مقایسه آزمایشگاهی اثر ضد باکتری دو داروی کلشی‌سین و هیدروکسید کلسیم بر چند گونه میکروبی و فلور نرمال بزاق

دکتر بهناز برکتین[۱]، دکتر علیرضا فرهاد[۲]، پوراندخت رفائی[*]، فریبا حیدری[۳]

چکیده

مقدمه: میکروب‌های مقاوم به درمان از عوامل مؤثر بر شکست درمان‌های ریشه خوب انجام شده هستند. هدف از این پژوهش، ارزیابی و مقایسه خاصیت ضد میکروبی غلظت‌های مختلف دو داروی کلشی‌سین و هیدروکسید کلسیم بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، سوسپانسیون‌های حاوی ۵×۱۰^{۵} از میکروارگانیسم‌های انتروکوک فکالیس، اشرشیا کولی، پسودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس آرئوس، قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و فلور نرمال بزاق و نیز غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دو داروی کلشی‌سین و هیدروکسید کلسیم تهیه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از نگهداری نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور، نمونه‌ها از نظر کدورت برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC یا Minimum inhibitory concentration) بررسی شدند. سپس میزان ۰/۱ ml از سوسپانسیون فاقد کدورت برای تعیین حداقل غلظت کشنده (Minimum bactericidal concentration یا MBC)، بر روی محیط جامد کشت داده شد. شاهد مثبت، شاهد منفی و شاهد استاندارد نیز به منظور اطمینان از صحت مراحل انجام کار تهیه شدند. کدورت لوله‌ها در تمامی نمونه‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: در بررسی کدورت لوله‌ها پس از ۲۴ ساعت اول، تمام لوله‌های حاوی داروی هیدروکسید کلسیم و لوله‌های کنترل مثبت کدورت واضحی را نشان دادند. در لوله‌های حاوی کلشی‌سین در تمامی دسته‌های باکتریایی کدورت مشاهده شد. لوله‌های حاوی *کاندیدا آلبیکنس* با داروی کلشی‌سین با غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شفاف بودند و غلظت‌های پایین‌تر آن کدورت نشان دادند. در بررسی تشکیل کلنی بر پلیت‌ها، پلیت حاوی *کاندیدا آلبیکنس* همراه با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داروی کلشی‌سین، فاقد هر گونه کلنی بود.

نتیجه‌گیری: داروی کلشی‌سین در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر بازدارندگی و در غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بود. هیچ یک از دو دارو اثر بازدارندگی یا کشندگی بر سایر ارگانیسم‌های ذکر شده نداشتند.

کلید واژه‌ها: هیدروکسید کلسیم، کلشی‌سین، ضد باکتری، حداقل غلظت بازدارنده، حداقل غلظت کشنده.

* دانشجوی دندان‌پزشکی، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. (مؤلف مسؤول)

refaei@med.mui.ac.ir

۱: استادیار، گروه اندودنتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲: دانشیار، گروه اندودنتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳: کارشناس میکروبیولوژی، کارشناس آزمایشگاه دانشکده دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

این مقاله حاصل پایان‌نامه دکترای عمومی دندان‌پزشکی به شماره ۳۸۹۰۷۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

این مقاله در تاریخ ۹۰/۴/۱۹ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۹۰/۴/۲۹ اصلاح شده و در تاریخ ۹۰/۶/۲۲ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۹۰؛ ۷(۴): ۴۰۹ تا ۴۱۷

