Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Antibacterial Effect of Arginine, Protamine, Aqueous Extracts of Green Tea, and Aloe vera against *Escherichia coli*

Sanaz Najafi[1], Abolfazl Davoodabadi[2], Sohrab Kazemi[3], Maryam Ghasempour[4*]

[1] Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[2] Infection Diseases Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[3] Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[4] Oral Health Research Center, Institute of Health, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 04 January 2022
Revised: 14 May 2022
Accepted: 28 May 2022
Published Online: 10 October 2022

**** Correspondence to:***
Maryam Ghasempour
Oral Health Research Center, Institute of Health, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
Email:
ma_ghasempour_ir@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: *E. coli* is one of the failure factors in the pulpectomy of primary and permanent teeth. It is also responsible for many infectious diseases in Humans. This study aimed to determine antibacterial effect of arginine, protamine, aqueous extract of green tea, and Aloe vera against *Escherichia coli* (*E. coli*).

Material & Methods: Aqueous extract of green tea, Aloe vera, and protamine with a concentration of 400 mg/ml, and arginine at a concentration of 160 mg/ml were used in this experimental study. *E. coli* was cultured on Mueller-Hinton broth and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the test materials against this microorganism was determined using micro-dilution test. Sodium hypochlorite 2.5% was used as a positive control.
(Ethic code: 9643822)

Findings: It was found that protamine had the highest antibacterial activity (with MIC and MBC 0.62 mg/mL) and aqueous extract of green tea showed the lowest antibacterial activity against *E. coli* (with MIC100 mg/ml and MBC 200 mg/ml). Positive control (sodium hypochlorite 2.5%) showed better antibacterial activity against *E. coli* compared to other test materials.

Discussion & Conclusion: Apart from sodium hypochlorite, among the tested materials, protamine had the maximum effect and aqueous extract of aloe vera, arginine, and aqueous extract of green tea showed the lowest antibacterial effect against *E. coli*., respectively.

Keywords: Aloe vera, Arginine, *Escherichia coli*, Protamine, Tea

➢ **How to cite this paper**

Najafi S, Davoodabadi A, Kazemi S, Ghasempour M. Antibacterial Effect of Arginine, Protamine, Aqueous Extracts of Green Tea, and Aloe Vera against *Escherichia coli*. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(4): 56-65.

© The Author(s) Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بررسی تأثیر آنتی‌باکتریال آرژنین، پروتامین، عصاره‌های آبی چای سبز و آلوئه‌ورا بر باکتری اشریشیاکلای

ساناز نجفی[۱]، ابوالفضل داوودآبادی[۲]، سهراب کاظمی[۳]، مریم قاسم‌پور[۴]*

[۱] کمیتهٔ تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۲] مرکز بیماری‌های عفونی گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۳] مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکدهٔ سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۴] مرکز تحقیقات سلامت دهان، پژوهشکدهٔ سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۷
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۷/۱۸

نویسنده مسئول:
مریم قاسم پور
مرکز تحقیقات سلامت دهان، پژوهشکدهٔ سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

Email:
ma_ghasempour_ir@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باکتری E.coli یکی از عوامل شکست در درمان پالپ دندان‌های شیری و دائمی است؛ همچنین این میکروارگانیسم عامل بسیاری از بیماری‌های عفونی در انسان است. هدف از این مطالعه تعیین تأثیر آنتی‌باکتریال آرژنین، پروتامین، عصارهٔ آبی چای سبز و آلوئه‌ورا بر سویهٔ استاندارد این باکتری است.

مواد و روش ها: در این مطالعهٔ آزمایشگاهی، از عصارهٔ آبی چای سبز و آلوئه‌ورا و پروتامین با غلظت ۴۰۰ mg/ml و آرژنین با غلظت ۱۶۰ mg/ml استفاده شد. باکتری اشریشیاکلای در محیط مولر هینتون براث کشت گردید و به‌منظور تعیین MIC(حداقل غلظت مهاری) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) مواد آزمایش شده علیه باکتری اشریشیاکلای، آزمون میکرودایلیشن صورت گرفت. از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها: از میان مواد آزمایش شده، پروتامین بیشترین اثر ضدباکتریایی (با MIC و MBC برابر ۰/۶۲ mg/ml) و عصارهٔ آبی چای سبز کمترین اثر ضدباکتریایی (با MIC برابر ۱۰۰mg/ml و MBC برابر ۲۰۰mg/ml) را علیه اشریشیاکلای داشت. هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌عنوان کنترل مثبت در مقایسه با دیگر مواد آزمایش شدهٔ این مطالعه، بیشترین تأثیر ضدمیکروبی علیه این نوع باکتری را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: از میان مواد آزمایش شده جز هیپوکلریت سدیم به‌عنوان کنترل مثبت، به‌ترتیب پروتامین بیشترین تأثیر و عصارهٔ آلوئه‌ورا، آرژنین و عصارهٔ چای سبز به‌ترتیب کمترین تاثیر ضدمیکروبی علیه باکتری اشریشیاکلای را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آرژنین، آلوئه‌ورا، اشریشیاکلای، پروتامین، چای

استناد: نجفی، ساناز؛ داوود آبادی، ابوالفضل؛ کاظمی، سهراب؛ قاسم پور، مریم. بررسی تأثیر آنتی‌باکتریال آرژنین، پروتامین، عصاره‌های آبی چای سبز و آلوئه‌ورا بر باکتری اشریشیاکلای. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۱؛۳۰(۴): ۶۵-۵۶.

