تأثیر آدامس حاوی کلپوره بر کاهش میزان استرپتوکوک موتانس بزاق

سمیه خرمیان طوسی[۱*]، احمد جعفری[۲]، سید محمود امین مرعشی[۳]، سالومه فرامرزی نیکنام[۴]، ملیحه فرید[۵]

[۱]استادیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

[۲]دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

[۳]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

[۴]دندانپزشک، تهران، ایران

[۵]گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

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

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

Somayeh Khoramian Tusi[1*], Ahmad Jafari[2], Seyed Mahmoud Amin Marashi[3], Salomeh Faramarzi Niknam[4], Malihe Farid[5]

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

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

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

[4]Dentist, Tehran, Iran

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

Received: 10 September 2017; Accepted: 3 September 2017

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

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

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

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

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

***Corresponding Author: DrKhoramian@Abzums.ac.ir**

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

چکیده

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

مواد و روشها: در این کارآزمایی بالینی دوسویه کور، تعداد ۲۰ دانشجوی دندانپزشکی به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول، آدامس حاوی عصاره آبی گیاه کلپوره دریافت نمودند. گروه دوم، آدامس بدون عصاره گیاه کلپوره دریافت نمودند. هر فرد به مدت سه هفته و هر روز سه بار بعد از هر وعده غذایی، آدامسها را به مدت ۲۰ دقیقه استفاده کردند. نمونه بزاق غیرتحریکی افراد در شروع آزمایش و قبل از مصرف آدامسها و یک روز پس از مصرف آدامس نهایی و اتمام دوره جمع آوری شد. برای تعیین میزان باکتری از روش qPCR استفاده شد. مقایسه میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس بین گروهها با استفاده از آزمون T و نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت.(α =۰/۰۵)

---

* مولف مسؤول، نشانی: کرج، گلشهر، میدان کتویی زاده، دانشکده دندانپزشکی البرز، تلفن: ۳۳۵۳۱۶۱۴-۰۲۳

E-mail: DrKhoramian@Abzums.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها: دو گروه مورد بررسی از نظر تعداد کلونیهای استرپتوکوک موتانس قبل از مصرف آدامس اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵). مصرف آدامس حاوی کلپوره در مقایسه با آدامس دارونما به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد کلونیهای استرپتوکوک موتانس گردید (P=۰/۰۰۲).

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

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

مقدمه

از آن‌جایی‌که گونه‌های پاتوژن استرپتوکوکها همانند استرپتوکوک موتانس مسبب ایجاد پوسیدگی در دهان بوده و در نهایت باعث تحمیل هزینه‌های درمانی و یا از دست رفتن دندانها می شوند، لذا یافتن موادی که توانایی حذف و یا به حداقل رساندن این گونه‌های میکروبی را داشته باشد، از هر نظر اهمیت خاصی می‌یابد. در سالهای اخیر استفاده از داروهای گیاهی و گیاهان دارویی بر اساس دانش بومی طب سنتی در جلوگیری و درمان بیماریها شتاب بیشتری به خود گرفته است. علم دندانپزشکی نیز همگام با سایر تخصصهای علوم‌پزشکی روز به روز بر میزان استفاده از داروهای گیاهی و طب سنتی در بهداشت دهان و دندان می‌افزاید. استفاده از دهانشویه، خمیردندان و آدامسهای حاوی عصاره‌های گیاهی از جمله این موارد است. گیاه کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* از تیره نعناع است که جزء گیاهان خوشبو و معطر می‌باشد و حاوی مقادیری تانن، ترپنوئید، ساپونین، فلاونوئید، گلیکوزید-آلفا، استرول، لوکوآنتوسیانین، بتاکاریوفیلن، همولن، کاریوفیلن اکساید، دی ترپنوئید، آسپاراژین و دیترین است که برخی از این ترکیبات اثرات ضدالتهابی دارند.[۱] گیاه کلپوره از جمله گیاهان دارویی طب سنتی است که برای درمان التهاب، روماتیسم و زخم مورد استفاده قرار می‌گیرد. تاکنون تنها یک مطالعه در زمینه استفاده از این گیاه در حیطه دندانپزشکی و به عنوان دهانشویه انجام شده است.[۲] استفاده از آدامس در جامعه رایجتر و پرطرفدارتر از استفاده از دهانشویه می باشد. به علاوه، نتایج تعدادی از تحقیقات، جویدن آدامس فاقد قند مضر را، در کاهش تجمع پلاک دندانی، کاهش تعداد استرپتوکوک موتانس بزاق و پلاک، افزایش ترشح بزاق و کاهش پوسیدگی موثر نشان داده است.[۳و۴] با توجه به اینکه اثر گیاه دارویی کلپوره در قالب آدامس مصرفی بر بهداشت دهان و دندان مورد ارزیابی قرار نگرفته است؛ لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر آدامس حاوی عصاره آبی کلپوره بر تعداد استرپتوکوک موتانس بزاق انجام شد.

