

بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم دهان شویه های گیاهی، دارای فلوراید و بدون فلوراید بر

استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس: یک مطالعه در شرایط آزمایشگاهی

دکتر راحله شیخی^{۱*}، دکتر آریان رستمی پریزاد^۲، دکتر حسن تدبیری^۳، دکتر میثم حسن نژاد بی بالان^۴

۱-استادیار، گروه میکروب شناسی، ویروس شناسی و توکسین های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

۲-دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، واحد پردیس دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

۳-استادیار، گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

۴-دانشیار، گروه میکروب شناسی، ویروس شناسی و توکسین های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۷/۲۰

اصلاح نهایی: ۱۴۰۲/۵/۱۸

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۰

Evaluation of Antibacterial and Anti-biofilm Activity of Herbal, with and without Fluoride Mouthwashes on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*: An In Vitro Study

Raheleh Sheikhi^{1*}, Ariyan Rostami Parizad², Hasan Tadbiri³, Meysam Hasannejad-Bibalan⁴

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Microbial Toxins, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

2- Dentist, School of Dentistry, Pardis Branch of Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Dental Prosthesis, School of Dentistry, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

4- Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Microbial Toxins, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Received: May 2023 ; Accepted: Oct 2023

Abstract

Background and Aim: Mouthwashes play an important role in oral hygiene and prevention of tooth decay by reducing the proliferation of oral microbial flora. The purpose of this study was to investigate the antibacterial and anti-biofilm activity of Persica herbal mouthwash, Mouthwashes with fluoride (Misswake), without fluoride (Irsha) and chlorhexidine 0.2% against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*, in vitro.

Materials and Methods: To evaluate the antibacterial effect of mouthwashes on two standard strains of *S. mutans* and *S. sanguinis*, were used well diffusion and microbroth dilution methods and to examine their anti-biofilm effects, the microtiter plate method was used. The results were analyzed using SPSS software, version 21 and t-test.

Results: In the well diffusion method, Misswake and 0.2% chlorhexidine mouthwashes had an inhibition zone at concentrations of 500 mg/ml and 500 mg/ml to 125 mg/ml, respectively. The MIC of Persica and Misswake mouthwashes were determined at concentration of 500 mg/ml and chlorhexidine 0.2% at concentration of 31.25 mg/ml. Irsha mouthwash did not have any antibacterial effect. In microtiter plate method, anti-biofilm activity was observed only for 0.2% chlorhexidine mouthwash at concentrations of 125 mg/ml to 31.25 mg/ml. Persica, Misswake and Irsha mouthwashes did not have any anti-biofilm effects on the studied bacteria. The results showed that 0.2% chlorhexidine had a significant antimicrobial and anti-biofilm effects on the studied bacteria compared to other mouthwashes ($P < 0.05$).

Conclusion: 0.2% chlorhexidine mouthwash has a very high antimicrobial power than other mouthwashes, but our study suggests that Persica and Misswake mouthwashes can be used as a mouthwash with proper antiseptic properties.

Keywords: Mouthwash, Biofilm, Fluoride, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*

*Corresponding Author: sheikhirahele@gmail.com

J Res Dent Sci. 2024; 21(1): 8-16

خلاصه:

سابقه و هدف: دهانشویه ها با کاهش تکثیر فلور میکروبی دهان نقش مهمی در بهداشت دهان و پیشگیری از پوسیدگی دندان دارند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم دهان شویه گیاهی پرسیکا، دهانشویه های دارای فلوراید (میسواک)، بدون فلوراید (ایرشا) و کلرهگزیدین ۰/۲٪ بر استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش ها: جهت بررسی اثر ضد باکتریایی دهانشویه ها بر روی دو سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس از روش های چاهک پلیت و میکروبراث دایلوژن و جهت بررسی اثر ضد بیوفیلم آنها از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS با ویرایش ۲۱ و آزمون تی تست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها: در روش چاهک پلیت، دهانشویه های میسواک و کلرهگزیدین ۰/۲٪ به ترتیب دارای هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ mg/ml و ۵۰۰ mg/ml تا ۱۲۵ mg/ml بودند. MIC دهانشویه های پرسیکا و میسواک در غلظت ۵۰۰ mg/ml و کلرهگزیدین ۰/۲٪ در غلظت ۳۱/۲۵ mg/ml تعیین شدند. دهانشویه ایرشا فاقد هرگونه اثر ضد باکتریایی بود. در روش میکروتیتر پلیت، اثر ضد بیوفیلم فقط در مورد دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ در غلظت های ۱۲۵ mg/ml تا ۳۱/۲۵ mg/ml مشاهده شد. دهانشویه های پرسیکا، ایرشا و میسواک فاقد هرگونه اثر ضد بیوفیلم بر باکتری های مورد مطالعه بودند. نتایج نشان داد که کلرهگزیدین ۰/۲٪ در مقایسه با سایر دهانشویه ها بطور معناداری اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلم بر باکتری های مورد مطالعه داشته است. ($P < 0/05$)

نتیجه گیری: دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ نسبت به سایر دهانشویه ها قدرت ضد میکروبی بسیار بالایی دارد ولی مطالعه ما پیشنهاد میکند که دهانشویه های پرسیکا و میسواک می توانند بعنوان یک دهانشویه با خاصیت ضد عفونی کنندگی مناسب مورد استفاده قرار بگیرند.