حق‌مؤلف © نویسندگان
ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /آبان ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۴، ۶۵-۵۶

مقدمه

اشریشیاکلای نوعی باسیل گرم منفی بی‌هوازی اختیاری از خانوادهٔ انتروباکتریاسه است. این باکتری هنوز یکی از اصلی‌ترین علل انواع عفونت در انسان به شمار می‌آید. اشریشیاکلای عامل بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت مجاری ادراری در همهٔ رده های سنی و عفونت روده‌ای یا اسهال، مننژیت و عفونت خون است (۱,۲). آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی مانند کوتریموکسازول، سفالوسپورین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، نالیدیکسیک اسید و... در درمان عفونت ناشی از این باکتری مصرف می‌شود؛ اما مقاومت آنتی‌بیوتیکی به علت مصرف نابجا، به‌طور چشمگیری در میان گونه‌های اشریشیاکلای افزایش‌یافته است (۴-۲).

اشریشیاکلای در کانال ریشهٔ دندان‌های شیری و دائمی و عفونت‌های اندودنتیک نیز یافت می‌گردد (۵). این باکتری در دیوارهٔ خود اندوتوکسین دارد که هنگام تکثیر یا مرگ سلولی، آن را آزاد می‌کند و یک ارتباط مهمی میان سطح اندوتوکسین و علامت‌دار شدن بافت پالپ و انتهای ریشه نشان داده شد؛ بنابراین، اندوتوکسین این باکتری یکی از عامل های اتیولوژیک بیماری پالپ و عفونت انتهای ریشه است. اندوتوکسین می‌تواند ترشح نوروترانسمیترها و محصولات وازواکتیو در بافت انتهای ریشه و انتهای پایانهٔ عصبی را افزایش دهد و باعث ایجاد درد و تحریک سلول‌های میزبان برای ترشح پروستاگلاندین E2 شود که این می تواند روی استئوکلاست‌ها تأثیر بگذارد و باعث ایجاد واکنش التهابی پری‌اپیکال گردد (۸-۵).

هیپوکلریت سدیم خاصیت باکتری‌کشی وسیع الطیفی دارد و می‌تواند به‌سرعت انواع باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را بکشد و از غلظت بالاتر آن برای کشتن اسپورباکتری‌ها می‌توان استفاده کرد .خاصیت ضدباکتریایی هیپوکلریت سدیم به غلظت آن بستگی دارد. این ماده شستشودهنده، قوی و ارزان و نیز استفاده از آن آسان است. این محلول به‌عنوان یک مادهٔ ضدباکتریایی مؤثر و همچنین برای انحلال بافت‌های زنده و غیرزنده طی درمان کانال ریشه به کار می‌رود. ترس از سمیت هیپوکلریت سدیم، به‌عنوان یک محرک انساج اطراف ریشه، به تردید در استفاده از آن منجر شده است (۱۱-۸).

آرژنین در درمان نوروپاتی محیطی ، افزایش حساسیت عاج و کنترل پوسیدگی استفاده می‌شود. بسیاری از باکتری‌ها ازجمله استرپتوکوک‌ها، لاکتوباسیل‌ها و اسپیروکت‌ها، آرژنین را به اورنیتین، آمونیاک و CO_2 کاتابولیزه می‌کنند. تولید آمونیاک می‌تواند محیط را قلیایی کند و تأثیر مثبتی بر بالانس میان از دست رفتن مواد معدنی و دوباره معدنی شدن داشته باشد ؛ همچنین اثر هم‌افزائی با فلوراید در مهار کردن استرپتوکوک موتانس دارد. هزینهٔ اثربخشی این محصولات در کاهش پوسیدگی بالا است (۱۴-۱۲).

پروتامین خاصیت ضدمیکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها و مخمرها دارد. از میان باکتری‌ها، اشریشیاکلای بیشترین حساسیت را نسبت به پروتامین دارد. خاصیت ضدباکتریایی بیشتر پپتیدهای پلی کاتیونیک، بیشتر مرتبط با تخریب دیوارهٔ سلولی باکتری‌ها است. سازوکار فعالیت ضدمیکروبی پروتامین واکنش الکترواستاتیک میان بار مثبت پروتامین و بار منفی پوشانندهٔ سلول است که باعث کشتن یا جلوگیری از رشد باکتری، از طریق نشت K^+، ATP و آنزیم‌های داخل سلولی و درنتیجه اختلال در تنفس سلولی و سازوکار ساخت پروتئین می‌شود . فعالیت باکتریوسیدال پروتامین علیه گونه‌های مختلف باکتری به غلظت پروتامین و زمان نهفتگی باکتری بستگی دارد (۱۷-۱۵).

