیدازول و اشاره به این حقیقت که در بین همه روش‌های تشخیصی باکتریایی، کارایی و حساسیت روش کشت بالاتر از روش‌های پیشرفته‌ای مانند DNA-prob و PCR می‌باشد و به عنوان Gold standard در تعیین کارایی روش‌های تشخیصی میکروبی جدید به کار می‌رود (۱۵). هدف از تحقیق حاضر این بود که با بهره‌گیری از این روش، تغییرات کمی کلونی‌های باکتری پورفیرومونواس ژینژیوالیس با حضور دارچین در محیط کشت بررسی گردد تا درصورت مؤثر بودن، به عنوان روش پیشنهادی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، در درمان افراد مبتلا به بیماری‌های پریودنتال مطرح شود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از میان بیماران مراجعه‌کننده به بخش پریودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل تعدادی از بیماران مبتلا به پریودنتایتیس مزمن پیشرفته انتخاب شدند. پس از معاینات کلینیکی، گرفتن تاریخچه و مشاهده رادیوگرافی، براساس موارد مطرح شده در کارگاه بین‌المللی سال ۱۹۹۹ درمورد طبقه‌بندی بیماری‌های پریودنتال (۴) تشخیص بیماری پریودنتیت مزمن گذاشته شده و به تأیید حداقل دو تن از اساتید بخش رسید. در مجموع ۲۴ بیمار در محدوده سن ۶۵-۳۵ سال وارد مطالعه شدند. نمونه‌ها از دندان‌های مولر اول، پرمولر اول و سانترال (۴) در هر فک تهیه گردید. پس از مشخص کردن مکان نمونه‌برداری (عمیق‌ترین پاکت هر کوادرانت،) ابتدا سطح مارجین لثه، با سواپ استریل به خوبی پاک و خشک شد تا احتمال تأثیر باکتری‌های موجود در بزاق حذف گردد سپس Paper point شماره ۳۰ به آرامی در عمق پاکتی که قبلاً اندازه‌گیری شده بود، فرو برده شد و پس از ۳۰ ثانیه خارج گردید. سپس کن کاغذی در شیشه‌های حاوی ۱ سی‌سی محیط ترانسپورت استریل BHI که قبل از استفاده به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده و احیاء شده قرار گرفت. پس از قرار دادن کن کاغذی درون شیشه درب آن محکم بسته شد و در عرض کمتر از ۱ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید نمونه‌ها، پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند تا باکتری‌ها از یکدیگر جدا شوند و محیط تقریباً یکنواختی را ایجاد نمایند. سپس به اندازه یک آنس پر از محلول ترانسپورت برداشته و روی محیط‌های کشت اختصاصی پورفیرومونواس ژینژیوالیس قرار داده شد. محیط اختصاصی آن شامل بروسلا آگار Hemin، به علاوه ویتامین K و خون گوسفند بود (۳). در این محیط باکتری به صورت خطی کشت داده شد و در Candle Jar به همراه گاز پک نوع A که به ۳۵ میلی لیتر آب آغشته شده، قرار گرفت و به مدت ۳ روز در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای تهیه Hemin، ۰/۵ گرم پودر آن در ۱۰ میلی‌لیتر سود نرمال حل شد. حجم آن توسط آب مقطر به ۱۰۰ سی‌سی رسانده شده و ۱۵ دقیقه در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد سترون گردید. درمورد ویتامین K از آمپول تجارتی mg/ml ۱ استفاده شد. پس از تلقیح باکتری به محیط با استفاده از جار و گاز پک، پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه گذاشته شدند. سپس در شرایط بی‌هوازی مورد مشاهده قرار گرفتند. این باکتری مولد رنگدانه سیاه بوده و پس از نگهداری کشت آن به مدت ۲-۱ هفته در گرمخانه، کلنی‌ها به رنگ تیره درمی‌آیند. پورفیرومونواس ژینژیوالیس در رنگ‌آمیزی گرم زیر میکروسکوپ به صورت کوکوباسیل گرم منفی مشاهده شد. سپس با استفاده از تست بیوشیمیایی (تست معرف تریپسین که تست تشخیصی برای پورفیرومونواس ژینژیوالیس است) حضور این باکتری در محیط‌های کشت حاصل از پاکت‌های پریودنتالی به اثبات رسید.