مواد و روشها

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

www.SID.ir

دیونیزه (زلال طب شیمی، تهران، ایران) به خوبی شسته شده و در محل مناسب دور از نور، خشک گردیدند. نمونه خشک شده با آسیاب برقی آسیاب شده و از الک با مش ۳۲ عبور داده شد. ۲۵۰ گرم از پودر حاصله به مدت ٤٨ ساعت در دو لیتر آب خیسانده شده و سپس با پمپ خلاء و کاغذ صافی واتمن صاف گردیدند. عصاره حاصله با روش تقطیر در خلاء به وسیله دستگاه روتاری در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد تغلیظ شدند. عصاره تغلیظ شده توسط آون در دمای ٤٢ درجه سانتیگراد به مدت سه روز خشک گردیدند. عصاره خشک شده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۲- درجه سانتیگراد در فریزر نگهداری شدند. پس از تهیه عصاره، به شرکت مینو تحویل داده شد تا وارد آدامس گردد. ترکیبات آدامس تهیه شده شامل مواد زیر بود:

مواد	درصد
بیس (solsonat)	٣٦/٦٦
سوربیتول	٤١/٦٩
زایلیتول	٤
شربت مانیتول	۷
پودر مانیتول	۲
اسانس پودر پرمینت	۰/٦٦
اسانس پرمینت	۱/۸
سولفام کا	۰/١٤
سوکرالوز	۰/۰٦
ICE	۰/۰۵
کلپوره	۱۰٪ (جایگزین 10% از کلپوره)

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

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

نمونه بزاق غیرتحریکی افراد در شروع آزمایش، قبل از مصرف آدامسها و یک روز پس از مصرف آدامس نهایی و اتمام دوره جمع آوری شد. نمونه ها جهت تعیین تعداد کلونیهای استرپتوکوک موتانس به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه البرز ارسال شد. بزاق غیرتحریکی دهان به روش Spitting جمع‌آوری شد. از بیمار خواسته شد که یک دقیقه بزاق را در دهان جمع کرده و سپس در لوله مدرج فالکون استریل بریزد.[۵] در طول دوره آزمایش، از افراد خواسته شد که رعایت بهداشت دهان و دندان متداول روزانه خود را تغییر ندهند و در روز دوبار با خمیر دندان Crest و مسواک Oral B توسط محقق در اختیار افراد قرار داده شده بود، مسواک بزنند. جهت تهیه نمونه‌های بزاق از داوطلبان خواسته شد که یک ساعت پیش از نمونه‌گیری، غذا و نوشیدنی مصرف نکنند. بزاق کامل غیرتحریکی در ساعت ۹ صبح به اندازه ۱/۵ میلی‌لیتر در لوله آزمایش جمع‌آوری شد.[٦]

در این تحقیق، سوش استاندارد باکتری استرپتوکوکوس موتانس (PTCC1683) از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفلیزه تهیه گردید.

www.SID.ir

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

gtf-f 5`-CCCCATCGATAGACTGTTGTTTGGTTG-3`
gtf-r 5`-CCCCTCTAGACCATTAGGAACCTCCAA-3`
5'-SAM-TACTGACTTGTACTATTCTAGCATGC-TAMRA-3'

پس از کشت باکتری استاندارد در محیط بلاد آگار همراه در جار CO_2 **دار و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کلونی باکتری پس از ٤۸ ساعت پدیدار گردید. برای انجام کار، ژنوم باکتری استاندارد توسط تکنیک جوشاندن استخراج گردید.**

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

استخراج Total DNA از بزاق: استخراج DNA باکتری *Streptococcus mutans* ATCC 25175 **با استفاده از کیت** DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat. No. 69504) **و انجام پروتکل آن صورت گرفت. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه DNA کل استخراج شده، در روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید.**

