

بررسی اثر ضدمیکروبی فتودینامیک تراپی با واسطه ایندوسیانیل گرین بر استرپتوکوک سالیاریوس

چکیده

سابقه و هدف: استرپتوکوک سالیاریوس میکروارگانیسمی است که مکرراً در افراد مبتلا به پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریدنتال از حفره دهان جدا می‌شود. فتودینامیک تراپی نیز به عنوان یک روش درمانی ضدمیکروبی موثر و نوین؛ مورد توجه است و آثار ضدمیکروبی قوی همراه با دسترسی بهتر به مکان‌های غیرقابل دسترسی درمان‌های روتین نشان داده، به علت کم بودن تعداد مطالعات انجام شده بر روی تاثیر فتودینامیک تراپی بر استرپتوکوک سالیاریوس و نتایج متضاد، این تحقیق با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی فتودینامیک تراپی با واسطه ایندوسیانیل گرین بر استرپتوکوک سالیاریوس در دانشکده دندانپزشکی آزاد اسلامی تهران انجام شده است.

مواد و روش‌ها: این تحقیق Experimental بر روی پنج گروه (هر گروه شامل نه نمونه و در مجموع بر روی ۴۵ نمونه) با استفاده از لیزر دایود ۸۱۰ نانومتر و ماده واسطه ایندوسیانیل گرین (پریوگرین) بر روی استرپتوکوک سالیاریوس $7073ATCC$ انجام شد. گروه‌های مورد مطالعه به شرح زیر بود:

- ۱- استرپتوکوک سالیاریوس به تنهایی (کنترل منفی) ۲- استرپتوکوک سالیاریوس با ایندوسیانیل گرین
- ۳- استرپتوکوک سالیاریوس با تابش لیزر ۸۱۰ نانومتر ۴- استرپتوکوک سالیاریوس با واسطه ایندوسیانیل و تابش لیزر ۸۱۰ نانومتر
- ۵- استرپتوکوک سالیاریوس با کلرهگزیدین (کنترل مثبت). تابش لیزر به صورت ممتد و توان ۲۰۰ میلی‌وات در ۶۰ ثانیه با انرژی دانسته

۱۵/۲۸ ژول بر سانتی متر مربع صورت گرفت. معیار تاثیر ضدمیکروبی؛ اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد پس از کشت میکروبی بود که جهت مقایسه آن بین گروه‌ها از آزمون آماری Man-U-Whitney و نرم افزار (SPSS, version ۲۱) استفاده شد.

یافته‌ها: براساس این مطالعه تاثیر لیزر دایود ۸۱۰ نانومتر بر استرپتوکوک سالیاریوس از تاثیر فتودینامیک تراپی (لیزر + ایندوسیانیل)، ایندوسیانیل تنها و کلرهگزیدین به طور معنی دار بیشتر بود. تابش لیزر ۸۱۰ سبب شد رشد باکتری به صفر برسد. پس از لیزر ۸۱۰، براساس میانگین قطر هاله‌های عدم رشد به ترتیب موثرترین‌ها: کلرهگزیدین، لیزر + ایندوسیانیل (فتودینامیک تراپی) و در نهایت ایندوسیانیل بودند، هر چند آزمون آماری تفاوت معناداری میان این سه گروه از جهت تاثیر آنتی میکروبیال نشان نداد.

نتیجه‌گیری: تحت شرایط اجرای این تحقیق، تابش لیزر؛ لیزر + ایندوسیانیل و ایندوسیانیل تنها توانستند از کلونیزاسیون میکروبی بکاهند و در این میان تابش لیزر دایود با طول موج ۸۱۰ نانومتر از نوع Infrared تاثیر ضدمیکروبی بیشتری بر استرپتوکوک سالیاریوس داشت.

واژه‌های کلیدی: فتودینامیک تراپی، ایندوسیانیل گرین، استرپتوکوک سالیاریوس، هاله عدم رشد، لیزر دایود ۸۱۰ nm