تهیه غلظت‌های مختلف اسانس دارچین: میزان ۵۰ گرم اسانس خالص دارچین از شرکت پخش ترکیبات گیاهی زردبند، خریداری شده و غلظت‌های مختلف آن از ترکیب اسانس و حلال روغنی تهیه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین حساسیت نمونه پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس به عصاره گیاهی: جهت تعیین حساسیت باکتری نسبت به اسانس گیاهی، روش دیسک دیفیوژن مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که ابتدا از سویه باکتریایی، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و سپس با استفاده از سواب پنبه‌ای استریل از سوسپانسیون تهیه شده در سطح محیط مولر هینتون آگار، کشت یکنواخت سفره‌ای انجام شد. در مرحله بعد دیسک‌های بلانک استریل (ساخت شرکت پادتن طب) در غلظت‌های (۱۵۰۰mg/ml، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰) اسانس غوطه‌ور شدند و این دیسک‌ها با فاصله معین از یکدیگر روی سطح آگار قرار داده شدند. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، مترونیدازول، سیپروفلوکسازین، آمیکاسین و جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت و از دیسک بلانک آغشته به روغن (حلال) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از آن، هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی اسانس را از پشت پلیت با خط‌کش براساس میلی‌متر اندازه‌گیری کرده و نتایج حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها را با جدول استاندارد (۱۴) (CLSI2006) مقایسه کردیم. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت متوسط گزارش گردید.

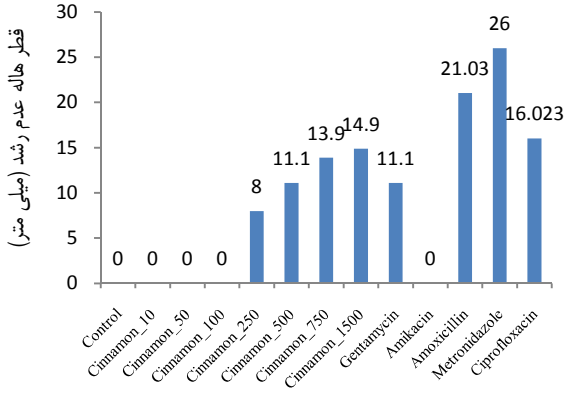
تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): آزمایش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش Micro-bruth dilution انجام شد (Mahon C R.2011). ابتدا از محیط کشت مولر هینتون برات (مرک آلمان) ۱۰۰ µl داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ µl عصاره اضافه گردید و از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه ۱۰ رقیق شدند. در ردیف‌های دیگر هم ۱۰ µl از آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، مترونیدازول، سیپروفلوکسازین، آمیکاسین و جنتامایسین به عنوان شاهد (کنترل مثبت) مورد آزمایش قرار گرفت. در آخر به همه چاهک‌ها ۱۰۰µl سوسپانسیون میکروبی ۵ ×۱۰۵ CFU/ml (Mahon C R.2011) اضافه گردید. همچنین چاهکی که حاوی روغن بود به عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد. چاهک‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم بررسی گردیدند. از میان چاهک‌هایی که در آن‌ها باکتری رشد نکرده بود چاهکی که حاوی کمترین غلظت اسانس گیاهی بود به عنوان MIC گزارش گردید.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC): برای آزمایش Minimum Bactericidal Concentration (MBC)، ۱۰µl از سه خانه ماقبل خانه MIC به طور جداگانه بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت کمترین غلظتی از عصاره که باکتری در آن رشد نکرده بود (۹۹٪ عدم رشد) را به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش کردیم (Mahon C R.2011).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به دست آمده از تحقیق با استفاده از نرم افزار آمار SPSS نسخه ۱۸/۰ تجزیه و تحلیل گردید. با توجه به تست توزیع داده‌های قطر هاله عدم رشد (Halo)، مشخص گردید که توزیع داده‌ها از یک وضعیت نرمال تبعیت می‌کرد. لذا از تست پارامتریک در این مطالعه استفاده شد. برای مقایسه داده‌ها از تست One-way ANOVA استفاده به عمل آمد.