با توجه به افزایش روزافزون مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، استفاده از مواد گیاهی در مطالعات مختلف به‌عنوان مواد ارزان و در دسترس پیشنهادشده است. مواد گیاهی بی‌ضرر و غیرسمی هستند و خواص

ضدباکتریایی نیز دارند (۱۸). مواد آزمایش شده در این تحقیق به‌عنوان نوشیدنی و دارویی در درمان بیماری‌های مختلف معرفی گردیده‌اند و در دوز تعریف‌شده واکنش سمی از آن ها در تحقیقات عنوان نشده است؛ همچنین در همراهی با بعضی داروها و مواد شیمیایی می‌توانند موجب افزایش اثر آنتی‌باکتریال آن ها شوند (۲۱-۱۸). چای سبز خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (اشیرشیاکلای، انترکوک‌ها و سالمونلا) و بعضی قارچ‌ها (کاندیدا آلبیکنز) و ویروس‌های متنوعی مانند HIV، هرپس و آنفولانزا دارد. چای سبز می‌تواند موجب آسیب به غشای باکتری و ممانعت از تشکیل بیوفیلم و مهار تولید توکسین توسط باکتری و مهار ساخت اسید چربمی گردد که به‌عنوان جزئی از دیوارهٔ سلولی بعضی باکتری‌ها و منبع انرژی است؛ همچنین با مهار فعالیت آنزیم‌ها، می تواند متابولیسم و تولید انرژی باکتری‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۲۳و۲۲).

عصارهٔ برگ آلوئه‌ورا فعالیت فارموکولوژیک متنوعی مانند ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدالتهابی، آنتی‌توکسینی، ضدتوموری، ترمیم‌کنندهٔ زخم، کاهندهٔ قند خون و تقویت دستگاه ایمنی دارد عصارهٔ آلوئه‌ورا در غلظت‌های بالا در درمان زخم آفتی راجعه، لیکن پلان دهانی، کاندیدیازیس دهانی، ساب‌موکوزال فیبروزیس دهانی، موکوزیت ناشی از رادیوتراپی، سندرم سوختگی دهان، خشکی دهان و در درمان ریشه به‌عنوان داروی داخل کانال در میان جلسات درمان به کار برده می‌شود. کاربرد عصارهٔ آلوئه‌ورا در خمیردندان و دهان‌شویه‌ها از پوسیدگی دندان جلوگیری می‌کند و میزان پلاک دندانی را از طریق خاصیت ضدباکتریایی منحصربه‌فردش کاهش می‌دهد (۲۶-۲۴).

با توجه به اینکه آلودگی کانال ریشهٔ دندان‌های شیری و دائمی با باکتری اشرشیاکلای، از عوامل دخیل در شکست درمان پالپ است و همچنین این میکروارگانیسم عامل بسیاری از بیماری‌های عفونی است که مقاومت آن به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز گزارش‌شده است، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر آنتی‌باکتریال آرژنین، پروتامین، عصارهٔ آبی چای سبز و آلوئه‌ورا بر باکتری اشریشیاکلای است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی است که در سال ۱۳۹۷، با کد ۹۶۴۳۸۲۲ در دانشگاه علوم پزشکی بابل تأییدشده است.

تهیهٔ عصاره‌ها؛ تهیهٔ عصارهٔ چای سبز: به ۱۰۰ گرم پودر خشک‌شدهٔ برگ چای سبز (شرکت رفاه لاهیجان) ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و پس از بسته شدن دهانهٔ ارلن با فویل، به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه shaker labent (311DS, America) قرار داده شد. پس از عبور محلول از کاغذ صافی واتمن نمرهٔ ۴۲، در پلیت شیشه‌ای ریخته شد؛ سپس داخل دستگاه آون (shimifann, E.O155, England) با دمای ۴۶ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۷۲ ساعت، به‌منظور تبخیر شدن حلال نگهداری گردید. عصاره با قاشقک و تیغ بیستوری از کف اسلب شیشه‌ای جدا شد و برای نگهداری در ظرف استریل در دمای ۴ درجه در یخچال نگهداری گردید.

تهیهٔ عصارهٔ آلوئه‌ورا: به ۱۰۰ گرم پودر خشک‌شده از قسمت ژله‌ای برگ آلوئه‌ورای تازه، تهیه‌شده از دانشکدهٔ کشاورزی ساری، ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و دهانهٔ ارلن با فویل بسته شد و پس از قرار دادن در دستگاه shaker labent به مدت ۷۲ ساعت، محلول از کاغذ صافی واتمن نمرهٔ ۴۲ عبور و در داخل پلیت‌های شیشه‌ای قرار داده شد؛ سپس داخل دستگاه آون با دمای ۴۶ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت به منظور تبخیر حلال نگهداری گردید. عصاره از کف اسلب جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه در یخچال نگهداری شد.

تهیهٔ غلظت ۴۰۰mg/ml عصارهٔ چای سبز و آلوئه‌ورا: به‌طور جداگانه عصاره‌های چای سبز و آلوئه‌ورا در

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / آبان ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۴، ۶۵-۵۶

اندازه‌های ۰/۴ گرم با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم (Sartorius-Germany) وزن گردید و در میکرو پلیت ریخته شد؛ سپس به هرکدام ۱ میلی‌لیتر محیط BHI، در شرایط استریل اضافه گردید (۲۷).