کلید واژه ها: دهانشویه، بیوفیلم، فلوراید، استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس

مقدمه:

روش های موثر بهبود بهداشت دهان و دندان و کنترل تشکیل پلاک در دهان استفاده از محلول های ضد عفونی کننده به عنوان دهانشویه است. دهانشویه ها با کاهش فلور میکروبی دهان، بعنوان عوامل ضد التهاب و ضد پلاک موثر هستند^(۶). با توجه به استفاده گسترده از دهانشویه ها در زمینه های مختلف دندانپزشکی، امروزه از دهانشویه های متنوعی استفاده می شود. در بین دهانشویه ها، کلرهگزیدین به عنوان استاندارد طلایی بیشتر از سایر دهانشویه ها مورد استفاده قرار می گیرد. اما اثرات نامطلوب متعددی دارد که اغلب برای بیماران ناخوشایند است، مانند طعم ناخوشایند، ایجاد رنگدانه های دندان، تحریک مخاط، آلرژی، اثرات نامطلوب بر روی جنین، اثرات سیتوتوکسیک و اثرات منفی سیستمیک در صورت بلع و غیره. بنابراین همواره تمایل به استفاده از دهانشویه هایی وجود دارد که از نظر اثرات ضد میکروبی با کلرهگزیدین برابری داشته و در عین حال اثرات نامطلوب کمتری نسبت به آن داشته باشند^(۸،۷،۲)

یکی از قوی ترین عواملی که در ۵۰ سال اخیر در کنترل و پیشگیری از پوسیدگی دندان موثر بوده است، فلوراید است.

پوسیدگی دندان و بیماری پریودنتال دو بیماری عمده دهانی در جهان می باشند که هر دو توسط باکتری های مختلف در حفره دهان ایجاد می شوند. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، پوسیدگی دندان، اگرچه در بسیاری از جوامع توسعه یافته روند رو به کاهشی را نشان می دهد، اما همچنان بعنوان یک معضل مهم بهداشتی در بسیاری از کشورهای در حال توسعه است.^(۲،۱) پلاک دندانی لایه ای از میکروارگانیسم های روی سطح دندان است که نقش مهمی در ایجاد پوسیدگی و بیماری های پریودنتال ایفا می کند. به خوبی شناخته شده است که استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس بعنوان فلور باکتریایی دهانی و سایر باکتری های هم خانواده آنها از عوامل اصلی پوسیدگی دندان هستند.^(۴،۳) اعتقاد بر این است که توانایی متابولیزه کردن کربوهیدرات ها، چسبیدن و تشکیل بیوفیلم های قوی بر روی سطوح دندان با بروز پوسیدگی دندان توسط این پاتوژن ها مرتبط است. از اینرو کاربرد عوامل ضد میکروبی و ضد پلاک علیه این پاتوژن های دهانی، می تواند نقش مهمی برای پیشگیری از پوسیدگی دندان و بیماری های پریودنتال ایفا کند^(۵،۳). یکی از

فلوراید، آنزیم های گلیکولیتیک را مهار کرده و در متابولیسم و تکثیر باکتری های ایجاد کننده پوسیدگی دندان اختلال ایجاد میکند. بنابراین دهانشویه های حاوی فلوراید بعنوان یک مکمل موثر در پاکسازی دهان و دندان محسوب می شوند. (۹-۱۱)

دهانشویه های گیاهی بدلیل داشتن ترکیبات آلی، تناسب با فیزیولوژی بدن و سمیت کمتر نسبت به دهانشویه های شیمیایی نظیر کلرهگزیدین ارجحیت دارند. دهانشویه گیاهی پرسیکا حاوی مواد موثره درخت مسواک (*Salvadora persica*)، نعناع و بومادران است. برخلاف دهان شویه های شیمیایی، دهانشویه پرسیکا قابل بلع است و استفاده از آن در کودکان و زنان باردار مجاز می باشد. *Salvadora persica* یک منبع غنی از فلوراید، ایزوتیوسیانات و کلرید است. ایزوتیوسیانات در تماس با بزاق، سیانید آزاد می کند که می تواند از رشد باکتری ها در دهان جلوگیری کند. با این حال، نتایج حاصل از اثر ضد باکتریایی این دهانشویه بر روی برخی از باکتری های عامل پوسیدگی دندان مانند استرپتوکوکوس موتانس بحث برانگیز است. (۱۲، ۱۳) از آنجائیکه اطلاعات در خصوص اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلم دهانشویه های پرسیکا، دارای فلوراید، بدون فلوراید در مقایسه با کلرهگزیدین ۰/۲٪ بر استرپتوکوک های کاربونیکی اندک می باشد، از اینرو هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم دهان شویه گیاهی پرسیکا، دهانشویه های دارای فلوراید، بدون فلوراید و کلرهگزیدین ۰/۲٪ بر استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگونیسیس؛ در شرایط آزمایشگاهی، به جهت معرفی یک جایگزین مناسب برای دهانشویه کلرهگزیدین بود.

