Molecular study of biofilm gene of sulfate reducing bacteria (SRB) isolated from patients with periodontitis and the effect of aloe vera plant extract on its expression by real time-PCR method

Fatemeh Hemmati[1], Mansour Bayat[2,*], Kumarss Amini[3]

1- M.Sc. Student of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran
2*- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Article Info

Article type:
Original Article

Article History:
Received: 22 Jul 2020
Accepted: 31 Jul 2020
Published: 20 Apr 2021

Corresponding Author:
Mansour Bayat

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

(Email: m.bayat@yahoo.com)

Abstract

Background and Aims: Due to the increasing problems and side effects of the use of chemical antibacterial agents as well as antibiotic resistance, this study aimed to evaluate the effects of aloe vera gel on biofilm gene expression of sulfate-reducing bacteria (SRB) isolated from patients with periodontal infection by Real time-PCR method.

Materials and Methods: For this study, 100 individuals including 50 patients and 50 healthy individuals were recruited and examined by a periodontist. After identifying sulfate-reducing bacteria by biochemical tests and specific media, the effect of aloe vera extract on them was investigated and the expression of BFR gene against housekeeping gene (16srDNA) was determined by Real time- PCR test via T-test analysis method.

Results: The data showed that 12 strains of sulfate-reducing bacteria were isolated from the samples, 5 of which had BFR gene and their gene expression was significantly reduced by aloe vera gel ($P<0.05$).

Conclusion: The data of this study in proving the anti-biofilm and antibacterial effects of aloe vera extract showed that the expression of the target gene is reduced. It seems that this substance can be used as an alternative to oral hygiene chemicals.

Keywords: Biofilms, Sulfate-reducing bacteria (SRB), Periodontal, Aloe vera-extract, Real-time polymerase chain reaction:

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2021;34:1

Cite this article as: Hemmati F, Bayat M, Amini K. Molecular study of biofilm gene of sulfate reducing bacteria (SRB) isolated from patients with periodontitis and the effect of aloe vera plant extract on its expression by real time-PCR method. J Dent Med-TUMS. 2021;34:1.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]

Copyright © 2021 Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مطالعه مولکولی ژن بیوفیلم (bfr) باکتری‌های احیا کننده سولفات (SRB) جدا شده از عفونت پریودنتال بیماران و تأثیر عصاره گیاهی آلوئه‌ورا بر بیان آن با روش Real time-PCR

فاطمه همتی[۱]، منصور بیات[۲*]، کیومرث امینی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه آموزشی بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
۲*- استاد گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳- دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به مشکلات و عوارض روز افزون استفاده از مواد ضد باکتریایی شیمیایی و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی که از مهم‌ترین معضلات پیش روی جوامع انسانی است، هدف از این مطالعه آن است که به بررسی مولکولی ژن بیوفیلم باکتری‌های احیا کننده سولفات (Sulphate-reducing bacteria (SRB جدا شده از عفونت پریودنتال بیماران و تاثیر عصاره گیاهی آلوئه‌ورا بر بیان آن با روش Real time-PCR بپردازد.

روش بررسی: به منظور انجام این مطالعه آزمایشگاهی از ۱۰۰ نفر شامل ۵۰ بیمار و ۵۰ فرد سالم توسط پریودونتیست نمونه برداری شد. پس از شناسایی باکتری‌های احیا کننده سولفات توسط تست‌های بیوشیمیایی و محیط اختصاصی، اثر عصاره آلوئه‌ورا بر آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن BFR در برابر ژن خانه دار توسط آزمون Real time-PCR و با استفاده از روش آماری t-test تعیین گردید.

یافته‌ها: داده‌ها نشان داد که ۱۲ سویه باکتری احیا کننده سولفات از نمونه‌ها جدا سازی شد، که ۵ نمونه دارای ژن (bfr) بودند و بیان ژن آن‌ها توسط ژل آلوئه‌ورا به طرز معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: داده‌های این مطالعه در اثبات اثرات ضد بیوفیلمی و ضد باکتریایی عصاره آلوئه‌ورا نشان داد که بیان ژن هدف کاهش یافته است. این ماده می‌تواند به عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی در بهداشت دهان و دندان به کار رود.