تهیهٔ پروتامین با غلظت‌های ۴۰۰mg/ml و ۸۰mg/ml: به‌طور جداگانه ۰/۴ گرم و ۰/۰۸ گرم پروتامین (Merk, Germany) با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه گرفته شد و در پلیت‌های استریل قرار گرفت؛ سپس به هرکدام ۱ میلی‌لیتر محیط BHI (Sigma, Germany) اضافه گردید و پس از حل شدن به‌وسیلهٔ فیلتر سرسرنگ، فرایند فیلتراسیون آن صورت گرفت و محلول پروتامین در لولهٔ استریل نگهداری شد (۲۷).

تهیهٔ آرژنین با غلظت‌های ۲۰mg/ml و ۱۶۰mg/ml: به‌طور جداگانه ۰/۰۲ گرم و ۰/۱۶ گرم آرژنین (Merk, Germany) با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه گرفته و در پلیت‌های استریل قرار داده شد؛ سپس به هرکدام ۱ میلی‌لیتر محیط BHI اضافه گردید و پس از حل شدن به‌وسیلهٔ فیلتر سرسرنگ فرایند فیلتراسیون صورت گرفت و محلول آرژنین در لولهٔ استریل نگهداری شد (۲۷).

کشت سویهٔ استاندارد باکتری: ابتدا باکتری اشریشیاکلای به‌صورت پودر از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری گردید و سپس با استفاده از محیط کشت مایع مولر هینتون براث (Merk, Germany) به‌صورت محلول قابل‌کشت درآورده شد و در محیط کشت مولر هینتون براث و محیط کشت بلاد آگار در کنار شعله کشت گردید و در انکوباتور (Fan azam goster, Qallenhamr com, England) قرار گرفت. باکتری اشریشیاکلای در محیط مکانکی آگار و بلاد آگار (Merk, Germany) و محیط مایع به‌خوبی رشد کرد و ازآنجاکه کلونی‌های صورتی و بزرگ مشاهده شد، لاکتوز مثبت بودن آن نیز تأیید گردید.

آزمون میکرودایلیشن برای اشریشیاکلای: به همهٔ چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به‌جز چاهک اول مربوط به پروتامین و آرژنین و عصاره‌های آزمایش شده، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث ریخته شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از مواد مورد آزمایش آرژنین (۲۰mg/ml)، پروتامین (۸۰mg/ml)، عصارهٔ آبی چای سبز و آلوئه‌ورا (۴۰۰mg/ml) در اولین چاهک مربوط به هر ردیف ریخته شد؛ سپس به‌منظور رقیق‌سازی سریال آرژنین، پروتامین و عصارهٔ چای سبز و آلوئه‌ورا به نسبت ۱:۲، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول پس از چند بار مخلوط کردن به چاهک دوم اضافه گردید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم به چاهک سوم ریخته شد.

این کار تا چاهک ۱۲ صورت گرفت و ۱۰۰ میکرولیتر آخر بیرون ریخته شد. برای رقیق‌سازی هیپوکلریت به‌عنوان کنترل مثبت در این مطالعه، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت BHI به همهٔ ۱۲ چاهک اضافه گردید و به چاهک اول نیز ۱۰۰ میکرولیتر هیپوکلریت ۲/۵٪ (۲ mg/ml) افزوده شد تا غلظت هیپوکلریت ۲/۵ درصد (۱ mg/ml) به‌دست آید؛ سپس به‌منظور رقیق‌سازی سریال، روش بالا تکرار گردید. برای کنترل منفی این آزمایش در همهٔ خانه‌های چاهک ردیف آخر، ۱۰۰ میکرولیتر محیط BHIریخته شد. این آزمون برای هر یک از مواد مورد آزمایش ۳ بار تکرار گردید. علت تکرار آزمایش، افزایش دقت کار و تکرارپذیر بودن نتایج بوده است.

یک سوسپانسیون از باکتری اشریشیاکلای (ATCC:25922) با غلظت نهایی $1/5 \times 10^8$ CFU/ml (معادل کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند) در سرم فیزیولوژی تهیه شد و به همهٔ چاهک‌ها ۱ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اشریشیاکلای اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد قرار داده شد. به‌منظور تعیین کمینهٔ غلظت مهاری (MIC) و کمینهٔ غلظت کشندگی (MBC) باکتری اشریشیاکلای توسط مواد مورد آزمایش، پس از تهیهٔ مواد و سوسپانسیون میکروبی و ریختن آن‌ها در چاهک‌های میکروپلیت، میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت.

پس از این زمان، آخرین چاهکی (غلظتی) که در آن رشد و کدورت مشاهده نگردید، به‌عنوان MIC (کمینهٔ غلظت بازدارندگی) در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC (کمینهٔ غلظت کشندگی) مواد آزمایش شده، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت داخل چاهک‌هایی که رشد نداشتند، روی پلیت بلاد آگار یا مکانکی آگار کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردید. چاهکی (غلظتی) که پلیت آن کاهش رشد ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها را نشان داد، به‌عنوان کمینهٔ غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (۲۸). برای صحت آزمایش، این آزمایش ۳ بار تکرار گردید.