یافته‌ها

در این مطالعه اثر ضدمیکروبی اسانس دارچین بر روی سویه پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس حاصل از بیمار مبتلا به پریودنتایتیس مزمن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف اسانس گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌های شاهد درمورد پورفیرومونا‌س ژینژیوالی، برطبق نمودار ۱ و جدول ۱ می‌باشد.



نمودار ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف اسانس دارچین و آنتی‌بیوتیک‌های شاهد

www.SID.ir

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) در غلظت‌های مختلف اسانس دارچین و آنتی‌بیوتیک‌های شاهد

گروه‌ها	میانگین±انحراف معیار
اسانس دارچین (۲۵۰)	۸±۰/۲۶۴
اسانس دارچین (۵۰۰)	۱۱/۱±۰/۴۳۵
اسانس دارچین (۷۵۰)	۱۳/۹±۰/۲۶۴
اسانس دارچین (۱۵۰۰)	۱۴/۹±۰/۳۶۰
جنتامایسین	۱۱/۱±۰/۳
آمیکاسین	۰
آموکسی‌سیلین	۲۱/۰۳±۰/۳۲۱
مترونیدازول	۲۶±۰/۲۶۴
سیپروفلوکسازین	۱۶/۰۲۳±۰/۳۲۱

نتایج حاصل از آزمایشات میکروبی نشان می‌دهد که اسانس دارچین در غلظت‌های ۱۵۰۰mg/ml و ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰ قادر به مهار رشد باکتری می‌باشد. اسانس دارچین در غلظت MIC=۷۵۰mg/ml، اثر مهارکنندگی باکتری و در غلظت MBC=۱۵۰۰mg/ml اثر کشندگی نشان داده است که البته این اثر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده، بسیار ضعیف‌تر بوده است. براساس نتایج به دست آمده شمارش کلونی‌های باکتری قبل و بعد از اثر روغن (حلال) تفاوت مشهودی نداشته است. MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- میانگین MIC و MBC در غلظت‌های مختلف اسانس دارچین و آنتی‌بیوتیک‌های شاهد

گروه‌ها	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
اسانس دارچین	۷۵۰	۱۵۰۰
جنتامایسین	۰/۸	۳/۱۲
آمیکاسین	۳/۱۲	۶/۲۵
آموکسی‌سیلین	۰/۱۲۵	>۲۵۶
مترونیدازول	۰/۲۵۶	>۱۶
سیپروفلوکسازین	۰/۰۲۳	۰/۰۳۲

براساس نتایج تحقیق:

- بین غلظت ۲۵۰mg/ml اسانس دارچین و همه گروه‌ها تفاوت با P<۰/۰۰۱ معنی‌دار است.
- بین غلظت ۵۰۰mg/ml اسانس دارچین با همه گروه‌ها به غیر از گروه شاهد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین تفاوت با P<۰/۰۰۱ معنی‌دار است.
- بین غلظت ۷۵۰mg/ml اسانس دارچین با سایر غلظت‌های اسانس دارچین شامل ۱۰mg/ml، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، تفاوت با P<۰/۰۰۱ معنی‌دار است و فقط بین غلظت ۷۵۰mg/ml اسانس دارچین با گروه غلظت ۱۵۰۰mg/ml، تفاوت با P=۰/۰۰۳ معنی‌دار است.
- بین غلظت ۱۵۰۰mg/ml اسانس دارچین با همه گروه‌ها تفاوت با P<۰/۰۰۱ و فقط با گروه غلظت ۷۵۰mg/ml اسانس دارچین تفاوت با P=۰/۰۰۳ و گروه شاهد آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین با P<۰/۰۰۱ معنی‌دار است.
- درمورد کلیه آنتی‌بیوتیک‌ها تفاوت با همه گروه‌ها با P<۰/۰۰۱ معنی‌دار است. فقط در گروه آنتی‌بیوتیک آمیکاسین با گروه کنترل منفی (حلال روغنی)، غلظت ۱۰mg/ml، ۵۰ و ۱۰۰ اسانس دارچین تفاوت معنی‌دار نیست (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