مقدمه

بیشتر بیماری‌های بافت‌های پالپ و پری‌اپیکال به طور مستقیم یا غیر مستقیم با میکروارگانیسم‌ها در ارتباط هستند. همچنین اولین دلیل ایجاد ضایعات پس از درمان، عفونی شدن سیستم کانال ریشه است که علت آن می‌تواند باقی ماندن میکروارگانیسم‌ها با وجود درمان کانال ریشه یا انتشار آن‌ها از طریق نشت تاجی و ورود آن‌ها به فضای پر شده کانال باشد[۵-۱]. میکروارگانیسم‌هایی که از کانال بیرون آورده نشده‌اند و تکثیر یافته‌اند، می‌توانند Flare up ایجاد کنند که از فوریت‌های واقعی درمان ریشه در بین جلسات درمان است که با ایجاد مشکلاتی چون درد، تورم یا هر دو بروز می‌کند[۶]. بنابراین فعالیت ضد میکروبی داروهای داخل کانال بین جلسات درمان موضوع بسیار با اهمیتی به شمار می‌آید[۹-۷]. کاربرد هیدروکسید کلسیم پس از آماده‌سازی کانال ریشه و قبل از پر کردن آن در دندان‌های دارای ضایعات مقاوم به درمان توصیه می‌شود. این ماده شیمیایی در بین جلسات درمان از اثرات ضد میکروبی بیشتری در مقایسه با سایر داروها برخوردار است [۱۰، ۷]. چندین مطالعه نشان داده‌اند که هیدروکسید کلسیم دارای اثرات کشنده بر سلول‌های باکتری است[۱۲-۱۰]. به تازگی، این ماده شیمیایی به عنوان پرکاربردترین داروی ضد میکروبی پوشش دهنده در خلال درمان‌های ریشه شناخته شده است. اما نشان داده شده است که در کشتن گونه‌های باکتریایی بی‌هوازی و قارچ‌ها ناکارامد است[۱۵-۱۳].

کلشی‌سین اصلی‌ترین آلکالوئید استخراج شده از گیاهی با نام Meadow saffron و یا سورنجان تلخ (گل حسرت)[۱۸-۱۶] و متعلق به خانواده Colchicum autumnalea است[۲۰، ۱۹]. داروی کلشی‌سین از قرن شش تاکنون در درمان نقرس کاربرد داشته است. غلظتی معادل ۱-۰/۱ ug/ml از کلشی‌سین می‌تواند با تداخل در سازماندهی میکروتوبول‌ها، به خصوص دوک‌های میتوزی، منجر به توقف میتوز در متافاز سلول‌های در حال تقسیم (هم در گیاهان و هم در جانوران) شود[۲۳-۲۰]. به غیر از خاصیت ضد میتوزی، فعالیت ضد درد و ضد التهابی آن مورد توجه است[۲۵، ۲۴]. در مورد خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچ عصاره گیاه گل حسرت، مطالعه‌ای توسط Ahmad و همکاران[۲۶] انجام شد. نتایج نشان دادند که این عصاره خاصیت ضد قارچی عالی تا متوسط را در برابر قارچ Trichophyton longifusus تا بیش از ۷۵ درصد و Microsporum canis تا بیش از ۸۵ درصد نشان داد. خواص ضد باکتریایی در حد متوسط گزارش شد (بیشترین خاصیت ضد باکتریایی در برابر Bacillus subtilis، ۵۸ درصد بود)[۲۶].

تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر کلشی‌سین در درمان عفونت‌های ریشه انجام نشده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی داروی کلشی‌سین در محیط آزمایشگاهی و تعیین غلظت مؤثر دارو در کشتن گونه‌های میکروبی شایع در درمان‌های ریشه ناموفق و سایر گونه‌های باکتریایی طراحی و اجرا شده است. با تأیید تأثیر این دارو در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های دهان می‌توان این دارو را به عنوان جایگزین هیدروکسید کلسیم و یا در همراهی با آن استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی- آزمایشگاهی از پودر کلشی‌سین (Sigma, Aldrich, USA) و پودر هیدروکسید کلسیم (Merck, Germany) استفاده شد.