یافته ها

محدودهٔ MIC بر اساس جدول شمارهٔ ۱، برای مواد مورد آزمایش بین ۱۰۰- ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. باکتری اشریشیاکلای نسبت به آرژنین، پروتامین، عصارهٔ آبی چای سبز و عصارهٔ آبی آلوئه‌ورا با MIC به‌ترتیب ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر و ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حساس بوده و نسبت به پروتامین بیشترین حساسیت (با MIC برابر ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و نسبت به عصارهٔ آبی چای سبز کمترین حساسیت (MIC برابر ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را نشان داد هیپوکلریت سدیم به‌عنوان کنترل مثبت اثر مهاری خوبی علیه این باکتری داشت.

محدودهٔ MBC (جدول شمارهٔ ۱) مواد آزمایش شده علیه باکتری اشریشیاکلای ۲۰۰ – ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود که کمترین میزان آن مربوط به پروتامین (۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و بیشترین میزان آن مربوط به عصارهٔ آبی چای سبز (۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اختصاص داشت.

جدول شمارهٔ ۱. کمینهٔ غلظت مهاری و کمینهٔ غلظت کشندگی مواد آزمایش شده علیه باکتری اشریشیاکلای

میکرودایلیشن / مواد آزمایش شده	کمینهٔ غلظت مهاری (MIC) (mg/ml)	کمینهٔ غلظت کشندگی (MBC) (mg/ml)
پروتامین	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵
عصارهٔ آبی آلوئه‌ورا	۳/۱۲۵	۱۲/۵
آرژنین	۲۰	۲۰
عصارهٔ آبی چای سبز	۱۰۰	۲۰۰
کنترل مثبت (هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد)	۰/۳۱۲ درصد (۰/۱۲۵mg/ml)	۰/۳۱۲ درصد (۰/۱۲۵mg/ml)

بحث و نتیجه‌گیری

در دهه‌های اخیر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌طور چشمگیری در میان گونه‌های اشریشیاکلای افزایش‌یافته است، به‌طوری‌که روند غیرمنتظره‌ای از مقاومت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی در میان سویه‌های اشریشیاکلای در سطح جهان گزارش‌شده است. علاوه بر اشریشیاکلای‌های بیماری‌زا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است سویه‌های اشریشیاکلای فلور طبیعی روده را نیز درگیر کند و به این ترتیب، مخزن بزرگی از گونه‌های مقاوم ایجاد کند(۱).

این مطالعه نشان داد که همهٔ مواد آزمایش شده خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری اشریشیاکلای داشتند. غیر از هیپوکلریت سدیم، پروتامین، عصارهٔ آبی آلوئه‌ورا، آرژنین و عصارهٔ آبی چای سبز بیشترین اثر مهاری علیه ای‌کولای داشتند.

طی روند پاک‌سازی کانال ریشهٔ دندان، گذشته از عملکرد شستشودهنده ها به‌عنوان یک جریان فیزیکی که منجر به خروج دبری‌ها و بقایای پالپی از کانال می‌شود، عملکرد شیمیایی شستشودهنده‌ها، نظیر باکتری‌کشی که باعث از بین بردن میکروارگانیسم‌های داخل کانال می‌گردد، نیز اهمیت دارد (۲۹).

باکتری‌ها مهم‌ترین عامل در ایجاد بیماری‌های پالپ و

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / آبان ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۴، ۶۵-۵۶

عفونت‌های اطراف ریشه هستند و شدت التهاب در این بافت‌ها با تعداد میکروارگانیسم‌ها در دستگاه کانال ریشه ارتباط مستقیم دارد؛ بنابراین، اساس انجام درمان ریشهٔ موفقیت‌آمیز و با پیش‌آگهی طولانی‌مدت، پاک‌سازی کانال ریشه از باکتری و محصولاتشان است. باکتری اشریشیاکلای از باکتری‌های دخیل در ضایعات پایدار انتهای ریشه است که در کانال ریشهٔ دندان شیری و دائمی یافت می‌شوند (۸-۵).

هیپوکلریت سدیم از رایج‌ترین مواد شستشودهندهٔ کانال ریشه است که در درمان ریشه استفاده می‌گردند. این ماده خواص ضدمیکروبی بالا و همچنین سمیت دارد که هر دو تابعی از غلظت آن است. این ماده قادر به انحلال بافت‌های نکروتیک و بر بیشتر میکروارگانیسم‌ها مؤثر است (۱۱-۸).

اخیراً دانشمندان به دنبال معرفی ترکیبی با سمیت کمتر و نیز دارای خاصیت ضدمیکروبی مناسبی هستند تا به‌عنوان شستشودهندهٔ کانال ریشه معرفی کنند. استفاده از داروهای گیاهی با توجه به طبیعی بودنشان و آثار جانبی کمتر، امروزه توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۱۸)؛ بنابراین، در این مطالعه تأثیر آنتی‌باکتریال آرژنین، پروتامین، عصارهٔ آبی چای سبز و آلوئه‌ورا بر باکتری اشریشیاکلای بررسی شد تا بر اساس نتیجهٔ آن بتوان ترکیب مناسب را پیشنهاد کرد.