ثابت شده است که باکترهای بی‌هوازی نقش مهمی در ایجاد عفونت‌های پریودنتال ایفا می‌کنند. در بین این دسته از باکتری‌ها، پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس همواره به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل معرفی می‌شود (۱۶). عمده مطالعاتی که تاکنون بر روی این باکتری انجام شده است نشان می‌دهد که زیستگاه خاص این باکتری (عمق پاکت‌های عمیق‌تر از ۵ میلی‌متر)، پاسخ طولانی مدت دلخواهی در برابر درمان‌های غیرجراحی به منظور حذف باکتری از خود نشان نمی‌دهد. اما از سوی دیگر بیماران مبتلا به پریودنتیت عموماً به دلیل بالا بودن هزینه درمان و ترس از درد، تمایل کمتری برای درمان‌های جراحی از خود نشان می‌دهند (۴،۵). بنابراین اگر بتوان به یک استراتژی غیرجراحی مناسب برای مهار آن دست یافت گامی بزرگ در جهت درمان این بیماران برداشته خواهد شد. عوارض متعدد داروهای سنتتیک و شیمیایی ازجمله گسترش مقاومت دارویی باعث شده تا تمایل به سمت مطالعات در زمینه یافتن مواد ضدمیکروبی از منابع دیگر مثل گیاهان افزایش یابد (۱۷). در دندانپزشکی اکثر مطالعات انجام شده بر روی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی حول کنترل بیماری‌های پریودنتال و پوسیدگی دندان می‌چرخد تا جایی که ما