مواد و روش ها

این مطالعه آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.GUMS.REC.1400.287 در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان به ثبت رسیده و در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام شده است.

باکتریهای مورد آزمایش: سویه های استاندارد باکتری های مورد استفاده در مطالعه شامل *Streptococcus mutans* با شماره ATCC 35668 و *Streptococcus sanguinis* با شماره ATCC 10556 به صورت لیوفیلیزه از مرکز میکروارگانیسم های صنعتی ایران خریداری شدند. سویه های باکتریایی لیوفیلیزه در محیط آبگوشت عصاره مغز قلب (Merck, Germany) در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت و سپس بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Merck, Germany) حاوی ۵ درصد خون گوسفند در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. هر یک از سویه ها در محیط آبگوشت تریپتیک سوی برات (Merck, Germany) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد بمنظور آزمایش های بعدی نگهداری شدند.

دهانشویه های مورد مطالعه: الف) دهانشویه گیاهی پرسیکا حاوی عصاره گیاهان مسواک، نعناع و بومادران (لابراتوار داروسازی پورسینا، ایران) ب) دهانشویه بدون فلوراید ایرشا (لابراتوار داروسازی شفا، ایران) ج) دهانشویه کامل میسواک حاوی سدیم فلوراید (۱۰۰۰ ppm) (شرکت کندر، ایران) د) دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ (شرکت داروسازی ایران ناژو، ایران)

در این مطالعه از پنج غلظت مختلف هر یک از دهانشویه ها استفاده گردید (۵۰۰ mg/ml، ۲۵۰ mg/ml، ۱۲۵ mg/ml، ۶۲.۵ mg/ml و ۳۱.۲۵ mg/ml). ابتدا یک غلظت اولیه از هر دهانشویه (۱۰۰۰ mg/ml) تهیه شد و سپس غلظت های بعدی با رقیق سازی به نسبت ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۳۲/۱ و ... تهیه گردیدند (۱۳).

تعیین اثر ضد باکتریایی دهانشویه ها با روش چاهک پلیت و میکروبراث دایلوژن: برای این منظور سه تا چهار کلنی هم شکل از هر باکتری کشت داده شده بر روی محیط کشت آگار خوندار (Merck, Germany) را به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل وارد کرده تا سوسپانسیونی معادل کدورت نیم مک فارلند (1.5×10^8) واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر (CFU/mL) تهیه گردد. ۰/۱ میلی لیتر از هر سوسپانسیون

تهیه شده بطور یکنواخت در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) حاوی ۵ درصد خون گوسفند کشت داده شد. پس از جذب رطوبت پلیت ها، با استفاده از پیپت پاستور استریل چاهک هایی به قطر شش میلیمتر به فاصله ۲۰ میلی متر از لبه پلیت و ۲۵ میلی متر از یکدیگر بر روی سطح هر پلیت بر اساس تعداد رقت های سریالی مربوط به هر دهانشویه ایجاد شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از هر دهان شویه در غلظت های سریالی به چاهک های تعبیه شده اضافه شد و از سرم فیزیولوژی استریل بعنوان کنترل منفی استفاده شد. در انتها پلیت ها در جار شمع دار و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، نتایج بر اساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد گزارش شدند. حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) توسط میکروبراث دایلوژن به روش رقیق سازی و بر طبق استاندارد (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute) سنجیده شد^(۱۴) بطور خلاصه، در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه (Nest 96well Microplate, China)، رقیق سازی از هر دهانشویه به حجم ۱۰۰ میکرولیتر انجام شد. سپس ۳ تا ۴ کلنی از کشت ۲۴ ساعته هر یک از باکتری های مورد مطالعه به لوله های حاوی سرم فیزیولوژی استریل، جهت تهیه سوسپانسیون معادل کدورت نیم مک فارلند، وارد شد. سپس سوسپانسیون نیم مک فارلند مربوط به هر باکتری، مجدداً ۱ به ۱۰۰ رقیق شد و به مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده به هر چاهک اضافه گردید. سپس به هر کدام از چاهک ها ۱۰ میکرولیتر گلوکز ۲ درصد اضافه شد. بعنوان کنترل منفی، بجای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر استریل استفاده شد. کنترل مثبت، چاهک حاوی باکتری مورد مطالعه به همراه محیط کشت و گلوکز ۲ درصد بود. سپس پلیت ها در جار شمع دار و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، محتویات پلیت ها به آرامی تخلیه و چاهک ها سه بار با آب مقطر شستشو شدند. برای رنگ آمیزی به میزان ۱۲۵ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد به هر کدام از چاهک ها اضافه شد. پس از به مدت ۱۵ دقیقه، رنگ تخلیه و چاهک ها سه بار با آب مقطر شستشو و در دمای آزمایشگاه به خوبی خشک شدند. سپس ۱۲۵ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۰ درصد به عنوان حلال به هر چاهک اضافه گردید. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات هر پلیت به یک پلیت جدید منتقل شده و جذب نوری (Optical Density OD) چاهک ها توسط دستگاه الیزا ریدر (BIOTEK ELX808, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