این مطالعه نشان داد که آرژنین، پروتامین، عصارهٔ آبی چای سبز و عصارهٔ آبی آلوئه‌ورا خواص ضدباکتریایی مناسبی علیه باکتری اشریشیاکلای دارند (به‌ترتیب با MIC برابر ۲۰mg/ml، ۰/۶۲۵mg/ml، ۱۰۰mg/ml، ۳/۱۲mg/ml) و از میان مواد آزمایش شده، جدا از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (با MIC و MBC برابر ۰/۳۱۲ درصد)، پروتامین فعالیت مهاری بهتری علیه این باکتری نشان داد و عصارهٔ آبی آلوئه‌ورا در درجهٔ دوم قرار دارد.

الکساندر و همکاران در یک مطالعهٔ مروری در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که آرژنین تأثیر ضدباکتریایی علیه بعضی از باکتری‌ها ازجمله اشریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس دارد. آنان بیان کردند، این خاصیت ممکن است مرتبط با افزایش خاصیت فاگوسیتوز و افزایش تولید نیتریت و نیترات باشد که نتیجهٔ این مطالعه با نتیجهٔ مطالعهٔ ما همخوانی دارد (۳۰). سپاهی و همکاران نشان دادند، کمینهٔ غلظت مهاری آرژنین علیه ای‌کولای ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. این عدد پایین‌تر از مطالعهٔ ما است که می‌تواند به دلیل روش‌های آزمایشگاهی متفاوت باشد (۳۱).

استامپ و همکاران در یک مطالعهٔ مروری در سال ۱۹۹۷، با بررسی اثر پروتامین بر رشد باکتری اشریشیاکلای به این نتیجه رسیدند که پروتامین باعث توقف رشد اشریشیاکلای از طریق تخلیهٔ +K و ATP می‌شود (۳۲). ازیز و همکاران در سال ۲۰۱۹ نیز، تأثیر آنتی‌باکتریال پروتامین بر میکروارگانیسم‌های جداشده از زخم‌های پای بیماران دیابتیک ازجمله ای‌کولای را گزارش کردند (۳۳). نتیجهٔ مطالعهٔ آنان در ارتباط با خاصیت آنتی‌باکتریال پروتامین با نتیجهٔ مطالعهٔ ما همخوانی دارد. مطالعهٔ ترولستراپ نشان داد که پروتامین در غلظت ۵۰ تا ۱۰۰۰۰ μg ml−1 اثر مهاری بر رشد ای‌کولای دارد (۳۴). بیشتر مطالعات انجام‌شده دربارهٔ با اثر آنتی‌باکتریال پروتامین بر ای‌کولای، به اثر سینرژیستی آن با دیگر داروها و سازوکار اثر آن ها اشاره دارند.

مطالعهٔ مروری جیگیشا و همکارانش در سال ۲۰۱۲ و مطالعهٔ مروری استنمن و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که عصارهٔ چای سبز خاصیت ضدمیکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری گرم مثبت و گرم منفی (مانند اشریشیاکلای، گونه‌های سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های انترکوکوس)، بعضی قارچ‌ها (مانند کاندیدا آلبیکنس) و ویروس های متنوعی (مانند HIV، هرپس سیمپلکس و آنفولانزا) دارد (۳۶، ۳۵). پروز و همکاران در سال ۲۰۱۹، با مطالعه روی میکروارگانیسم‌های مقاوم به درمان، از عصارهٔ چای سبز و ترکیب جنتامایسین و epigallocatechingallate (EGCG) که ترکیب استخراج‌شده از چای بود، استفاده کردند.MIC عصارهٔ گیاه علیه ای‌کولای ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و اثر MBC نداشت. اثر سینرژیستی جنتامایسین و EGCG علیه ای کولای بیشتر از عصارهٔ چای بود (۳۷)؛ همچنین نورمندی

و همکاران در سال ۲۰۱۵ در یک مطالعهٔ مروری، تأثیر مثبت چای بر ای‌کولای و اثر سینرژیستی با بعضی از آنتی بیوتیک‌ها را گزارش کردند (۳۸). ازآنجاکه از روش‌های متفاوتی در تحقیقات به‌منظور بررسی خواص آنتی باکتریال عصارهٔ چای سبز استفاده شد، نتایج عددی ذکرشده با تحقیق ما یکسان نبود.

ردا و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه ای با مقایسهٔ خاصیت ضدمیکروبی عصارهٔ آلوئه‌ورا و زنجبیل وVinca major علیه باکتری گرم منفی (مانند سامونلا تیفی و اشریشیاکلای) و باکتری گرم مثبت (مانند استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیا) نشان دادند که عصارهٔ آلوئه‌ورا بیشترین خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری اشریشیاکلای (با MIC برابر ۰/۲mg/ml) دارد (۳۹). هاکو و همکاران (۲۰۱۹) میزان MIC عصارهٔ اتانولی آلوئه‌ورا علیه ای‌کولای را ۶۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۴۰). های و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از آلوئه‌ورای تخمیرشده بر زخم سوختگی در موش، به این نتیجه رسیدند که استفاده از این گیاه به ترمیم زخم و مهار رشد میکروارگانیسم‌ها ازجمله ای‌کولای کمک می‌کند (۴۱). اعداد گزارش‌شده در تحقیقات بالا با مطالعهٔ ما متفاوت است. علت آن می‌تواند در روش‌های آزمایشگاهی متفاوت و نوع آلوئه‌ورای انتخاب‌شده باشد.