ماندانا خطیبی^۱
افشین احمدیان^۲
سیمین لسان^۳
مریم رضایی^۴
هومن ابراهیمی^{۵*}

- ۱- دکتر ماندانا خطیبی دانشیار گروه بیماری‌های دهان؛ فک و صورت و عضو مرکز تحقیقات جمجمه؛ فک و صورت دانشکده دندانپزشکی؛ دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی؛ تهران؛ ایران
- ۲- دکتر افشین احمدیان جراح؛ دندانپزشک
- ۳- دکتر سیمین لسان استادیار گروه بیماری‌های دهان؛ فک و صورت و عضو مرکز تحقیقات جمجمه؛ فک و صورت دانشکده دندانپزشکی؛ دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی؛ تهران؛ ایران
- ۴- دکتر مریم رضایی میکروبیولوژیست؛ دانشکده دندانپزشکی؛ دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی؛ تهران؛ ایران
- ۵- دکتر هومن ابراهیمی؛ استادیار گروه بیماری‌های دهان؛ فک و صورت و عضو مرکز تحقیقات جمجمه؛ فک و صورت دانشکده دندانپزشکی؛ دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی؛ تهران؛ ایران

نویسنده مسئول: دکتر هومن ابراهیمی
پست الکترونیکی:

Hooman.ebrahimi@gmail.com

۰۹۱۲۳۸۹۰۱۸۹

شماره تماس:

پیشینه و هدف

استرپتوکوک سالیواریوس یک استرپتوکوک گرم مثبت اختیاری بی هوازی است که به طور عمده از حفره دهان انسان ها و حیوانات جدا شده و بخشی از فلور طبیعی میکروبی دهان و بزاق است (۱). این باکتری جزو اولین باکتری های فعالی است که در حفره دهانی نوزادان وجود دارد و در سلول های دستگاه تنفسی فوقانی، کولونیزه می گردد (۲) به علاوه در افراد مبتلا به پوسیدگی دندان و بیماری های پرودنتال نیز، به صورت ویژه در حفره دهان کولونیزه می گردد؛ ضمناً در حضور ساکروز می تواند تولید کپسول نماید؛ به همین دلیل این باکتری بیماریزای فرصت طلب پس از استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل از مهمترین باکتری های پاتوژن در پوسیدگی های دندان؛ التهاب لثه؛ عفونت های ناحیه گوش و گلو می باشد و در صورت راهیابی به جریان خون می تواند موجب سپتی سمی در بیماران نوتروپنیک گردد (۳).

غیرفعال سازی میکروبی فتودینامیکی روشی است که در ابتدای قرن بیستم کشف شده و باعث غیرفعال شدن سلول ها، میکروارگانیسم ها و مولکول ها به واسطه نور می شود. در این روش یک ترکیب حساس به نور و یک نور با طول موج خاص باعث تولید واسطه های فعال اکسیژن می شود؛ این واسطه های فعال باعث از بین بردن سلول های هدف از جمله میکروب ها و سلول های تومورال می گردند (۴-۵-۶) از سال ۱۹۲۴ به بعد تحقیقات زیادی روی نتایج فتودینامیک تراپی به عنوان یک روش غیر مهاجم برای درمان سرطان هایی از قبیل کانسر ریه، مری، مثانه و پوست انجام شد و در نهایت Daughterty در سال ۱۹۷۵ توانست با این روش بیماران مبتلا به سرطان پوست را با موفقیت درمان کند. کاربرد این روش اخیراً به طور چشمگیری در رشته دندانپزشکی و برای درمان عفونت های باکتریایی و قارچی (۷)، سرطان دهان و تشخیص بدخیمی های دهان مورد توجه قرار گرفته است. ضمناً به دلیل دسترسی نسبی و ناقص درمان های رایج در حفره دهان استفاده از این روش مناسب به نظر می رسد (۸).

تاریخچه غیرفعال سازی میکروبی فتودینامیکی استفاده از حساسگرهای نوری به منظور حذف میکروب ها به زمان قبل از شیمی درمانی بر می گردد. Paul Ehrlich در ابتدای قرن بیستم با ارزیابی آثار رنگ های

Aniline روی سلول های میکروبی و حیوانی، توانست اصول انتخابی بودن را فرموله کرده و پایه شیمی درمانی جدید را ایجاد نماید. تحقیقات او، اصول غیرفعال سازی میکروبی فتودینامیکی را پایه گذاری نمود (۹).