نکرده بود بعنوان MIC در نظر گرفته شد. آزمایشات برای هر دهانشویه سه بار تکرار و نتایج مشاهده و ثبت گردیدند. تعیین اثر ضد بیوفیلم دهانشویه ها با روش میکروتیتر پلیت: ارزیابی اثر ضد بیوفیلم دهانشویه ها بر اساس مطالعه Kirmusaoğlu و همکاران با برخی تغییرات انجام شد^(۱۵). بررسی اثر ضد بیوفیلم در مورد دهانشویه هایی انجام شد که در یک رقت مشخص، دارای اثر مهار رشد بر باکتری های مورد مطالعه داشتند. برای این منظور، رقت های مختلف مربوط به دهانشویه های مربوطه به حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد و در چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. ۳ تا ۴ کلنی از کشت ۲۴ ساعته هر یک از باکتری های مورد مطالعه به لوله های حاوی سرم فیزیولوژی استریل، جهت تهیه سوسپانسیون معادل کدورت نیم مک فارلند، وارد شد. سپس سوسپانسیون نیم مک فارلند مربوط به هر باکتری، مجدداً ۱ به ۱۰۰ رقیق شد و به مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده به هر چاهک اضافه گردید. سپس به هر کدام از چاهک ها ۱۰ میکرولیتر گلوکز ۲ درصد اضافه شد. بعنوان کنترل منفی، بجای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر استریل استفاده شد. کنترل مثبت، چاهک حاوی باکتری مورد مطالعه به همراه محیط کشت و گلوکز ۲ درصد بود. سپس پلیت ها در جار شمع دار و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، محتویات پلیت ها به آرامی تخلیه و چاهک ها سه بار با آب مقطر شستشو شدند. برای رنگ آمیزی به میزان ۱۲۵ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد به هر کدام از چاهک ها اضافه شد. پس از به مدت ۱۵ دقیقه، رنگ تخلیه و چاهک ها سه بار با آب مقطر شستشو و در دمای آزمایشگاه به خوبی خشک شدند. سپس ۱۲۵ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۰ درصد به عنوان حلال به هر چاهک اضافه گردید. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات هر پلیت به یک پلیت جدید منتقل شده و جذب نوری (Optical Density OD) چاهک ها توسط دستگاه الیزا ریدر (BIOTEK ELX808, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

آزمایشات سه بار تکرار و میانگین نتایج مربوط به آنها ثبت گردیدند.

داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS با ویرایش ۲۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای مقایسه اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم دهانشویه ها از آزمون تی تست استفاده شد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها:

نتایج مربوط به اثر ضد باکتریایی دهانشویه ها در جدول ۱ و جدول ۲ ارائه شده است. جدول ۱ قطر هاله عدم رشد دهانشویه ها را بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس به روش چاهک پلیت نشان می دهد.

دامنه قطر هاله عدم رشد دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ برای استرپتوکوکوس موتانس از ۱۲ تا ۱۷ میلی متر و برای استرپتوکوکوس سانگوئینیس از ۸ تا ۱۵ میلی متر تعیین گردید. دهانشویه میسواک فقط در غلظت ۵۰۰ mg/ml اثر مهار رشد بر باکتری ها با قطر هاله ۱۰ میلی متر نشان داد. اما دهانشویه های پرسیکا و ایرشا بر باکتری های مورد مطالعه بی اثر بودند.