در این مطالعه که از هیپوکلریت سدیم (شستشودهندهٔ استاندارد) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد، فعالیت ضدمیکروبی بالاتری از مواد آزمایش شده علیه باکتری اشریشیاکلای نشان داد؛ زیرا یک محصول پالایش‌شدهٔ صنعتی است؛ بنابراین، اگر مواد آزمایش شده در این مطالعه پالایش و تخلیص شوند یا با مواد خاصی ترکیب گردند، ممکن است فعالیت ضدمیکروبی بیشتر و بهتری نشان دهند.

این یک مطالعهٔ اولیه به‌منظور بررسی فعالیت ضدباکتریایی آرژنین، پروتامین، عصارهٔ آبی چای سبز و آلوئه‌ورا بر باکتری اشریشیاکلای در محیط آزمایشگاه است. مطالعات بیشتری برای تعمیم آن به کلینیک پیشنهاد می‌شود. جدا از هیپوکلریت سدیم، به‌ترتیب پروتامین، عصارهٔ آبی آلوئه‌ورا، آرژنین و عصارهٔ آبی چای سبز بیشترین تا کمترین فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری اشریشیاکلای نشان دادند. این مطالعه نشان داد که همهٔ مواد آزمایش شده خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری اشریشیاکلای داشتند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل به پاس حمایت‌هایشان از این تحقیق که حاصل پایان‌نامه دانشجویی است، تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

تعارض منافعی وجود ندارد.

کد اخلاق: ۹۶۴۳۸۲۲

References

1. Ghalandari Shamami M, Mirzaee M, Najar-peerayeh S. Frequency of papaA, papC genes and antimicrobial resistance pattern in uropathogenic Escherichia coli. J Microb World 2016; 9:44-5
2. Zaveloff P, Terracio L. Growth of Escherichia coli at elevated temperatures. J Basic Microbiol 2005; 45:335-404. doi.org/10.1002/jobm.200410542
3. da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli. Virulence 2012; 3:18-28. doi: 10.4161/viru.3.1.18382.
4. Lau SM, Peng MY, Chang FY. Resistance rates to commonly used antimicrobials among pathogens of both bacteremic and non-bacteremic community-acquired urinary tract infection. J Microbiol Immunol Infect 2004; 37:185-91.
5. da Mota AC, Goncalves ML, Bortoletto C, Olivan SR, Salgueiro M, Godoy C, et al. Evaluation of the effectiveness of photodynamic therapy for the endodontic treatment of primary teeth: study protocol for a randomized controlled clinical trial. Trials 2015; 16:55. doi: 10.1186/s13063-015-1086-2.
6. da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli. Virulence 2012;3:18-28. doi: 10.4161/viru.3.1.18382.
7. Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. J Appl Oral Sci 2011; 19:106-12. doi: 10.1590/s1678-77572011000200005.
8. Hasna AA, Da Silva LP, Pelegrini FC, Ferreira CL, de Oliveira LD, Carvalho CA. Effect of sodium

hypochlorite solution and gel with/without passive ultrasonic irrigation on Enterococcus faecalis, Escherichia coli and their endotoxins. F1000Res 2020; 9. doi: 10.12688/f1000research.24721.1.