برای تهیه غلظت مناسب از داروهای مورد آزمایش مقدار ۲۰ میلی‌گرم از پودر هیدروکسید کلسیم با ترازوی دیجیتال (OHAUS.Co, USA) وزن شده و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. این کار باعث ایجاد یک محیط ذخیره (Stock) برای مراحل بعدی کار شد. غلظت این محلول ۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بود. ۵ میلی‌لیتر از این محیط ذخیره در یک لوله استریل، دوباره با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد تا غلظتی معادل یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایجاد گردید. فرایند تقلیل غلظت به همین روش ادامه یافت تا غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، با حجم هر کدام ۵ میلی‌لیتر آماده گردید. سپس غلظت‌های ذکر شده همه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو (Farazmehr-Iran) استریل شد. این مراحل برای داروی کلشی‌سین هم به همین ترتیب اجرا شد[۲۷]. محلول‌های به دست آمده تا زمان اجرای آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محیط تاریک نگهداری شدند. با قرار دادن محلول‌ها به مدت

۱ ساعت در دمای اتاق، قبل از اجرای آزمایش دمای آن‌ها به دمای اتاق رسانده شد.

باکتری‌ها و محیط کشت: (جدول ۱)

برای انجام کار، در مرحله تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) محیط کشت TSB (Tryptone soy broth) (Merck, Germany) به عنوان محیط کشت مایع مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین MBC (Minimum bactericidal concentration)، دو محیط کشت جامد، یکی از بیس بلادآگار (Merck, Germany) بود که با خون ۷/۵ درصد دفیبرینه گوسفندی آماده شد و دیگری Sabouraud dextrose agar (Merck, Germany)که با ۰/۰۵ پودر کلرامفنیکل مخلوط گردید[۲۸].

این تحقیق روی ۴ گونه باکتریایی شایع، قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و فلور نرمال بزاق انجام شد. ۴ گونه باکتریایی و قارچ از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTCC) تهیه شده بودند. فلور نرمال بزاق با نمونه‌گیری صبح‌گاهی و کشت از بزاق یک فرد تهیه شد.

گروه اول: انتروکوک فکالیس Enterococcus faecalis (گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری)

گروه دوم: استافیلوکوکوس آرئوس Staphylococcus aureus (گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری)

گروه سوم: سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa (گرم منفی، هوازی)

گروه چهارم: اشرشیا کلی Escherichia coli (گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری)

گروه پنجم: فلور نرمال بزاق Normal flora of saliva (ترکیبی از میکروارگانیسم‌های کشت شده از بزاق)

گروه ششم: *کاندیدا آلبیکنس* (Candida albicans یا قارچ هم‌زیست انسان)

هر ۴ گونه باکتری، فلور بزاق و همچنین کاندیدا در محیط کشت TSB به طور جداگانه کشت داده شدند. برای تهیه کدورت استاندارد (حد استاندارد نیم مک فارلند)[۲۸] از محیط کشت اولیه میکروارگانیسم‌ها، مقدار کافی میکروارگانیسم به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تازه تهیه شده و استریل اضافه شد. سپس در لوله‌های استریل در پیچ‌دار، جداگانه ۱ میلی‌لیتر از غلظت مورد نظر داروی تهیه شده ریخته و به آن ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت TSB حاوی سوسپانسیون باکتری مورد نظر که بر مبنای معیار مک فارلند بتواند $۱۰^{۶}$ باکتری ایجاد کند اضافه شد. در این مرحله از کار، لوله‌ها حاوی ۲ میلی‌لیتر از ۵×۱۰^{۵} ارگانیسم تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر (CFU/ML) و در نتیجه غلظت مورد نظر از داروها ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بود. به منظور اطمینان از اختلاط کامل اجزای سوسپانسیون، لوله‌ها به مدت حداقل ۵ ثانیه روی دستگاه Vortex mixer (Pervaze–Iran) قرار گرفتند. این مرحله از کار برای تمام میکروارگانیسم‌ها و تمام غلظت‌های مورد نظر، برای هر دو دارو تکرار شد.

جهت مقایسه نتایج، سه گروه به عنوان شاهد مثبت، شاهد منفی و شاهد استاندارد در نظر گرفته شد. علت استفاده از شاهد استاندارد اطمینان از صحت مراتب آماده‌سازی مواد و انجام آزمایش بود[۲۸].