ایندوسیانین گرین (ICG) نیز یک فتوسنسی تایزر آنیونی است که در طول موج ۸۱۰ تا ۹۴۰ نانومتر فعال شده و منجر به اکسیداسیون نوری می گردد (۱۰). میزان جذب این ماده به محیط حلال، باند به پروتئین های پلاسمایی و غلظت بستگی دارد اثرات کلی شامل تاثیر فتودینامیک و فلورسانس و مقداری نیز به واسطه اثرات گرمایی آن می باشد. ICG در فرم نمک سدیم با سدیم آیودید به میزان ۵٪ ترکیب می شود تا ترکیب را برای کاربردهای پزشکی بهینه سازی نماید. در بسیاری از کاربردهای پزشکی، ICG در غلظت های مختلف در سلول های هدف تزریق می گردد. بیشتر تحقیقات انجام شده در دندانپزشکی در مورد ICG به صورت آزمایشگاهی انجام شده و کاربرد آن در درمان های پرودنتولوژی به نظر می رسد با توجه به جرم های پاتوژن پرودنتال از موفقیت نسبی برخوردار باشد. از طرف دیگر، استفاده از لیزرهای کم توان به همراه فتوسنسی تایزر ICG می تواند اثرات موثری بر باکتری های مختلف بیوفیلم دهان و نیز پاکت های پرودنتال داشته باشد (۱۱-۱۲).

استفاده از اثرات ضد باکتریایی لیزر که مکرراً در مقالات به اثبات رسیده به تاثیرات ایجاد شده بر اثر نور لیزر در سلول هدف، بافت یا ارگانیسم بستگی دارد. این تاثیرات ممکن است فتوشیمیایی، تولید رادیکال های آزاد و دیگر گونه های فعال (فتوگرامی و مکانیسم های کاهشی به واسطه نور)؛ شکستن باندهای شیمیایی یا واکنش های مکانیکی ناشی از نور، امواج شوک که به وسیله پراکندگی پالس تولید می شوند، باشد. عموماً لیزرهای کم توان تنها باعث تاثیرات فتوشیمیایی می شوند. تعدادی از مطالعات نشان داده اند که انواع مختلف لیزر بر میکروارگانیسم های متفاوت اثرات ضد باکتریایی دارند. به ویژه لیزر دیود و Erbium قادر به ایجاد اثرات آنتی باکتریال بر مینا، عاج و بافت های پوسیده هستند (۱۳-۱۴).

با توجه به حضور استرپتوکوک سالیواریوس در دهان و نقش آن در بروز پوسیدگی دندان و بیماری های پرودنتال (۱۵-۱۶) و با توجه

بر سانتی متر مربع با توان ۲۰۰ میلی وات (۰/۲ وات) به مدت ۶۰ ثانیه به صورت ممتد با فاصله کمتر از یک سانتی متر از پلیت تابانده شد.



$$E_D = \frac{P \times t}{A} = \frac{0.2 \times 60}{0.785} = 15.28 \frac{J}{cm^2}$$

$E_D = \text{Energy Density}$
 $P(\text{Power}) = 0.2 W$
 $T(\text{Time}) = 60 s$
 $D(\text{Diameter}) = 1 cm \rightarrow A(\text{Area})$
 $= 0.5^2 \times \pi = 0.785 cm^2$

انرژی دانسیته مناسب برای حذف باکتری‌ها در غیرفعال‌سازی میکروبی توسط فتوداینامیک در محدوده ۳۰-۱۰ ژول بر سانتی متر مربع می‌باشد؛ بر این اساس انرژی دانسیته در محدوده میانی این بازه تنظیم گردید (۱۵/۲۸) که با توان به کار رفته ۰/۲ وات (جهت حذف آسیب بافتی ناشی از تاثیر گرمایی؛ توان می‌بایست کمتر از ۱ وات باشد)؛ زمان تابش در محدوده انرژی دانسیته ۳۰-۱۰ ژول بر سانتی متر مربع که در بازه بین ۱۱۷-۴۰ ثانیه قرار می‌گیرد؛ ۶۰ ثانیه تعیین گردید.

ماده حساس به نور:

ماده حساس به نور ایندوسیانین گرین (Perio Green، ساخت کشور آلمان) بود که داخل حلال دی‌متیل‌سوکساید (DMSO) به غلظت (100mg/ml) تهیه شد. این غلظت در طول موج ۸۱۰ نانومتر می‌تواند موجب فعال‌سازی اکسیداسیون نوری گردد (۶).