جدول ۲ نتایج MIC دهانشویه ها را بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس به روش میکروبراث دایلوژن نشان می دهد که نتایج بدست آمده در مورد هر دو باکتری مشابه بودند. دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ تا رقت ۳۲/۱ رشد باکتری های مورد مطالعه را مهار کرد. دهانشویه های پرسیکا و میسواک فقط در رقت ۱/۲ سبب مهار رشد باکتری ها شده و در غلظت های پایین تر شاهد رشد باکتری ها در چاهک ها بودیم. اما دهانشویه ایرشا حتی در بالاترین رقت تهیه شده نتوانست رشد باکتریهای مورد مطالعه را مهار کند. نتایج مربوط به روش های چاهک پلیت و میکروبراث دایلوژن نشان دادند که کلرهگزیدین ۰/۲٪ در مقایسه با سایر دهانشویه ها بطور معناداری اثر مهار رشد بر باکتری های مورد مطالعه داشته است. ($P < 0.05$). بر اساس نتایج MIC، بررسی اثر ضد بیوفیلم برای دهانشویه های پرسیکا و میسواک در رقت ۵۰۰ mg/ml و برای دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ در رقت های ۱۲۵ mg/ml، ۶۲/۵ mg/ml، ۳۱/۲۵ mg/ml، ۱۵/۶۲ mg/ml و ۷/۸ mg/ml انجام شد. اثر ضد بیوفیلم دهانشویه ایرشا بررسی نشد، زیرا دهانشویه ایرشا فاقد اثر مهار رشد، در غلظت های مورد مطالعه، بر باکتری های مورد مطالعه بود. نتایج مربوط به اثر ضد بیوفیلم دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ بر روی باکتری های مورد مطالعه در نمودار ۱ قابل مشاهده است. لازم به ذکر است، بر اساس نتایج آنالیز آماری، دهانشویه های پرسیکا، ایرشا و میسواک در مقایسه با هم از نظر خاصیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلم، بر باکتری های مورد مطالعه، دارای تفاوت معنادار نبودند ($p > 0.05$).

جدول ۱. قطر هاله عدم رشد دهانشویه ها بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس

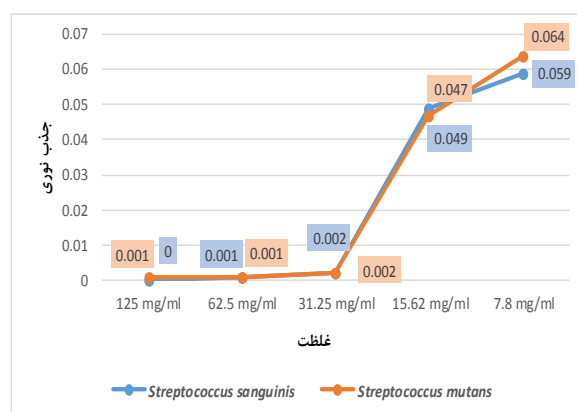
استرپتوکوکوس سانگوئینیس					استرپتوکوکوس موتانس				
۳۱/۲۵ mg/ml	۶۲/۵ mg/ml	۱۲۵ mg/ml	۲۵۰ mg/ml	۵۰۰ mg/ml	۳۱/۲۵ mg/ml	۶۲/۵ mg/ml	۱۲۵ mg/ml	۲۵۰ mg/ml	غلظت دهانشویه ۵۰۰ mg/ml
.	پرسیکا
.	.	mm ^۸	mm ^{۱۲}	mm ^{۱۵}	.	.	mm ^{۱۰}	mm ^{۱۰}	کلرهگزیدین ۰/۲٪ mm ^{۱۷}
.	ایرشا
.	.	.	.	mm ^{۱۰}	میسواک mm ^{۱۰}

جدول ۲- MIC دهانشویه ها بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس

دهانشویه	استرپتوکوکوس موتانس	استرپتوکوکوس سانگوئینیس
MIC*	MIC	
پرسیکا	500 mg/ml	500 mg/ml
کلرهگزیدین ۰.۰۲٪	31.25 mg/ml	31.25 mg/ml
ایرشا	>500 mg/ml	>500 mg/ml
میسواک	500 mg/ml	500 mg/ml

* Minimum Inhibitory Concentration

نمودار ۱ نشان می دهد که دهان شویه کلرهگزیدین ۰.۰۲٪ در غلظت های ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، در مقایسه با کنترل مثبت، به طور قابل ملاحظه ای مانع از تشکیل بیوفیلم گردیده است. دهان شویه های پرسیکا و میسواک در رقت ۵۰۰ mg/ml نتوانستند مانع از تشکیل بیوفیلم گردند. بنابراین دهان شویه های پرسیکا و میسواک اثر ضد بیوفیلم بر باکتری های مورد مطالعه نداشتند. نتایج مربوط به روش میکروتیتر پلیت نشان داد که کلرهگزیدین ۰.۰۲٪ در مقایسه با سایر دهانشویه ها بطور معناداری اثر ضد بیوفیلم بر باکتری های مورد مطالعه داشته است. ($P < 0.05$).