جدول ۱. میکروارگانیسم‌ها و محیط کشت‌های مورد استفاده

میکروارگانیسم‌ها	محیط کشت آگار	محیط کشت مایع	اتمسفر
انتروکوک فکالیس ATCC 8213	*Blood*	*TSB*	*هوازی*
استاف آرئوس ATCC 25923	*Blood*	*TSB*	*هوازی*
سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853	*Blood*	*TSB*	*هوازی*
اشرشیا کولی ATCC 25922	*Blood*	*TSB*	*هوازی*
کاندیدا آلبیکنس	*Sab. Dextrose. Agar*	*TSB*	*هوازی*
فلور نرمال بزاق	*Blood*	*TSB*	*هوازی*

شاهد مثبت شامل ۶ لوله آزمایش استریل حاوی میکروارگانیسم‌های خالص، بدون هرگونه دارو، شاهد منفی شامل ۶ لوله آزمایش استریل حاوی محیط کشت خالص استریل بدون هرگونه میکروارگانیسم و شاهد استاندارد شامل ۶ لوله آزمایش استریل، هر کدام حاوی ۱ میلی‌لیتر از میکروب‌ها و داروی سیپروفلوکساسین بود. برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس* میزان ۱۱۰/۸ µg/ml میکونازول به عنوان شاهد استاندارد در نظر گرفته شد[۲۶].

به این ترتیب مطالعه بر روی ۵ دسته آزمایشی صورت گرفت.

دسته اول: لوله‌های آزمایش حاوی سوسپانسیون میکروارگانیسم‌ها و داروی هیدروکسید کلسیم با غلظت‌های مورد نظر.

دسته دوم: لوله‌های آزمایش حاوی سوسپانسیون میکروارگانیسم‌ها و داروی کلشی‌سین با غلظت‌های مورد نظر.

دسته سوم: لوله‌های آزمایش حاوی سوسپانسیون میکروارگانیسم‌های خالص بدون هر گونه دارو (شاهد مثبت).

دسته چهارم: لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت خالص فاقد هر گونه میکروارگانیسم (شاهد منفی)

دسته پنجم: لوله‌های آزمایش حاوی سوسپانسیون میکروارگانیسم‌ها و داروهای سیپروفلوکساسین و میکو نازول (شاهد استاندارد).

تمام لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (Behdad- Iran) نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از نظر میزان کدورت (Turbidity) بررسی و وجود یا عدم وجود کدورت در چک‌لیست ثبت شد.

از آن‌جایی که در لوله‌های شفاف امکان حضور میکروارگانیسم‌های زنده وجود دارد (یعنی فقط از رشد باکتری جلوگیری شده اما باکتری کشته نشده است) چنان‌چه میکروارگانیسم‌ها را از محیط مایع به روی محیط کشت جامد بیاوریم، شروع به رشد می‌کنند. پس برای تعیین غلظتی از دارو که هم شفافیت ایجاد کرده و هم میکروارگانیسم را کشته، لازم است کشت از غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که شفاف بودند بر روی محیط کشت جامد انجام شود تا مشخص شود در کدام غلظت، باکتری‌ها کشته شده‌اند.

پس میزان ۰/۱ ml از سوسپانسیون لوله‌های حاوی باکتری که کدورت نشان نمی‌دادند، بر روی دو عدد پلیت بلاد آگار و در مورد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بر روی دو عدد پلیت محتوی Sabouraud dextrose agar کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند و پس از گذشت این زمان بر اساس روش کار ذکر شده در کمیته ملی برای علوم آزمایشگاهی استاندارد (NCCLS)[۲۹] وجود یا عدم وجود کلونی بر روی پلیت‌ها مشاهده و در چک لیست ثبت شدند.