به اینکه امروزه فتوداینامیک تراپی به عنوان درمان ضد میکروبی موثر و نوین معرفی گردیده و آثار ضد میکروبی قوی همراه با دسترسی بهتر به مکان‌های غیر قابل دسترسی درمان‌های روتین نشان داده (۵)، به علاوه به علت کم بودن تعداد مطالعات انجام شده بر روی تاثیر فتوداینامیک تراپی بر استرپتوکوک سالیواریوس و نتایج متضاد (۳/۱)، این تحقیق با هدف بررسی اثر ضد میکروبی فتوداینامیک تراپی با واسطه ایندوسیانین گرین بر استرپتوکوک سالیواریوس در دانشکده دندانپزشکی آزاد اسلامی تهران انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق آزمایشگاهی (Experimental) حاضر به صورت *In Vitro* و با مواد و روش‌های زیر انجام شد:

جامعه مورد بررسی شامل پلیت‌های حاوی سویه استاندارد استرپتوکوک سالیواریوس و تعداد نمونه با استفاده از نرم افزار SPSS version ۲۱ (one way Anova power Analysis) با در نظر گرفتن $\alpha = 0.05$ ، $\beta = 0.8$ (۹ نمونه در هر یک از پنج گروه مورد بررسی) و روش نمونه‌گیری مبتنی بر هدف بود.

جمع‌آوری داده‌ها از طریق مشاهدات کشت میکروبی و بررسی هاله عدم رشد صورت گرفت.

سویه استاندارد باکتری:

استرپتوکوک سالیواریوس با کد (ATCC=۷۰۷۳) سویه استاندارد متناسب با گونه‌های جدا شده از حفره دهان بوده که از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه و در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران در محیط Blood agar کشت داده شد (پلیت‌های ساخت شرکت Merk آلمان) و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ C انکوبه گردید.

لیزر:

از لیزر دیود کم توان Infra red دارای پروپ با قطر یک سانتی متر و مساحت ۰/۷۸۵ سانتی متر مربع در طول موج ۸۱۰ (ساخت شرکت Thor انگلستان) استفاده شد. این لیزر با انرژی دانسیته ۱۵/۲۸ ژول

گروه‌های مورد مطالعه

کنترل منفی

۱- استرپتوکوک سالیاریوس به تنهایی

سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند به غلظت $10^8 \times 1/5$ cfu/ml در ۹ پلیت بلادآگار به روش Spread culture پخش و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۲۴-۴۸ ساعت هاله عدم‌رشد تشکیل نگردید. (بدون مداخله)



۲- استرپتوکوک سالیاریوس با ایندوسیانین‌گرین به تنهایی:

سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند به غلظت $10^8 \times 1/5$ cfu/ml به صورت یکنواخت در سطح ۹ پلیت BA به روش Spread culture پخش شد، سپس حفر چهار چاهک در هر پلیت به فواصل مشخص در محل‌های حاوی باکتری و پرکردن چاهک‌ها با ایندوسیانین‌گرین (100mg/ml) انجام و به این ترتیب آماده‌سازی برای انکوباسیون صورت پذیرفت. پلیت حاصل به مدت پنج دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد تا رنگ ایندوسیانین‌گرین زمان کافی برای تماس با باکتری داشته باشد. سپس کلیه پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرارداده شد و سپس؛ تشکیل هاله عدم‌رشد بررسی گردید.

۳- استرپتوکوک سالیاریوس با لیزر دایود ۸۱۰ نانومتر:

سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند به غلظت $10^8 \times 1/5$ cfu/ml در ۹ پلیت BA به روش Spread culture پخش شد سپس لیزر دیود با طول موج 810 نانومتر بر روی چهار ناحیه با فواصل مشخص به مدت ۶۰ ثانیه به صورت ممتد با فاصله کمتر از یک سانتی‌متر از پلیت تابانده شد. سپس کلیه پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرارداده شد و سپس تشکیل هاله عدم‌رشد استرپتوکوک سالیاریوس بررسی گردید.

۴- استرپتوکوک سالیاریوس با واسطه ایندوسیانین‌گرین و لیزر دایود ۸۱۰ نانومتر:

سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند به غلظت $10^8 \times 1/5$ cfu/ml به صورت یکنواخت در سطح ۹ پلیت‌BA به روش Spread culture

کلر هگزیدین :

کلر هگزیدین (CHX) یک ماده با اثرات باکتریواستاتیک و باکتریسید است که بر روی هر دو نوع باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و برخی از ویروس‌های لیپوفیل موثر است. در سال ۱۹۷۰، CHX به‌عنوان بخشی از پیشگیری و درمان بیماری‌های پریودنتال به دلیل اثرات مهارکننده پلاک آن مورد مطالعه و توصیه پژوهشگران قرار گرفت (۱۷). از کلر هگزیدین ۰/۲ درصد (ساخت شرکت بهسا، ایران) در این آزمایش استفاده شد.