نمودار ۱. فعالیت ضد بیوفیلمی دهان شویه کلرهگزیدین ۰.۰۲٪ بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس براساس تغییرات جذب نوری

بحث

یکی از راه های غلبه بر پوسیدگی دندان و بیماری های پرودنتال استفاده از دهانشویه ها بعنوان عوامل ضد عفونی کننده می باشد. یکی از ویژگی های مهم هر دهانشویه خاصیت ضد میکروبی آن بدون اثرات سمی بر بافت دهان و دندان است. از این رو امروزه نگرش جهانی کاهش کاربرد دهانشویه های شیمیایی نظیر کلرهگزیدین و استفاده بیشتر از دهانشویه های طبیعی بخصوص گیاهی با خاصیت ضد میکروبی مناسب و اثرات جانبی کم می باشد^(۱۶،۱۷). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم دهان شویه های گیاهی پرسیکا، دارای فلوراید، بدون فلوراید و کلرهگزیدین ۰.۰۲٪ بر دو سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس (بعضان عوامل مهم پوسیدگی دندان) در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب با استفاده از روش های چاهک پلیت، MIC و میکروتیتر پلیت به جهت معرفی یک جایگزین مناسب برای دهانشویه کلرهگزیدین بوده است. یافته های مطالعه اخیر نشان داد که اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم کلرهگزیدین ۰.۰۲٪ بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس بطور قابل ملاحظه ای بیشتر از سایر دهانشویه های مورد مطالعه بود.

نتایج حاصل از روش چاهک پلیت نشان داد که دهانشویه کلرهگزیدین ۰.۰۲٪ در غلظت های متوسط و بالا سبب تشکیل هاله عدم رشد و مهار رشد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس می گردد. درحالیکه دهانشویه میسواک فقط در بالاترین غلظت تهیه شده سبب تشکیل هاله عدم رشد و مهار رشد باکتری های مورد مطالعه بوده است. ولی دهانشویه های پرسیکا و ایرشا بدلیل عدم تشکیل هاله عدم رشد حتی در بالاترین غلظت، هیچگونه اثر مهاری بر رشد دو باکتری مورد مطالعه نداشتند. جهت بررسی دقیق تر اثر ضد باکتریایی و تعیین MIC دهانشویه ها از روش میکروبراث دایلوژن استفاده شد. نتایج حاصل از این روش در مطالعه ما نشان داد که دهانشویه کلرهگزیدین ۰.۰۲٪ حتی در غلظت های کم نیز می تواند اثر مهارکنندگی رشد بر باکتری های مورد مطالعه داشته باشد. همچنین دهانشویه های پرسیکا و میسواک

فقط در بالاترین غلظت اثر مهارکنندگی رشد داشتند. نتایج بدست آمده نشان می دهند که استفاده از دهانشویه های پرسیکا و میسواک در صورتیکه رقیق سازی نشده باشند دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی هستند. ولی دهانشویه ایرشا حتی در بالاترین غلظت تهیه شده نیز نتوانست رشد باکتری های مورد مطالعه را مهار کند. در همین راستا تحقیقات مختلفی با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی دهانشویه ها بر استرپتوکوک های دهانی با استفاده از روش های چاهک پلیت و تعیین MIC صورت گرفته است که نتایج برخی از آنها با مطالعه ما هم سو می باشند، از جمله Karimzadeh و همکاران^(۱۷) در سال ۲۰۲۱، Sadeghi و Salari و همکاران^(۱۸) در سال ۲۰۱۹، و همکاران^(۱۹) در سال ۲۰۱۱، Salehi و همکاران^(۲۰) در سال ۲۰۰۵ و Behrooz و همکاران^(۲۱) در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که اثر ضد باکتریایی کلرهگزیدین بر علیه استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوینیس بطور چشمگیری بیشتر از دهانشویه های گیاهی مانند پرسیکا می باشد. Almas و همکاران^(۲۲) در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که دهانشویه کلرهگزیدین بطور قابل ملاحظه ای دارای حداکثر فعالیت ضد میکروبی و عصاره گیاه میسواک (موجود در دهانشویه پرسیکا) دارای فعالیت ضد میکروبی کم بر علیه استرپتوکوک های دهانی بخصوص استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوینیس می باشند. Somaraj و همکاران^(۱۰) در سال ۲۰۱۷ و Mehta و همکاران^(۲۳) در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که دهانشویه های گیاهی بر مهار رشد استرپتوکوک های دهانی موثر هستند. Umetsu و همکاران^(۲۴) در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که دهانشویه های حاوی فلوراید نسبت به بدون فلوراید بطور قابل مقایسه دارای خاصیت ضد میکروبی هستند.