www.SID.ir

اطلاع داریم تاکنون مطالعات کمی درمورد تأثیر عصاره‌های گیاهی روی میکروارگانیسم‌های پریودنتال صورت گرفته که خود عاملی برای انتخاب موضوع این مطالعه بوده است. اسانس دارچین به مقدار یک درصد در پوست گیاه مذکور وجود دارد و قسمت اعظم این اسانس از آلدئید سینامیک تشکیل می‌شود. به علاوه دارای ۴٪ از فنل‌ها، مخصوصاً اوژنول همراه با فلاندرن، سافرول (به مقدار کم)، فوفورول و غیره است (۱۳). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس دارچین اثر ضدباکتریایی علیه پورفیرومونواس ژینژیوالیس دارد و این یافته با بررسی‌های گوناگون دیگر نیز که در آن‌ها اثرات آشکار مطلوب ضد میکروبی دارچین به اثبات رسیده است همخوانی دارد. در مطالعه Chaudhry و Tariq (۱۴) در سال ۲۰۰۶ به بررسی اثر آنتی‌باکتریال روغن دارچین (Cinnamon oil) پرداخته شد که خاصیت آنتی‌باکتریال قوی علیه استرپتوکوک‌ها داشته و مشابه مطالعه ما عمده آن به دلیل وجود ترکیب سینامالدهید در آن بوده است. در مطالعه ما اسانس دارچین در غلظت ۷۵۰mg/ml خاصیت مهارکنندگی باکتری و در غلظت ۱۵۰۰mg/ml خاصیت کشندگی درمورد باکتری پورفیرومونواس ژینژیوالیس داشته است، اما در غلظت‌های پایین‌تر به دلیل وجود ماده مؤثر کمتر، عدم تأثیر آن در مهار رشد باکتری دور از انتظار نیست. البته عللی که می‌تواند باعث تناقض در پاسخ ضدمیکروبی یک عصاره یا اسانس گیاهی در مطالعات مختلف شود، تفاوت میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، تفاوت منبع تهیه گیاه و تفاوت در روش‌های ارزیابی سنجش حساسیت میکروارگانیسم است. شرایط آب و هوایی نیز می‌تواند بر روی ترکیب شیمیایی عصاره یا اسانس یک گیاه مؤثر باشد لذا گیاه یکسانی که از مناطق مختلف جمع‌آوری می‌شود ممکن است خصوصیات متفاوتی را بروز دهد (۱۸). نتایج MIC نشان می‌دهد که اسانس دارچین در غلظت ۷۵۰mg/ml اثر ممانعت از رشد خوبی را علیه پورفیرومونواس ژینژیوالیس دارا می‌باشد. در مطالعه Nagata و همکاران (۱۹) نیز حساس‌ترین باکتری در مقابل عصاره برگ اکالیپتوس، پورفیرومونواس ژینژیوالیس بود و آن‌ها بیان نمودند که این عصاره باعث اختلال در فعالیت پروتئیناز شبه تریپسین در باکتری شد. در مطالعات بسیاری هم نظیر مطالعه Chaudhry و Tariq (۱۴) و مطالعه Zu و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۰ به خاصیت آنتی‌باکتریال روغن دارچین اشاره شده است اما تمامی مطالعات بر روی باکتری‌هایی نظیر E.coli، استرپتوکوک‌ها و پروپیونیوم باکتر صورت گرفته و تاکنون مطالعه‌ای درخصوص اثر آنتی‌باکتریال اسانس دارچین بر روی پورفیرومونواس ژینژیوالیس صورت نگرفته است به همین دلیل مطالعه حاضر، سرآغازی برای استفاده از اسانس دارچین در in vivo به عنوان پروفیلاکسی بیماری پریودنتال و جایگزین درمان آنتی‌بیوتیکی خواهد بود. موضوع دیگری که لازم است مطرح شود این است که باکتری پورفیرومونواس ژینژیوالیس در این مطالعه از یک بیمار مبتلا به پریودنتیت مزمن که بر طبق معیارهای ورود به مطالعه انتخاب شده است، حاصل شده و سوش استاندارد آن نیست زیرا با توجه به شرایط بی‌هوازی و ماهیت بسیار آسیب‌پذیر و حساس، این باکتری قابل نگهداری در مرکز کشت میکروبی کشور نبوده، بنابراین سوش استاندارد برای انجام مطالعه قابل خریداری نبوده است. این درحالی است که باکتری پورفیرومونواس ژینژیوالیس سوش‌های بسیار متنوعی دارد که اگرچه در ساختار و ویژگی‌های کلی مشابهند ولی می‌توانند تفاوت‌های قابل تأملی هم در نتایج آزمایشات نشان دهند. کنترل مثبت در این مطالعه علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در درمان بیماری پریودنتال ناشی پورفیرومونواس ژینژیوالیس (آموکسی‌سیلین و مترونیدازول)، شامل تعدادی آنتی‌بیوتیک دیگر نیز بوده است تا ازنظر میزان حساسیت باکتری به آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد زیرا امروزه به دلیل استفاده بیش از حد، مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک روز به روز در حال افزایش است و این مسئله بشر را به فکر جایگزین کردن عوامل ضدمیکروبی دیگر وادار می‌نماید. مترونیدازول باکتریسیدی است که جهت درمان تمامی انواع فرم‌های بیماری‌های لثه از ژنژیویت گرفته تا ANUG و بیماری‌های پریودنتال مزمن و مهاجم تجویز دارد (۲۱). در مطالعه ما نیز مترونیدازول بیشترین قطر هاله عدم رشد را بین آنتی‌بیوتیک‌ها داشته و قویاً در مهار رشد پورفیرومونواس ژینژیوالیس مؤثر است. آموکسی‌سیلین هم آنتی‌بیوتیکی است که قادر به حذف گرم مثبت همزیست پورفیرومونواس ژینژیوالیس یعنی Strep Intermedius است و نتیجه قابل قبولی از کاهش این باکتری را در مطالعات نشان داده است (۲۱)، در مطالعه ما نیز اثر آنتی‌باکتریال قوی علیه پورفیرومونواس ژینژیوالیس داشته و قطر هاله عدم رشد آن از بالاترین غلظت مورد مطالعه دارچین بیشتر بوده است که نشان دهنده اثر آنتی‌باکتریال قوی‌تر از اسانس دارچین است، بنابراین با توجه به این