اثر ضدمیکروبی:

در این بررسی قطر هاله عدم‌رشد استرپتوکوک سالیاریوس پس از مداخله (در کلیه گروه‌ها به جز کنترل منفی) و بدون مداخله (در گروه کنترل منفی)؛ معیار ارزیابی بود و با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد. هاله عدم‌رشد یک منطقه دایره‌ای در اطراف محل ماده واسطه یا آنتی‌بیوتیک است که در آن کلنی‌های باکتری رشد نمی‌کنند. منطقه مهار می‌تواند برای اندازه‌گیری حساسیت باکتری نیز استفاده شود (۱۸).

جهت اجرای آزمایش؛ سوسپانسیون میکروبی به غلظت استاندارد نیم مک فارلند در چاهک‌های میکروپلیت توسط سمپلر به میزان یک سی‌سی ریخته شد و برحسب گروه مورد نظر ایندوسیانین به همین میزان به سرم اضافه شد. این کار یک بار برای نمونه‌هایی که تحت تابش لیزر قرار گرفتند و یکبار برای نمونه‌هایی که تحت تابش لیزر قرار نگرفتند در محیط استریل انجام شد.



پخش شد، سپس حفر ۴ چاهک در هر پلیت به فواصل مشخص در محل های حاوی باکتری و پرکردن چاهک ها با ایندوسیاینین گرین (100mg/ml) انجام شد. سپس در مرحله بعد لیزر دیود با طول موج 810 نانومتر بر روی چهار ناحیه با فواصل مشخص و به مدت ۶۰ ثانیه به صورت ممتد با فاصله کمتر از یک سانتی متر از پلیت تابانده شد. سپس کلیه پلیت ها در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس تشکیل هاله عدم رشد استرپتوکوک سالیواریوس بررسی گردید.

۵- استرپتوکوک سالیواریوس با کلرگزیدین (کنترل مثبت): سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند به غلظت 10^8 cfu/ml به صورت یکنواخت در سطح ۹ پلیت BA به روش Spread culture پخش شد، سپس حفر چهار چاهک در هر پلیت به فواصل مشخص در محل های حاوی باکتری و پرکردن چاهک ها با کلرگزیدین ۰/۲ درصد محصول شرکت بهسا صورت پذیرفت. سپس کلیه پلیت ها در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس تشکیل هاله عدم رشد استرپتوکوک سالیواریوس بررسی گردید. مراحل کار به شرح زیر دنبال شد:

طرح شماتیک گروه‌های مطالعه

درجه حرارت محیط؛ جنس و واریته باکتری و استریلیزاسیون محیط در این مطالعه برای تمام گروه‌ها؛ مشابه و تحت کنترل بود. در نهایت پس از بررسی تشکیل و اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم‌رشد؛ مقایسه این متغیر میان گروه‌ها از طریق نرم‌افزار آماری SPSS, version (21) و آزمون آماری Man-U-Whitney انجام شد. با توجه به سایز نمونه‌های مورد بررسی و نداشتن توزیع نرمال داده‌ها و استقلال هر گروه؛ این آزمون ناپارامتری جهت ایجاد مطابقت بین گروه‌ها به کارگرفته شد.

یافته‌ها

تعداد نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق؛ ۴۵ نمونه (۹ نمونه در هر یک از پنج گروه مورد بررسی) بود. براساس این مطالعه تاثیر لیزر دیود 810 نانومتر بر استرپتوکوک سالیواریوس از تاثیر فتودینامیک تراپی (لیزر+ایندوسیاین)، ایندوسیاین تنها و کلرگزیدین به‌طور معنی‌دار بیشتر بود. تابش لیزر 810 سبب شد رشد باکتری به صفر برسد. به همین دلیل قطر پلیت معادل قطر هاله عدم‌رشد گزارش گردید (۶۰ میلیمتر). پس از لیزر 810 براساس میانگین قطر هاله‌های عدم‌رشد به ترتیب موثرترین‌ها: کلرگزیدین، لیزر + ایندوسیاین (فتودینامیک تراپی) و در نهایت ایندوسیاین بودند، هر چند آزمون آماری تفاوت معناداری میان این سه گروه از جهت تاثیر آنتی میکروبیال نشان نداد.