نتایج برخی از پژوهش ها با مطالعه اخیر اختلاف داشت مانند پژوهش Zajkani و همکاران^(۲۵) در سال ۲۰۱۷ که نشان داد دهانشویه میسواک، بطور مشابه با دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ در مطالعه ما، خاصیت ضد باکتریایی بالایی دارد. علت اختلاف نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر احتمالاً این است که سدیم فلوراید مورد استفاده در این مطالعه ۰/۲٪ بوده در حالیکه در مطالعه ما ۰/۱٪ بوده است که اثر ضد باکتریایی کمتری داشته است.

نتایج حاصل از روش میکروتیتر پلیت در مطالعه ما نشان داد که دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ حتی در غلظت های کم نیز می تواند اثر ضد بیوفیلم بر باکتری های مورد مطالعه داشته باشد. در صورتیکه دهان شویه های پرسیکا، ایرشا و میسواک فاقد هرگونه اثر ضد بیوفیلم بودند. Haffajee و همکاران^(۲۶) و Malhotra و همکاران^(۲۷) به این نتیجه رسیدند که اگرچه دهانشویه های گیاهی قدرت ضد میکروبی بسیار کمتری نسبت به کلرهگزیدین دارند ولی بدلیل داشتن ترکیبات ضد میکروبی می توانند در کنترل جمعیت میکروبی عوامل کاربوژنیک و ممانعت از رشد و تکثیر بیش از اندازه آنها و در نتیجه مهار تشکیل پلاک های دندانی و پوسیدگی دندان موثر باشند.

یکی از محدودیت های مطالعه اخیر این بود که از سویه های استرپتوکوک کاربوژنیک جدا شده از حفره دهان استفاده نشد.

نتیجه گیری

بر طبق نتایج این مطالعه، تاثیر هر یک از دهانشویه ها بر هر دو باکتری مورد مطالعه یکسان بود و کلرهگزیدین ۰/۲٪ در مهار رشد باکتری ها و مهار تشکیل بیوفیلم بطور قابل ملاحظه ای موثرتر از سایر دهانشویه های مورد مطالعه بود. همچنین با توجه با اینکه دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ حتی در غلظت های کم اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم دارد، بنابراین جهت جلوگیری از بروز عوارض جانبی ناشی از استعمال آن بهتر است در غلظت های کم جهت شستشوی دهان مورد استفاده قرار بگیرد. توجه به این نکته حائز اهمیت است که دهانشویه های میسواک و پرسیکا در صورتیکه بدون رقیق شدن مورد استفاده قرار بگیرند دارای خاصیت ضد میکروبی می باشند.

پیشنهادهات:

مطالعه ما پیشنهاد میکند که دهانشویه های گیاهی مانند پرسیکا و دهانشویه های حاوی فلوراید مانند میسواک به جهت عدم سمیت و اثرات جانبی بسیار کم بر بافت پریدونتال می توانند بعنوان یک دهانشویه با خاصیت ضد عفونی کنندگی مناسب مورد استفاده قرار بگیرند.

References:

- 1-Yim NH, Jung YP, Cho WK, Kim T, Kim A, Im M, et al. Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. *Integr Med Res.* 2013;2(1):18-24.
- 2-Chandra Shekar BR, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacogn Rev.* 2015;9(18):87-92.
- 3-Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 2000;45(2):141-8.
- 4-Xiao J, Liu Y, Zuo YL, Li JY, Ye L, Zhou XD. Effects of Nidus Vespae extract and chemical fractions on the growth and acidogenicity of oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 2006;51(9):804-13.
- 5-Xiao J, Zuo Y, Liu Y, Li J, Hao Y, Zhou X. Effects of Nidus Vespae extract and chemical fractions on glucosyltransferases, adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2007;52(9):869-75.
- 6-Yousefimanesh H, Amin M, Robati M, Goodarzi H, Otoufi M. Comparison of the Antibacterial Properties of Three Mouthwashes Containing Chlorhexidine Against Oral Microbial Plaques: An in vitro Study. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(2):e17341.
- 7-Bahlouli S, Aghazadeh Z, Aghazadeh M, Shojani S, Kafil HS. Determining the antibacterial activity of chlorhexidine mouthwashes with and without alcohol against common oral pathogens. *J Adv Oral Res.* 2018;9(1-2):15-9.
- 8-Baradari AG, Khezri HD, Arabi S. Comparison of antibacterial effects of oral rinses chlorhexidine and herbal mouth wash in patients admitted to intensive care unit. *Bratisl Lek Listy.* 2012;113(9):556-60.
- 9-Perala SR, Bhupathiraju P. Efficacy of Four Fluoride Mouth Rinses on *Streptococcus mutans* in High Caries Risk Children - A Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;10(9):Zc56-zc60.
- 10-Somaraj V, Shenoy RP. Effect of Herbal and Fluoride Mouth Rinses on *Streptococcus mutans* and Dental Caries among 12-15-Year-Old School Children: A Randomized Controlled Trial. *Int J Dent.* 2017;2017:5654373.
- 11-Eshaghi Gorji F, Seyedmajidi M, Asgharpours F, Tashakorian H, Moghadamnia AA, Kazemi S, et al. Oral mucosa and *Streptococcus mutans* count in the saliva. Does graphene oxide nanoparticle mouthwash have a good effect? *Caspian J Intern Med.* 2021;12(3):342-9.
- 12-Alemrajabi MS, Dastorani M, Hamidi H, Mohammadian S, Sadrzadeh-Afshar M-S. Effects of Propolis and Persica Mouthwashes on Three Common Oral *Streptococci*: A Comparative Study. *Pharm Biomed Res.* 2021;7(4):303-16.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان جهت همکاری در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه آزمایشگاهی با کد IR.GUMS.REC.1400.287 در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان به ثبت رسیده است. این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع دکترای عمومی دندانپزشکی به شماره ۲۹۴۱۴۰۰۳۲۶۱ مربوط به دانشکده دندانپزشکی پردیس دانشگاه علوم پزشکی گیلان می باشد.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله هیچگونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