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

پس از استخراج DNA سویه استاندارد استرپتوکوک موتانس با استفاده از کیت DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat. No. 69504)**، رقتهای** 10^{2} **و** 10^{4} **و** 10^{6} **و** 10^{8} **و** 10^{10} **۱۰ جهت رسم منحنی استاندارد تهیه گردید. همچنین DNA نمونه‌های بزاق با استفاده از کیت فوق استخراج شده و در واکنش** Real-Time PCR **به عنوان الگو مورد استفاده قرار داده شد. هر نمونه به صورت سه تایی (triplex) مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتکل انجام** Real-Time PCR **بدین صورت بود که دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه برای فعال شدن آنزیم پلیمراز، چهل و پنج سیکل برای تکثیر DNA هدف با دمای ذوب ۹٤ درجه برای جدا شدن رشته‌های DNA و دمای** Annealing **٦۰ درجه و دمای ۷۲ درجه برای تکثیر DNA هدف صورت گرفت. واکنش فوق با ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج شده و ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمر اختصاصی و پروب صورت گرفت.** Real-Time PCR **بوسیله دستگاه** ABI (appaied biosystem) **و منحنی ذوب آن بوسیله دستگاه رسم و واکنش مورد تأیید مضاعف قرار گرفت. پس از دریافت نتایج** C_T **از هر**

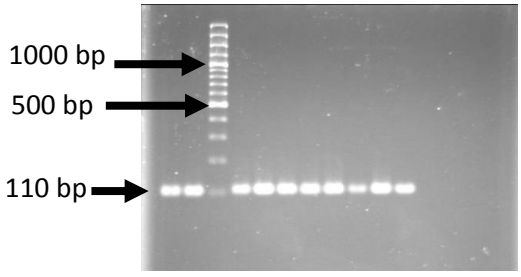
www.SID.ir

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

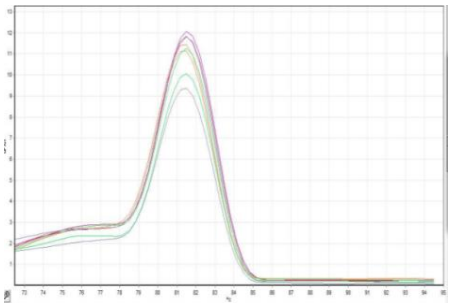
در این مطالعه به منظور تحلیل داده‌ها از آزمونهای تی، من ویتنی و آزمون دقیق فیشر استفاده شد. محاسبات با نرم افزار SPSS Ver.21 انجام گرفت. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

تصویر ۱ و ۲، باند تکثیر یافته مربوط به ژن *gtf B* و منحنی ذوب مربوط به این ژن را نشان می دهد. تعداد شرکت کننده‌ها در هر گروه، ۱۰ نفر بود. با استفاده از آزمون دقیق فیشر جنس بین دو گروه مداخله و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (P=1). در گروه مداخله، میانگین سن ۱/۸±۲۶ سال و در گروه شاهد، میانگین سن ۲/۱۳±۲۵/۱ سال بود. با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنف مقادیر سن در دو گروه مورد و شاهد توزیع نرمال نداشت(P<0.05). آزمون من‌ویتنی اختلاف معنی‌داری بین سن در دو گروه نشان نمی داد (P=۰/۱۹). با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنف مقادیر کلونیزاسیون استرپتوکوک موتانس در قبل و بعد مداخله در دو گروه مورد و شاهد توزیع نرمال داشت (P>0.05). و آزمون تی اختلاف معنی‌داری بین مقادیر استرپتوکوک موتانس قبل از مداخله بین دو گروه نشان نمی‌داد (P=۰/۵)



تصویر ۱. باند تکثیر یافته مربوط به ژن *gtf B*



تصویر ۲. منحنی ذوب مربوط به ژن *gtf B*

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

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

www.SID.ir

استرپتوکوک موتانس قبل و بعد از مداخله در گروه مداخله ٤٤٠٧٢/٣ و در گروه شاهد ٣٢٦٩٦/٦ بود که از نظر آماری با آزمون تی‌تست تفاوت معنی‌داری در مورد این متغیر در دو گروه مداخله و شاهد دیده شد و این تفاوت در گروه مداخله بیشتر بود p=o.oo4 t=3.351 (جدول ۱).

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

زمان	مداخله	شاهد	نتیجه آزمون t مستقل
قبل از کارآزمایی	٦٤٨٢٣/٣±١٤٤٩٦/٤	٦٩٦١٥/٣±١٦٦٥٥	t= ۰/٦٨٦ p=۰/۵۰۱
بعد از کارآزمایی	٢٠٧٥١±٧٥٥٣/٧٢	٣٦٩١٨/٦±١٢٣٧٠/٥	t=٣/٥٢٧ p=۰/۰۰٢
اختلاف	٤٤٠٧٢/٣(٨٧٩٣/٣)	٣٢٦٩٦/٦ (٦١٥٨/٨)	t=٣/٣٥١ p= ۰/۰۰٤
نتیجه آزمون t زوجی	t=١٥/٨٤ p<۰/۰۰١	t=١٦/٧٨ p<۰/۰۰١	