یافته‌ها

در مورد کدورت محیط کشت مایع پس از اضافه کردن کلشی‌سین یا کلسیم هیدروکسید در غلظت‌های مختلف نتایج در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و هیدروکسید کلسیم در مهار باکتری‌ها و قارچ

	داروی هیدروکسید کلسیم (mg/ml)					داروی کلشی‌سین (mg/ml)					کنترل منفی*	کنترل مثبت**	کنترل استاندارد†
	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶۲۵	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶۲۵			
استافیلوکوک آرئوس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
انتروکوک فکالیس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
فلور نرمال بزاق	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
کاندیدا آلبیکنس	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	−

(+) رشد میکروارگانیسم یا کدورت
(−) عدم رشد میکروارگانیسم یا عدم کدورت
* حاوی میکروارگانیسم و فاقد دارو
** حاوی محیط کشت خالص فاقد باکتری یا قارچ
† حاوی داروی سیپروفلوکساسین و یا میکو نازول

یافته‌های این مطالعه نشان داد که دو داروی هیدروکسید کلسیم و کلشی‌سین در غلظت‌های مورد آزمایش در گروه‌های باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *انتروکوک فکالیس* و *اشرشیا کلی* و *فلور نرمال بزاق* بی‌اثر می‌باشند و در غلظت‌های ذکر شده از این دو دارو، فعالیت بازدارنده از رشد باکتری وجود ندارد. در گروه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* سه غلظت ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ (mg/ml) از داروی کلشی‌سین فعالیت بازدارنده از رشد نشان دادند، لذا MIC برای کلشی‌سین در گروه *کاندیدا آلبیکنس*، ۰/۲۵ mg/ml بود.

با توجه به این‌که در مرحله کشت بر روی محیط جامد (Sabouraud dextrose agar)، تنها در غلظت ۱ mg/ml از داروی کلشی‌سین هیچ کلنی مشاهده نشد می‌توان چنین نتیجه گرفت که MBC در مورد داروی کلشی‌سین برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، ۱ mg/ml است.

بحث

وجود میکروارگانیسم‌ها به خصوص انواع مقاوم به درمان از جمله *انتروکوک فکالیس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، در تکامل و دایمی شدن بیماری‌های پالپ و پری‌اپیکال در مدل‌های انسانی و حیوانی اثبات شده است. حذف کامل این میکروارگانیسم‌ها بسیار پیچیده است. چون حتی پس از پاک‌سازی و شکل‌دهی کانال ریشه دندان، قسمت‌های بسیار زیادی از دیواره کانال دست نخورده باقی می‌ماند. استفاده از داروهای ضد میکروبی داخل کانال راهی برای کنترل عفونت در درمان‌های ریشه به شمار می‌آید. داروهای بسیاری به عنوان پانسمان ضد میکروبی داخل کانال در جلسات بین درمان، هم برای کاهش بار میکروبی و هم برای کاهش درد و تورم پس از درمان، به کار گرفته شده‌اند. برخلاف ادعاهای بی‌شمار، هیچ دارویی ایده‌آل نبوده است و در صحت عملکرد آن‌ها تناقضات زیادی وجود دارد[۳۰]. با وجود استفاده گسترده از هیدروکسید کلسیم به عنوان پانسمان در بین جلسات درمان، به نظر می‌رسد این دارو توانایی حذف کامل میکروارگانیسم‌ها را ندارد. در مطالعه‌ای که توسط Waltimo و همکاران[۳۱] انجام شد، مشاهده گردید که قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به فرم محلول هیدروکسید کلسیم مقاوم می‌باشد و در مطالعه‌ای دیگر Ferguson و همکاران[۳۰] نشان دادند که هیچ یک از غلظت‌های محلول هیدروکسید کلسیم اثر ضد قارچی نشان نمی‌دهند و تنها فرم خمیر هیدروکسید کلسیم اثرات ضد قارچی نشان می‌دهد. لذا نیاز به جایگزینی دارویی مناسب که هر دو اثر ضد میکروبی و ضد التهابی را همزمان دارا باشد، ضروری به نظر می‌رسد.