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم‌رشد براساس گروه‌های پنج‌گانه

گروه‌ها	میانگین قطر هاله عدم‌رشد (به تعداد تکرارها) برحسب میلیمتر
گروه کنترل منفی	* ۰
با ماده واسطه ایندوسیاین گرین	۵۰/۰۶ ± ۰/۰۷ میلی‌متر
با لیزر دیود ۸۰۸	۶۰ میلی‌متر
با لیزر دیود ۸۰۸ و ایندوسیاین گرین	۵۰/۹۷ ± ۰/۲۵ میلی‌متر
با کلرگزیدین ۰/۲٪	۵۸ ± ۰/۱۸ میلی‌متر
نتیجه آزمون	P > ۰/۰۵

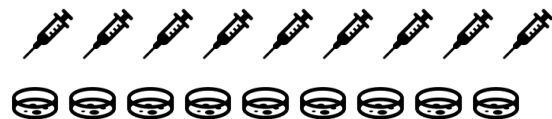
* هاله عدم‌رشدی تشکیل نشد.
(سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد)

کلرگزیدین تابش لیزر پلیت ایندوسیاین گرین

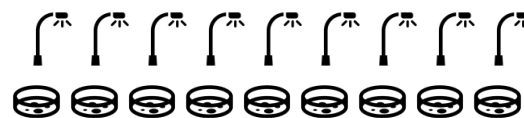
گروه یک:



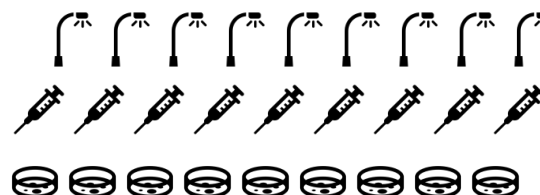
گروه دو:



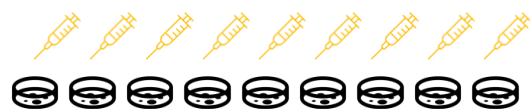
گروه سه:



گروه چهار:



گروه پنج:



بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که میان پنج گروه مورد مطالعه، تاثیر لیزر دیود 810 نانومتر بر استرپتوکوک سالیواریوس از تاثیر فتودینامیک تراپی (لیزر+ایندوسیانین)، ایندوسیانین تنها و کلرگزیدین بیشتر است. تابش لیزر 810 سبب شد رشد باکتری به صفر برسد.

پس از لیزر 810، براساس میانگین قطر هاله‌های عدم رشد به ترتیب موثرترین‌ها: کلرگزیدین، لیزر+ایندوسیانین (فتودینامیک تراپی) و در نهایت ایندوسیانین تنها بودند، هرچند آزمون آماری تفاوت معناداری میان این سه گروه از جهت تاثیر آنتی میکروبیال نشان نداد. تحقیق Panas (15) نیز فقدان کامل رشد استرپتوکوک سالیواریوس پس از تابش لیزر با طول موج 445 نانومتر و کاهش رشد بلافاصله پس از 15 دقیقه را در مقایسه با تابش پنج دقیقه‌ای طول موج 635 نانومتر گزارش کردند. اگرچه در طول موج‌ها و زمان‌های متفاوت تابش، به هر حال از جهت سرکوب کامل رشد باکتری این مطالعه In Vivo همسو با بررسی In Vitro ما می‌باشد.

این محقق و همکاران در مطالعه‌ای دیگر (16) فتودینامیک تراپی را جایگزینی برای استفاده سیستمیک از داروهای ضدباکتری مورد استفاده در درمان‌های پرپودنتال از جمله استرپتوکوک سالیواریوس عنوان کردند، در مطالعه ما نیز گروه لیزر 810 + ایندوسیانین‌گرین (فتودینامیک تراپی) توانست تقریباً به اندازه گروه کلرگزیدین ممانعت رشد باکتریایی بر علیه استرپتوکوک سالیواریوس ایجاد کند. سایر نتایج فتودینامیک تراپی بر علیه ارگاناسم‌های دیگر مانند استافیلوکوک و کاندیدا نیز چنین نتایجی به همراه داشته است (19).

تحقیق سنائی و همکاران (4) در سال 2019 بر روی استافیلوکوک اورئوس؛ فتودینامیک تراپی با واسطه متیلن بلو و ایندوسیانین را بر کاهش تعداد کولونی‌های میکروبی موثر گزارش کرد اما این تاثیر کمتر از کلرگزیدین گزارش شد. در تحقیق حاضر بر روی استرپتوکوک سالیواریوس نیز چنین مشاهداتی وجود داشت. تحقیق Hill و همکاران (20) در سال 2019 نیز از فتودینامیک تراپی با واسطه ایندوسیانین در درمان پرپودنتیت مزمن حمایت نکرده است. ازسویی دیگر kim و همکاران (21) در سال 2018 اظهار داشتند تحت میزان

انرژی مشابه؛ فتودینامیک تراپی می‌تواند آثاری مشابه سایر منابع نوری داشته باشد و در مصارف درمانی مفید واقع گردد.