بحث

با تغییر نگرش در درمانهای دندانپزشکی، بخش قابل توجهی از تحقیقات، معطوف به بررسی تاثیر مواد مختلف جهت پیشگیری از پوسیدگی دندان در مرحله اولیه گردیده است. از آنجا که استرپتوکوک موتانس، باکتری موثر بر آغاز روند دمینرالیزاسیون مینا و شروع روند پوسیدگی می باشد، لذا استفاده از راه حل مناسب، جهت کنترل یا حذف این باکتری می‌تواند باعث جلوگیری از ایجاد پوسیدگی شود.[٦] از آنجا که مطالعات کلینیکی، به عنوان استاندارد طلایی تلقی می‌شوند، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرآدامس کلپوره بر استرپتوکوک موتانس بزاق به صورت کلینیکی انجام گردید.

در این مطالعه با توجه به تاثیر پوسیدگی بر تعداد باکتریهای بزاق از جمله استرپتوکوک موتانس، کلیه نمونه‌ها از نظر پوسیدگی تحت معاینه کلینیکی قرار گرفتند و افراد دارای پوسیدگی فعال از مطالعه حذف شدند. ضمناً با همسان سازی برنامه های بهداشتی، سعی گردید متغیرهای مداخله گر تا حد امکان حذف گردد که این شیوه آماده‌سازی نمونه‌ها، با مطالعات امامیه و همکاران [٦] و نیز Caglar و همکاران[٨] و مطابقت داشت.

در این مطالعه، از افراد خواسته شد که به مدت سه هفته و هر روز سه بار بعد از هر وعده غذایی، آدامسها را به مدت ۲۰ دقیقه بجوند که مشابه مطالعات امامیه و همکاران[٦] و نیز کرمی نوگورانی و همکاران[٩] بود. بر طبق برخی از مطالعات[١١و١٠]، جویدن آدامس به مدت ۲۰ دقیقه، میزان ترشح بزاق را سه برابر افزایش می دهد.

در این مطالعه، جهت تعیین میزان استرپتوکوک موتانس بزاق از روش qPCR استفاده شد که روش بسیار دقیقی می‌باشد. در صورتی که در تعدادی از مطالعات[٦و٢] از روش کشت میکروبی و شمارش با میکروسکوپ استفاده شد.

www.SID.ir

تکنیکهای مولکولی دارای این مزیت می‌باشند که میانگین قابل اعتمادتری از تعداد باکتریها را فراهم می کنند. روشهای کشت برای شمارش باکتریها دارای حساسیت کافی نیست، چون باکتریها تنها در شرایطی کشت می‌شوند که نیازهای فیزیولوژیکی و متابولیکی آنها در شرایط invitro کاملا تامین شده باشد. به عنوان مثال باکتری استرپتوکوکوس موتانس بر روی یکی از چندین محیط کشت انتخابی رشد می کند که ممکن است این محیط اثر بازدارندگی بر روی رشد باکتری داشته باشد. همچنین این تکنیک زمان‌بر است و ممکن است در مکانهایی که جامعه میکروبی متشکل از کمپلکس پیچیده‌ای از باکتریهاست (مانند زیستگاههای میکروبی در حفره دهانی) نتایج شمارش باکتریها با روشهای معمول کشت نتایج نادرستی را تولید نماید. شمارش سریع باکتریها با انواع روشهای مولکولی امکانپذیر است. اغلب روشها از چندین جفت پرایمر برای تشخیص باکتری مورد نظر استفاده می‌نمایند اما روش Real time با آزاد کردن رنگ فلورسانس در طول هر مرحله از تکثیر PCR، باعث شناسایی سریع و کمیت سنجی DNA بدون نیاز به انجام مراحل post-PCR مانند هیبریداسیون رادیواکتیو می‌شود[۱۲] Chen و همکاران[۱۳] ارتباط باکتری استرپتوکوک موتانس را با پوسیدگیهای دندانی توسط Real time PCR بررسی کردند و این تست را در مقایسه با روشهای معمول کشت باکتری روشی دقیقتر و حساستر دانستند. Yano و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ مزایای فراوانی برای روش real-time PCR نسبت به کشت میکروبی بیان کردند. آنها بیان نمودند این روش می‌تواند به راحتی میزان استرپتوکوک موتانس و سوبرینوس را به صورت جداگانه تعیین نماید. همچنین برای تعیین میزان میکروارگانیسمهای محیط کشت، میکروارگانیسمها باید زنده و قابل‌کشت باشند در صورتی که PCR، DNA میکروارگانیسمها را مشخص می کند و نیازی به زنده بودن آنها نیست. این تفاوت در نمونه‌هایی که قبل از شمارش، منجمد شده‌اند و به مدت طولانی نگهداری شده اند اهمیت دارد.[۱۴]