داروی کلشی‌سین به عنوان داروی ضد التهاب و ضد درد در درمان نقرس، تب مدیترانه و حتی درمان آفت‌های راجعه استفاده می‌شود. این دارو اثرات اثبات شده‌ای در جلوگیری از فعالیت میتوزی دارد که شاید بتوان از آن در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها سود برد. در مورد خاصیت ضد باکتریال این دارو مطالعات چندانی انجام نشده است[۲۳-۲۰]. به نظر می‌رسد پژوهش حاضر اولین طرح انجام شده در زمینه بررسی و مقایسه اثر ضد باکتریایی کلشی‌سین خالص با داروی هیدروکسید کلسیم باشد. طراحی مطالعه حاضر جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی کلشی‌سین، در استریل‌سازی و کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های داخل کانال ریشه دندان صورت گرفت.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که دو داروی هیدروکسید کلسیم و کلشی‌سین در غلظت‌های مورد آزمایش در گروه‌های باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *انتروکوکوس فکالیس و اشرشیا کلی و فلور نرمال بزاق* بی‌اثر می‌باشند و در غلظت‌های ذکر شده از این دو دارو فعالیت بازدارنده از رشد باکتری وجود ندارد. در گروه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* سه غلظت ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ (mg/ml) از داروی کلشی‌سین فعالیت بازدارنده از رشد نشان دادند و غلظت (mg/ml) ۱ کلشی‌سین علاوه بر اثر بازدارنده از رشد، اثر کشندگی داشته است. در صورتی‌که در مورد داروی هیدروکسید کلسیم، فعالیت بازدارنده از رشدی در هیچ کدام از غلظت‌ها مشاهده نشد.

نتایج این پژوهش مشابه نتایج مطالعه‌ای بود که در پاکستان توسط Ahmad و همکاران[۲۶] برای تعیین اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره کلشی‌سین انجام شد. لازم به ذکر است که در مطالعه Ahmad و همکاران[۲۶] از عصاره خالص گیاه کلشی‌سین، عصاره تهیه شده با کلروفرم، عصاره تهیه شده با اتیل استات و عصاره تهیه شده با ان- بوتانول استفاده شده بود، در حالی‌که در مطالعه حاضر از پودر کلشی‌سین خالص استفاده

شد تا از اثرات ضد قارچی احتمالی حلال‌های به کار رفته در مطالعه مذکور اجتناب شود.

در مقایسه این مطالعه با نتایج مطالعه Ferguson و همکاران[۳۰]، MIC محاسبه شده کلشی‌سین در این مطالعه ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و تقریباً معادل MIC داروی H_2O_2 است که با توجه به اثرات اکسید کنندگی این ماده استفاده از آن جای تأمل دارد. در حالی‌که غلظت سمی کلشی‌سین بسیار بالاتر از MIC محاسبه شده است.

در مطالعه‌ای که توسط Sen و همکاران[۳۲] در مورد اثر ضد قارچی کلرهگزیدین انجام شد، مشخص گردید که غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کلرهگزیدین در مدت ۶۰ دقیقه قدرت از بین بردن قارچ کاندیدا را از سطوح دندانی دارد. با توجه به این‌که در این مطالعه کشت‌های قارچی پس از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند، محاسبه حداقل زمان مورد نیاز برای حذف کاندیدا توسط کلشی‌سین امکان‌پذیر نشد.

علاوه بر این در مطالعه Ahmad و همکاران[۲۶] جهت کشت از روش آگار دیفیوژن استفاده شده بود به این ترتیب که میکروارگانیسم‌های مورد بررسی با محیط آگار مذاب مخلوط شده و پس از انعقاد محیط کشت و ایجاد چاهک در آن، دارو در غلظت‌های مختلف به آن اضافه شد و قطر هاله تشکیل شده در مجاورت چاهک محاسبه شده بود. با توجه به این‌که در مطالعات انجام شده[۳۴، ۳۳] بر روی هیدروکسید کلسیم، این روش ناموفق بوده است و علت آن خاصیت بافری ترکیبات موجود در محیط کشت جامد و کاهش سطح pH هیدروکسید کلسیم به کمتر از حد لازم برای فعالیت بازدارنده از رشد عنوان شده است، بنابراین در مطالعه حاضر برای حذف این عامل مخدوش کننده از روش رقت لوله‌ای و از محیط کشت مایع استفاده شد.