www.SID.ir
Archive of SID

یافته پیشنهاد می‌شود جهت جایگزینی این آنتی‌بیوتیک با اسانس دارچین، خاصیت آنتی‌باکتریال غلظت‌های بالاتری از اسانس مورد بررسی قرار گیرد که انتظار می‌رود تفاوت قطر هاله عدم رشد کمتری با آموکسی‌سیلین داشته باشد. سیپروفلوکسازین نیز آنتی‌بیوتیکی از گروه کوینولون‌ها بوده و مانند مترونیدازول از سنتز DNA جلوگیری می‌کند و روی میکروارگانیسم‌های گرم منفی بی‌هوازی اجباری و اختیاری و من‌جمله پورفیروموناس ژینژیوالیس مؤثر می‌باشد (۲۲). در مطالعه Jun و همکاران (۲۳) هم، باکتری پورفیروموناس ژینژیوالیس به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۵۴٪ حساس بوده و در مطالعات Walker و همکاران (۲۴،۲۵)، بهترین پاسخ باکتری پورفیروموناس ژینژیوالیس مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و ترکیب آموکسی- مترو و کلینداماسین بوده، که این یافته‌ها بی‌شباهت به مطالعه ما نیست که در آن سیپروفلوکسازین دارای قطر هاله عدم رشد ۱۶ میلی‌متر و قابل مقایسه با قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰۰mg/ml اسانس دارچین بوده است. در کل نتایج این مطالعه حاکی از آن است که اسانس دارچین اثر آنتی‌میکروبیال قابل قبول بر روی میکروارگانیسم پورفیروموناس ژینژیوالیس حاصل از پاکت عمیق بیمار مبتلا به پریودنتیت دارد. البته مطالعه حاضر اولین و مهم‌ترین مرحله قبل از کاربرد وسیع کلینیکی هر ماده جدیدی است که جهت درمان معرفی می‌شود و نیازمند یکسری کامل آزمایشات ازجمله آزمایشات in vitro شامل ارزیابی سمیت سلولی، خاصیت ضد التهاب، ضدمیکروبی می‌باشد (۲۶). باید اعتراف نمود که این مطالعه فقط نشان دهنده فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاهی علیه مهم‌ترین میکروارگانیسم عامل پریودنتیت مزمن می‌باشد و هنوز راه زیادی در پیش است که بتوان این مواد را جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی آن نمود اما درصورت داشتن نتایج مثبت از سایر آزمایشات مورد لزوم، می‌توان فرمولاسیون مناسبی از این گیاه تهیه نمود تا بتواند مورد استفاده قرار گیرند.

برطبق یافته‌ها، اسانس دارچین در محیط آزمایشگاهی اثر آنتی‌میکروبیال بر روی میکروارگانیسم پورفیروموناس ژینژیوالیس حاصل از بیماران مبتلا به پریودنتایتیس دارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از تمامی همکاران محترم در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پیراپزشکی، آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، بخش پریودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه (شماره طرح: ۸۹۲۹۷۷ و شماره ثبت: ۴۸۵) که با سعه صدر و حوصله فراوان در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند اعلام می‌نماییم.

منابع:

1- Bowen LJ, Oliver RC, Löe H. Periodontal Diseases in the U.S. In 1981: Prevalence, Severity, Extent, and Role in Tooth Mortality. J Periodontol. 1989;60(7):363-70.

2- Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T, Arakawa S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with Porphyromonas gingivalis in younger patients. J Periodontal Res. 2002;37(5):324-32.

3- Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Charatkulangkun O, Promsudthi A, Schifferle RE, Yongvanichit K, et al. Monocyte activation by Porphyromonas gingivalis LPS in aggressive periodontitis with the use of whole-blood cultures. J Dent Res. 2004;83(7):540-5.

4- Japoni A, Vasin A, Noushadi S, Kiany F, Japoni S, Alborzi A. Antibacterial susceptibility patterns of Porphyromonas gingivalis isolated from chronic periodontitis patients. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16(7):e1031-5.

5- Lundström A, Johansson LA, Hamp SE. Effect of combined systemic antimicrobial therapy and mechanical plaque control in patients with advanced Periodontal disease. J Clin Periodontol. 1984;11(5):321-30.

6- Srivastava R, Verma PK, Tandon P, Kumar MR, Gupta KK, Srivastava A. Chlorhexidine chip and tetracycline fibers as adjunct to scaling and root planning- A clinical study. Braz J Oral Sci. 2009;8(4):201-5.

7- Pragati S, Ashok S, Kuldeep S .Recent advances in periodontal drug delivery systems. Int J Drug Deliv. 2009;1:1-14

8- Rudhart A, Purucker P, Kage A, Hopfenmüller W, Bernimoulin JP. Local metronidazole application in maintenance patients. Clinical and microbiological evaluation. J Periodontol. 1998;69(10):1148-54.

9- Ryan ME. Nonsurgical approaches for the treatment of periodontal diseases. Dent Clin North Am. 2005;49(3):611–36.

10- Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. J Periodontol. 2004;75(11):1553-65.

11- Haghighi F,Jjafari S, Beyt Ellahi JM. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an in vitro study. J Hakim. 2003;6(3):71-6.

12- Skidmore-Roth L. Mosby's Handbook of Herbs and

www.SID.ir

Natural Supplements. 4th ed. St Louis, MO: Mosby Inc; 2010.

13- Yano Y, Satomi M, Oikawa H. antimicrobial effect of spices and herbs on Vibrio parahaemoleticus. Int J Food Microbiol. 2006;111(1):6-11.

14- Chaudhry NMA, Tariq P. Anti-microbial activity of Cinnamomum Cassia against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts. Pak J Bot. 2006;38(1):169-74.

15- WHO. WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva WHO. 2002;2:8-10.

16- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. Ann Periondontol. 1999;4(1):1-6.

17- Loesche WJ. Role of anaerobic bacteria in periodontal diseases. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1991;154:43.

18- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. J Agric Food Chem. 2000;48(6):2576-81.

19- Nagata H, Inagaki Y, Yamamoto Y, Maeda K, Kataoka K, Osawa K, et al. Inhibitory effects of macrocarpals on the biological activity of Porphyromonas gingivalis and other periodontopathic bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2006;21(3):159-63.

20- Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. Activities of Ten Essential Oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. Molecules. 2010;15(5):3200-10.

21- Flemming TF،Milian E, Karch H, Klaiber B. Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring Actinobacillus actinomycetemcomitans and/or Porphyromonas gingivalis. J Clin Periodontol. 1998;25(5):380-7.

22- Mariotti A, Monroe PJ. Pharmacologic management of periodontal diseases using systemically administered agents. Dent Clin North Am. 1998;42(2):245-62.

23- Jun KC, Barua PK, Zambon JJ, Neiders ME. Proteolytic activity Black- pigmented bacteroids species. J Endod. 1989;15(10):463-7.

24- Walker CB, Pappas JD, Tyler KZ, Cohen S, Gordon JM. Antibiotic Susceptibilities of Periodontal Bacteria: In Vitro Susceptibilities to Eight Antimicrobial Agents. J Periodontol. 1995; 56(11s):67-74.

25- Walker CB. Selected antimicrobial agents mechanism of action، side effects and drug interation. Periodontol. 2000. 1996;10(1):12-28

26- Cox CF, Bogen G, Kopel HM, Ruby JD. Repair of pulpal injury by dental materials. In: Hargreave KM, Goodis HE, eds. Seltzer and Bender's dental pulp. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc. 2002:325-43.

Archive of SID

www.SID.ir