با اجرای این مطالعه تایید گردید که تابش لیزر تنها، ایندوسیانین تنها و فتودینامیک تراپی نه به یک میزان ولی هر یک قادر به کاهش کولونیزاسیون استرپتوکوک سالیواریوس می‌باشند و از این بابت قابل مقایسه با کلرگزیدین هستند.

مرور سیستماتیک Santin و همکاران (22) در سال 2014 بیان داشت: با توجه به پروتکل‌های استفاده و متدولوژی‌های گوناگون، غیرفعالسازی ضد میکروبی فتودینامیک در دو مورد نتایج مطلوب به همراه نداشته است و الزاماً موثر تر از تابش لیزر بدون واسطه نوری نمی‌باشد. این ادعا تا حدودی نتیجه تحقیق ما را توجیه می‌نماید، هرچند Ilizirov و همکاران (23) در سال 2018؛ با توجه به پدیده شناخته شده و به سرعت در حال رشد مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها که ناشی از مصرف بدون کنترل، بیش از حد و نامناسب آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد، یکی از مناسب‌ترین جایگزین‌ها را فتودینامیک تراپی ضد میکروبی عنوان می‌کند.

از مزایای بررسی حاضر می‌توان به تازگی موضوع، دقت در یکسان سازی شرایط مطالعه آزمایشگاهی (دما، غلظت ثابت سوسپانسیون میکروبی، تکنیک پخش یکنواخت میکروب و...)، تعداد نمونه کافی، استفاده از گروه کنترل و ثبت و گزارش نتایج حقیقی اشاره کرد.

محدودیت این مطالعه؛ In Vitro بودن آن است که به علت تحت کنترل بودن کامل شرایط و کار در محیط ایزوله از تعمیم پذیری نتایج به محیط دهان تا حدودی می‌کاهد.

نتیجه‌گیری

تحت شرایط اجرای این تحقیق، تابش لیزر؛ لیزر+ایندوسیانین و ایندوسیانین تنها توانستند از کولونیزاسیون میکروبی بکاهند و در این میان تابش لیزر دیود با طول موج 810 نانومتر از نوع Infrared تاثیر ضد میکروبی بیشتری بر استرپتوکوک سالیواریوس داشت. هیچگونه تضاد منافع و حمایت مالی در این مطالعه وجود نداشته است. کلیه مراحل تحقیق با هزینه شخصی اجرا شده است.

پیشنهاد:

- ۱- اجرای آزمون با واسطه‌های نوری متفاوت و سایر طول موج‌های ضدمیکروبی لیزر بر روی استرپتوکوک سالیواریوس.
- ۲- اجرای تحقیق In Vivo

تقدیر و تشکر:

از پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران که در اجرای دقیق آزمایش صمیمانه کوشیدند سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Wescombe PA, Heng NCK, Burton JP, Chillcott Nch, Tagg RJ. Streptococcal bacteriocins and the case for streptococcus salivarius as model oral probiotics. *Journal of Future Microbiology*. 2009; 4(7): 819–835.
2. Anatin M, Potapchu K, Vasyl M, Almashi S, Igore Ya, Lomnitsky A, Vitaliy V and et.al. The use of photodynamic therapy in the treatment of dental caries in children of contaminated areas of the ecosystem of the upper Tysa region. *Wydawnic two Aluna*. 2020; (3): 483–488.
3. Goetz Moro M, Franco de carvalho V, Araujo R. Efficacy of antimicrobial photo dynamic therapy (aPDT) for nonsurgical treatment of periodontal disease: a systematic review. *Lasers in Medical Sciences*. 2021; (3): 14–37.
4. Sanaei Z, Azizi A, Rahimi A. The comparison of the effect of photodynamic therapy using two photosensitizer indocyanine green and methylene blue on the colony count of staphylococcus Aureus (In vitro). *International journal of Scientific Research in Dental and Medical Sciences*. 2019; 1(2): 7–13.
5. Fabiano Dalla Lana M, Augusto Kalife A, Pimented O, Dallalana R, Peixoto J. In vitro effect of photodynamic therapy on aggregatibacter actinomycetecomitans and streptococcus sanguinis. *Brazdent* 2011; 22(5): 398–403.
6. Ak A, Kaya o, Turgut D, Gulsdy M. Indocyanine green-mediate photodynamic therapy on glioblastoma cells in vitro. *Journal of applied mathematics, electronics and computers*. 2015; 3(2): 133–135.
7. Neves P.A, Lima L.A, Cristina F, Rodrigues N, Leitao C, Ribeiro CC. Clinical effect of photodynamic therapy on primary carious dentin after partial caries removal. *Braz Oral Res*. 2016; 30(1): 1–8.
8. Gilson D, Ash D, Feather J, W. Brown S. Therapeutic ratio of photodynamic therapy in the treatment of superficial tumors of skin and subcutaneous tissues in man. *British Journal of Cancer*. 2005; 58: 665–667.
9. Sael G, Ng Y, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An invitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on streptococcus intermedius biofilms in root canals, *International endodontic Journal*. 2002; 35(3): 268–274.
10. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against Candida albicans. *Laser Med Sci*. 2010; 25(3): 385–389.
11. Sitia L, Sevieri M, Bonizzi A, Allevi R, Morasso C, Foschi D and et al. Development of Tumor-targeted indocyanine Green-loaded Ferritin Nanoparticles for intraoperative detection of cancers. *Journal of ACS Omega*. 2020; (5): 12035–12045.
12. Rautp CH, Sethi S K, Kohale BR, Mamajiwal A, Warang A. Indocyanine green-mediated photothermal therapy in treatment of chronic periodontitis : A clinico-microbiological study. *J Indian Soc periodontol*. 2018; 22(3): 221–227.
13. Mappangara S, Oktawati S, Chandha M, Hatta R. Antimicrobial properties of laser treatment in periodontal Therapy. *Journal of physics: conference series*. 2018; 1073(5): 1–7.
14. Ize-Iyamu IN, Saheeb BD, Edetanlen BE. Comparing the 810nm diode laser with conventional surgery in orthodontic soft tissue procedures. *Ghana Med J*. 2014; 47(3): 107–111.
15. Panas M. Efficiency of Applying of Low-Level Laser Radiation Against Streptococcus Salivarius In Case of Hard Dental Tissue Lesion. *Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine*; 2014(3): 75–80.
16. Panas M, Baryliyak A, Korniychuk O. Application of low-level laser radiation with Tio, Ag/Tio and S/Tio on streptococcus salivarius isolated from the oral cavity. *Curr. Issues Pharm. Med. Scil*; 2014; 27 (3): 148–150.
17. Heidari M, Bardakci AG, Prus HR, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L. Comparing Effect Of 0.06%, 0.12% And 0.2% Chlorehexidine On Plaque, Bleeding And Side Effect In An Experimental Gingivitis Model : A Parallel Group, Double Mask Randomized Clinical Trial. *BMC Oral Health*. 2017; (17): 118–123.

18. MacDonald KW. The Role Of Streptococcus Salivarius As a Modulator Of Homeostasis In The Oral Cavity. Semantischolar.org. The University Of Western Ontario (Thesis for the degree in master of science). 2015;2-3.
19. Guzel T, Ayse K, Ayca U, Olkar A. The In Vitro Effect Of Antimicrobial Photodynamic Therapy on Candida and Staphyoccus Biofilms . Turk Journal Med Science. 2018;(48):873-879.
20. Hill G, Dehn C, Hinz AF, Frentzen M, Meister J. Indocyanine green-based adjunctive antimicrobial photodynamic therapy for treating chronic periodontitis: A randomized clinical trial. photodiagnosis and photodynamic therapy. 2019;26:29-35.
21. Kim J, Park H, Lee J, Seo H, Lee S. Antimicrobial Effect On Streptococcus Mutans In Photodynamic Therapy Using Different Light Source. J Korean Acad Pediatric Dent. 2018;45(1):82-89.
22. Santin G.C., Oliveira D., Galo R., Brosatto M.C., Corona S. Antimicrobial Photodynamic Therapy And Dental Plaque : A Systematic Review Of Literature .Scientific World Journal, Sao Paulo ,Brazil. 2014;1-9.
23. Ilizirov Y, Formanovsky A, Mikhura I, Paitan Y, Nakonechny F. Effect Of Photodynamic Antibacterial Chemotherapy Combined Antibiotics On Gram-Positive And Gram-Negative Bacteria .Molecules Journal. 2018;(23)3152:1-19.