- 13-Babadi F, Amin M, Sharafi N, Saki M. Comparison of the antibacterial effects of jaftekh herbal mouthwash with matrica and persica on streptococcus mutans, streptococcus sanguinis, streptococcus salivarius and lactobacillus casei. J Res Med Dent Sci. 2018;6:349-54.
- 14-Weinstein M.P, Patel J.B. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Eeight Informational Supplement M100. CLSI 2021.
- 15-Kirmusaoğlu S. The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods. 7th ed. 2019.
- 16-Tavafi H, Sadrzadeh-Afshar M-s, Niroomand S. In vitro effectiveness of antimicrobial properties of propolis and chlorhexidine on oral pathogens: A comparative study: Effectiveness of antimicrobial properties of propolis and chlorhexidine on oral pathogens. Biosis: Biol Syst. 2020;1(3):116-25.
- 17-Karimzadeh M, Khademnejad S, Aghazadeh Z. Antimicrobial effects of Tanacetum balsamita L essential oil Streptococcus mutants, Streptococcus sanguis and Streptococcus salivarius and its comparison with common mouthwashes. J Res Dent Sci. 2021;18(1):67.
- 18-Salari Sedigh S, Sadeghi M, Beikzadeh M, Rezazadeh Zarandi E, Assar S. Comparison of Antimicrobial Effects of Matrica Herbal Mouthwash and 0.2% Chlorhexidine on the Growth of Streptococcus Mutans, Actinomyces Viscosus, and Enterobacter Cloacae: A Short Report. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2019;18(3):305-12.
- 19-Sadeghi M, Bahramabadi R, Assar S. Antibacterial effects of Persica and Matrica herbal mouthwashes on common oral microorganisms: An in vitro study. J Mash Dent Sch. 2011;35(2):1-107.
- 20-Salehi P, Kohanteb G, Momeni Danaei S, Vahedi R. Comparison of the antibacterial effects of persica and matrica, two herbal mouthwashes with chlohexidine mouthwash. J Dent. 2005;6(1, 2):63-72.
- 21-Behrooz M, Shahla M, Saeed R, Ahmad A, Mohammad M. In vitro study between antibacterial and cytotoxic effects of chlorhexidine and persica mouthrinses. J Dent Sch Shahid Beheshti Med Sci. 2005;23(3):494-509.
- 22Almas K, Skaug N, Ahmad I. An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. Int j dent hyg. 2005;3(1):18-24.
- 23Mehta S, Pesapathy S, Joseph M, Tiwari PK, Chawla S. Comparative evaluation of a herbal mouthwash (Freshol) with chlorhexidine on plaque accumulation, gingival inflammation, and salivary Streptococcus mutans growth. J Int Soc of Prev Community Dent. 2013;3(1):25-8.
- 24-Umetsu H, Kaneko N, Yoshihara A, Sakuma S, Hanada N, Miyazaki H. Association between glucan synthesis by streptococcus mutans and caries incidence in schoolchildren receiving a fluoride mouth rinse. Oral Health Prev Dent. 2012;10(2):161-6.
- 25-Zajkani E, Zeighami H, Zaeeffjou A. Comparision of the effect of fluoride 0.2% and a combination mouthwash (xylitol and fluoride) on streptococcus mutans and lactobacillus acidophilus growths. J Dent Med. 2017;30(1):57-64.
- 26-Haffajee AD, Yaskell T, Socransky SS. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. J Am Dent Assoc. 2008;139(5):606-11.
- 27-Malhotra R, Grover V, Kapoor A, Saxena D. Comparison of the effectiveness of a commercially available herbal mouthrinse with chlorhexidine gluconate at the clinical and patient level. J Indian Soc Periodontol. 2011;15(4):349-52.