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

یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که آدامس کلپوره در مقایسه با آدامس دارونما باعث کاهش میزان استرپتوکوک موتانس بزاق می‌شود. در مطالعه خرمیان طوسی و همکاران[۲] نیز، کاهش میزان استرپتوکوک موتانس بزاق پس از مصرف دهانشویه کلپوره مشاهده گردید. تشخیص مکانیسم اثر آدامس کلپوره بر استرپتوکوک موتانس نیاز به مطالعات گسترده‌ای دارد. شاید بتوان علت کاهش استرپتوکوک موتانس را ترکیبات فنلی موجود در کلپوره دانست. Bravo [۱۲] مشاهده نمود که باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در برابر ترکیبات فنولیک حساس هستند. ترکیبات فنلی در بسیاری از گیاهان وجود دارد و اثر ضدمیکروبی آنها بستگی به محل و تعداد گروههای هیدروکسیل روی حلقه فنلی دارد و ادعا شده است که ارتباط مستقیمی بین تعداد گروههای هیدروکسیل و سمیت آنها روی میکروارگانیسمها موجود است. همچنین ادعا شده که اثر ضدمیکروبی این ترکیبات، مهار آنزیمی از طریق واکنش با گروههای سولفیدریل یا واکنشهای غیراختصاصی با پروتئینهای میکروبی است. یکی از خواص مطلوب ترکیبات فنلی،

www.SID.ir

Archive of SID

تحریک ترشح بزاق می‌باشد که از این طریق نیز می‌تواند به کاهش پوسیدگی دندان کمک کند. یکی دیگر از ترکیبات ضدمیکروبی موجود در کلپوره، تاننها می‌باشند. تاننها گروهی از ترکیبات فنلی هستند که اثر ضدمیکروبی وسیعی دارند. اثر ضدمیکروبی این ترکیبات را مربوط به مهار قدرت چسبندگی میکروبها و همچنین مهار فعالیت آنزیمی می‌دانند.[۱۶]

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

بر خلاف مطالعه حاضر، برخی مطالعات اثر ضدباکتریایی ضعیفی برای گیاه کلپوره گزارش کرده‌اند. در مطالعه مصدق و همکاران[۱۵]، اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاه کلپوره بر باکتریهای استافیلوکوک، میکروکوکوس لوتئوس و اشرشیاکلی ضعیف بود. همچنین Oganesyan و همکاران[۱۶] گزارش کردند که خاصیت ضد استافیلوکوکی گیاه کلپوره ضعیف می‌باشد. اختلاف در گزارشها احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع باکتری مورد مطالعه می‌باشد و جای آن دارد که در بررسیهای آتی، ماده یا مواد مؤثره گیاه بر هر باکتری شناسایی شود.

در مطالعه حاضر، میزان استرپتوکوک موتانس در گروه شاهد نیز پس از مصرف آدامس دارونما کاهش یافت؛ گرچه این کاهش کمتر از گروه مورد بود. می توان علت کاهش در گروه شاهد را تاثیرات مکانیکال جویدن آدامس در کاهش پلاک میکروبی و افزایش ترشح بزاق و وجود زایلیتول دانست.

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

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

www.SID.ir

منابع

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

www.SID.ir

15. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 1998; 56(11):317-33.

16. Sharafatichaleshtori R, Sharafatichaleshtori F, Rafeiankoopaee M, Daris F, Ashrafi K. Comparison of the antimicrobial effects ethanolic essence of leaf Iranian jipijapa chlorhexidine mouth washes in the Streptococcus mutans and streptococcus sanguis. J Islamic Dent Assoc 2010; 22(4):211-7. (Persian)

17. Autore G, Capasso F, De Fusco R, Fasulo MP, Lembo M, Mascolo N, et al. Antipyretic and antibacterial actions of Teucriumpolium (L.). Pharmacol Res Commun 1984; 16(1):21-9.

18. Mosadegh M, Dehmoubed SA, Nasiri P, Esmaeili S, Naghibi F. The study of phytochemical, antifungal and antibacterial effects of Teucrium polium and Cichouriumintybus. J Kurdistan Univ Med Sci 2002; 7(5):1-4. (Persian)

19. Oganesyan GB, Galstyan AM, Mnatsakanyan VA, Shashkov AS, Agababyan PV. Phenylpropanoid glycosides of teucrium polium. Chem Nat Compd 1991; 27(5):556-9.

www.SID.ir