اهمیت یافته مطالعه حاضر تأثیر غلظت پایین دارو در جلوگیری از رشد *کاندیدا آلبیکنس* است، چرا که *کاندیدا آلبیکنس* یکی از ارگانیسم‌های مهم در شکست درمان در دندان‌هایی با عفونت‌های مقاوم و گاهی غیر قابل درمان است. شاید بتوان از این غلظت از دارو برای پاک‌سازی و ضد عفونی کانال در درمان‌های مجدد و قبل از پر کردن ریشه در دندان‌های علامت‌دار استفاده کرد.

لازم به ذکر است علت استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داروی کلشی‌سین به عنوان بالاترین غلظت، بر مبنای غلظت استفاده شده در مطالعه Ahmad و همکاران[۲۶] می‌باشد. با توجه به این‌که عصاره گیاهی را در صورتی دارای خاصیت ضد میکروبی می‌شناسند که در غلظت ۱ mg/ml واجد این خاصیت باشد، بنابراین در مطالعه حاضر از این غلظت استفاده شد[۲۶].

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی با غلظت‌های بالاتر از هر دو دارو انجام شود.

همزمان با به کار بردن غلظت‌های بالاتر بهتر است مطالعاتی برای بررسی مقایسه‌ای سازگاری زیستی این دو دارو انجام گیرد.

امروزه از موادی مانند کلرهگزیدین به عنوان یک حامل در همراهی با هیدروکسید کلسیم، برای بهره‌گیری از خواص هر دو در نابودی باکتری‌ها استفاده می‌شود. به همین منظور شاید بتوان از محلول داروی کلشی‌سین در غلظت‌های مؤثر به عنوان یک حامل استفاده کرد و اثرات سینرژیست این دو دارو را با هم بررسی نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که داروی کلشی‌سین برخلاف هیدروکسید کلسیم در غلظت‌های مورد بررسی، در جلوگیری از رشد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* مؤثر بود، می‌توان با انجام تحقیقی بر روی سایتوتوکسیسیته آن، در صورت قابل قبول بودن، از آن در بین جلسات درمان ریشه و در درمان عفونت‌های مقاوم به درمان استفاده کرد.

References

1. Siqueira JF, Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 97(1): 85-94.
2. Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. Int Endod J 2003; 36(7): 500-8.

3. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1997; 30(5): 297-306.
4. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. J Endod 1992; 18(12): 625-7.
5. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod 1990; 16(12): 580-8.
6. Siqueira JF, Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. Int Endod J 2003; 36(7): 453-63.
7. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006; 32(5): 389-98.
8. Hariharan VS, Nandlal B, Srilatha KT. Efficacy of various root canal irrigants on removal of smear layer in the primary root canals after hand instrumentation: a scanning electron microscopy study. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2010; 28(4): 271-7.
9. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. J Endod 2005; 31(12): 863-6.
10. Stuart KG, Miller CH, Brown CE, Jr., Newton CW. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 72(1): 101-4.
11. Siqueira JF, Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. J Endod 2007; 33(6): 667-72.
12. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. Endod Dent Traumatol 1993; 9(6): 249-53.
13. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. Int Endod J 2007; 40(1): 2-10.
14. Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of Candida albicans to four disinfectants and their combinations. Int Endod J 1999; 32(6): 421-9.
15. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast Candida albicans. J Endod 2002; 28(2): 68-71.
16. Ondra P, Valka I, Vicar J, Sutlupinar N, Simanek V. Chromatographic determination of the constituents of the genus colchicum. J Chromatography A 1995; 704(2): 351-6.
17. Andreu JM, Timasheff SN. Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79(22): 6753-6.
18. Moffat AC. Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. London: Pharmaceutical Press; 1986. p. 492.
19. Huxley AJ, Griffiths M, Levy M. The new Royal Horticultural Society dictionary of gardening. London: Macmillan Press; 1992.
20. Andreu JM, Timasheff SN. Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79(22): 6753-6.
21. Dawson RM, Elliott DC, Elliott WH. Data for Biochemical Research. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989. p. 263.
22. Wilson L, Friedkin M. The biochemical events of mitosis. I. Synthesis and properties of colchicine labeled with tritium in its acetyl moiety. Biochemistry 1966; 5(7): 2463-8.
23. Farrell KW, Wilson L. Proposed mechanism for colchicine poisoning of microtubules reassembled in vitro from Strongylocentrotus purpuratus sperm tail outer doublet tubulin. Biochemistry 1980; 19(13): 3048-54.
24. Schlesinger N. Management of acute and chronic gouty arthritis: present state-of-the-art. Drugs 2004; 64(21): 2399-416.
25. Schumacher HR, Klippel JH, Koopman WJ. Primer on the rheumatic diseases. Chikago: Arthritis Foundation; 1993.
26. Ahmad B, Khan H, Bashir S, Ali M. Antimicrobial bioassay of Colchicum luteum Baker. J Enzyme Inhib Med Chem 2006; 21(6): 765-9.
27. Martindale W. Martindale: the extra pharmacopoeia. London: Royal Pharmaceutical Society; 1989.
28. Mahon C, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Saunders; 1995.
29. National Committee for Clinical Labratory Standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Washington (DC): NCCLS; 2000.
30. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast Candida albicans. J Endod 2002; 28(2): 68-71.
31. Waltimo TM, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral Candida species to calcium hydroxide in vitro. Int Endod J 1999; 32(2): 94-8.

32. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. J Endod 1999; 25(4): 235-8.
33. Siqueira JF, Jr., de UM. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. J Endod 1996; 22(12): 674-6.
34. Siqueira JF. Antibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. Journal of Endodontics 1996; 22(2): 79-80.

In vitro comparison of antimicrobial effects of colchicine and calcium hydroxide on salivary normal flora and five microbial strains

Behnaz Barekatein, Ali Reza Farhad, Poorandokht Refaei*, Fariba Heidari

Abstract

Introduction: *Resistant microbial strains are major factors involved in root canal treatment failure. The aim of this study was to compare the antimicrobial properties of different concentrations of colchicine and calcium hydroxide.*

Materials and Methods: *In this in vitro study, suspensions containing 5×10^5 colony-forming units of E. coli, E. faecalis, P. aeuroginosa, S. aureus, normal salivary flora and C. albicans and different concentrations (1, 0.5, 0.25, 0.125 and 0.0625 mg/mL) of calcium hydroxide and colchicine were prepared. The samples were incubated at $37^{\circ}C$ for 24 hours. Then turbidity of the samples was evaluated to determine minimum inhibitory concentration (MIC). Then 0.1 mL of the broth with no turbidity was cultured on solid medium to determine minimum bactericidal concentration (MBC). In order to make sure of the accuracy of the process, positive, negative and standard controls were also prepared.*

Results: *In evaluation of sample turbidity after 24 hours, all the tubes containing calcium hydroxide and positive controls showed complete turbidity. In tubes containing colchicine turbidity was found in all the bacterial categories. Only tubes containing Candida albicans with concentrations of 1, 0.5 and 0.25 mg/mL of colchicine were clear and lower concentrations showed turbidity. In evaluation of formation of colonies on Sab. Dextrose agar, only plates with 1 mg/mL of colchicine showed no growth.*

Conclusion: *Only concentrations of 0.5 and 0.25 mg/mL of colchicine exhibited inhibitory effects and 1 mg/mL exhibited lethal effect on Candida albicans. None of the two drugs exhibited any inhibitory or lethal effects on other microbial strains.*

Key words: *Antibacterial, Calcium hydroxide, Colchicine, Minimum bactericidal concentration, Minimum inhibitory concentration.*

Received: 10 Jul, 2011 **Accepted:** 13 Sep, 2011

Address: Dental Student, Student Research Committee, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Email: refaei@med.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Dental School 2011; 7 (4): 409-417.