9. Siqueira JF, Jr, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. J Endod 2000; 26:331-4. doi: 10.1097/00004770-200006000-00006.
10. Prado M, Silva EJ, Duque TM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. J Appl Oral Sci 2015; 23:158-63. doi: 10.1590/1678-775720130691
11. Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. J Appl Oral Sci 2011; 19:106-12. doi: 10.1590/s1678-77572011000200005.
12. Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol. Lett 2000; 193:1-6. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09393.x
13. Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y, et al. Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. J Dent Res 2015; 94:344-53. doi: 10.1177/0022034514561259.
14. Ledder RG, Mistry H, Sreenivasan PK, Humphreys G, McBain AJ. Arginine Exposure Decreases Acidogenesis in Long-Term Oral Biofilm Microcosms. mSphere 2017; 2: e00295-17. doi: 10.1128/mSphere.00295-17
15. Aspedon A, Groisman EA. The antibacterial action of protamine: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in Salmonella typhimurium. Microbiology 1996; 142:3389-97. doi: 10.1099/13500872-142-12-3389.
16. Kim YH, Kim SM, Lee SY. Antimicrobial Activity of Protamine against Oral Micro-organisms. Biocontrol Sci 2015; 20:100-123. doi: 10.4265/bio.20.275.
17. Madeira HM, Morrison M. Growth inhibition of Prevotella ruminicola by protamine. FEMS Microbiol. Lett 1997; 150:81-8. doi: 10.1111/j. 1574-6968.1997.tb10353.x.
18. JiangHu,DonnaWebster,JoyceCao,AndrewShao. The safety of green tea and green tea extract consumption in adults – Results of a systematic review. Regul. Toxicol. Pharmacol 2018; 95: 412-33. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.03.019.
19. Kulveer Singh Ahlawat , Bhupender Singh Khatkar. Processing, food applications and safety of aloe vera products: a review. J Food Sci Technol 2011; 48: 525–33. doi: 10.1007/s13197-011-0229-z.
20. Catherine J McNeal, Cynthia J Meininger, Deepika Reddy, Colin D Wilborn, Guoyao Wu. Safety and Effectiveness of Arginine in Adults. J Nutr 2016; 146:2587S-2593S. doi: 10.3945/jn. 116.234740.
21. Al-Kassou B, Kandt J, Lohde L, Shamekhi J, Sedaghat A, Tabata N, Weber M, Sugiura A, Fimmers R, Werner N, Grube E, Treede H, Nickenig G, Sinning JM. Safety and Efficacy of Protamine Administration for Prevention of Bleeding Complications in Patients Undergoing TAVR. JACC Cardiovasc Interv 2020;13:1471-80. doi: 10.1016/j.jcin.2020.03.041.
22. Reygaert WC. The antimicrobial possibilities of green tea. Front. Microbiol 2014; 5:434. doi: 10.3389/fmicb.2014.00434.
23. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. Br J Pharmacol 2013; 168:1059-73. doi: 10.1111/bph.12009.
24. Jain S, Rathod N, Nagi R, Sur J, Laheji A, Gupta N, et al. Antibacterial Effect of Aloe Vera Gel against Oral Pathogens: An In-vitro Study. J Clin. Diagnostic Res 2016; 10: Zc41-zc4. doi: 10.7860/JCDR/2016/21450.8890.
25. Babaji P, Jagtap K, Lau H, Bansal N, Thajuraj S, Sondhi P. Comparative evaluation of antimicrobial effect of herbal root canal irrigants (Morinda citrifolia, Azadirachta indica, Aloe vera) with sodium hypochlorite: An in vitro study. J Int Soc Prev Community Dent 2016; 6:196-9. doi: 10.4103/2231-0762.183104.
26. Nair GR, Naidu GS, Jain S, Nagi R, Makkad RS, Jha A. Clinical Effectiveness of Aloe Vera in the Management of Oral Mucosal Diseases- A Systematic Review. J Clin Diagnostic Res 2016; 10:Ze01-7. doi: 10.7860/JCDR/2016/18142.8222.
27. Najafi s, Davoodabadi A, Kazemi S, Ghasempour M. Effect of Arginine, Protamine, and Aqueous Extracts of Green Tea and Aloe Vera Against Enterococcus faecalis.J Iran Dent Assoc 2019;31:8-13.doi: 10.30699/jidai.31.1.2
28. Balouiri Mounyr, SadikiI Moulay, Ibnsouda SaadKoraich: Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal 2016; 6: 71–9. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
29. 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; 28:271-7. doi: 10.4103/0970-4388.76157.
30. Alexander JW, Supp DM. Role of Arginine and Omega-3 Fatty Acids in Wound Healing and Infection. Adv Wound Caref 2014; 3:682-90. doi.org/10.1089/wound.2013.0469
31. Sepah Mi, Jalal R, Mashreghi M. Antibacterial activity of poly-l-arginine under different conditions. Iran J Microbiol 2017; 9: 103–11.
32. Stumpe S, Bakker EP. Requirement of a large K+-uptake capacity and of extracytoplasmic protease activity for protamine resistance of Escherichia coli. Arch Microbiol 1997; 167:126-36.
33. Aziz M, Garduno R, Mirani ZA, Baqai R, Sheikh AS, Nazir H, et al. Determination of antimicrobial effect of protamine by transmission electron microscopy and SDS PAGE on Pseudomonas aeruginosa isolates from diabetic foot infection. Iran J Basic Med Sci 2019; 22:827. doi: 10.22038/ijbms.2019.32414.7989.
34. Truelstrup, Hansen L. Gill T.A. Solubility and antimicrobial efficacy of protamine on Listeria monocytogenes and Escherichia coli as influenced

by pH. J Appl Microbiol 2000; 88:1049-55. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01074.x.

35. Jigisha A, Nishant R, Navin K, Pankaj G. Green tea: a magical herb with miraculous outcomes. Int Res J Pharm 2012; 3:139-48.
36. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. Br J Pharmacol 2013; 168:1059-73. doi: 10.1111/bph.12009.
37. Parvez MA, Saha K, Rahman J, Munmun RA, Rahman MA, Dey SK, et al. Antibacterial activities of green tea crude extracts and synergistic effects of epigallocatechingallate (EGCG) with gentamicin against MDR pathogens. Heliyon 2019; 5: e02126. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02126.
38. Noormandi A, Dabaghzadeh F. Effects of green tea on Escherichia coli as an uropathogen. J Tradit Complement Med 2014; 5:15-20. doi: 10.1016/j.jtcme.2014.10.005
39. Redda YT, Kebede E, Cruz Cruz GG, Awol N, Mengeste B. Potential Antibacterial Activity of Crude Extracts from Aloe vera, Zingiber officinale and Vinca major Medicinal Plants. Intl J Microbiol Res 2014; 5:202-7. doi: 10.5829/idosi.ijmr.2014.5.3.86177
40. Haque SD, Saha SK, Salma U, Nishi MK, Rahaman MS. Antibacterial Effect of Aloe vera (Aloe barbadensis) leaf gel against Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Mymensingh Med* J 2019; 28:490-6.
41. Hai Z, Ren Y, Hu J, Wang H, Qin Q, Chen T. Evaluation of the treatment effect of aloe vera fermentation in burn injury healing using a rat model. *Mediators Inflamm* 2019; doi: 10.1155/2019/2020858.