کلید واژه‌ها: بیوفیلم، احیا کننده سولفات (SRB)، پریودنتال، عصاره گیاهی آلوئه‌ورا، واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی در زمان واقعی

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران
دوره ۳۴، مقاله ۱، ۱۴۰۰

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

وصول: ۹۹/۰۵/۰۱
اصلاح نهایی: ۹۹/۰۵/۱۰
تأیید چاپ: ۴۰۰/۰۱/۳۱

نویسنده مسئول:
منصور بیات

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

(Email: m.bayat@yahoo.com)

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]

مقدمه

پریودنتیت بیماری التهابی بافت‌های حمایت کننده دندان است که توسط میکروارگانیسم‌های خاص یا گروهی از میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شود و با تخریب وسیع لیگامان پریودنتال و استخوان آلوئه‌ولارا به همراه تشکیل پاکت پریودنتال دندانی، تحلیل لثه و یا هر دو مشخص می‌شود. از جمله میکروارگانیسم‌های مهم در فرآیند ایجاد تخریب، باکتری‌های احیا کننده سولفات معروف به SRB هستند. باکتری‌های احیا کننده سولفات از سولفات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون استفاده و سولفید هیدروژن تولید می‌نمایند. این میکروارگانیسم‌ها در همه محیط‌ها یافت می‌شوند، در آب، هوا و خاک پراکنده‌اند. تاکنون ۱۴ جنس از این گروه باکتری‌ها شناخته شده که به جز دسولفونما ویبرو تمامی آن‌ها گرم منفی می‌باشند (۱،۲). باکتری‌های فوق الذکر به شکل بی‌هوازی در سطوح مختلف آب‌های شور و شیرین یافت شده، سولفات و ترکیبات مختلف آن را به سولفید احیا می‌نمایند. از جمله میکروارگانیسم‌های مهم در خوردگی باکتری‌ها احیا کننده سولفات معروف به Sulphate-reducing bacteria (SRB) هستند. اصلی‌ترین ماده حاصل از متابولیسم این موجودات H2S می‌باشد که با اسیدی نمودن محیط به طور مستقیم سبب خوردگی و پوسیدگی می‌شوند. به علاوه این باکتری‌ها از آهن در محیط استفاده نموده و تولید رسوب سیاه رنگ SFe می‌نمایند. باکتری‌های SRB انرژی مورد نیاز خود را از احیای سولفات بدست می آورند و در مجاری دستگاه گوارش (دهان و روده) انسان و حیوانات وجود دارند(۳،۴).

مطالعات متعدد نشان داده است که باکتری‌های موجود در محیط دهان، بافت پیرامون دندان را عفونی می‌کنند و موجب التهاب آن می‌شوند. عفونت و التهاب ایجاد شده در ادامه منجر به بیماری پریودنتال می‌شود. پریودنتیت مزمن شایع‌ترین فرم پریودنتیت است که منجر به آماس در بافت‌های حمایت کننده دندان و از دست رفتن چسبندگی آن‌ها به صورت پیشرونده و تحلیل استخوان لثه می‌شود. در واقع باکتری‌هایی که به دلیل عدم رعایت بهداشت دهان و دندان برای مدتی طولانی بر روی دندان‌ها باقی می‌مانند، منجر به تشکیل لایه‌ای بنام پلاک دندانی می‌شوند که با گذشت زمان به لایه‌ای سخت بنام کالکلوس تبدیل می‌شوند. این تشکیلات به تدریج به فضای زیر لثه گسترش می‌یابند که پاکسازی آن‌ها از طریق روش‌های معمولی بهداشتی دشوار است و منجر به بیماری پریودنتال می‌شود (۵،۶).

پاتوژن‌های پریودنتال معمولاً بخش کوچکی از کل ۶۰۰ گونه باکتریایی شناخته شده هستند که می‌توانند بر روی سطوح دندانی و زیر کناره‌های لثه و غشاهای مخاطی دهان کلونیزه شوند. باکتری‌های SRB از جمله باکتری‌هایی هستند که نقش مهمی را در شروع التهاب‌های دائمی از قبیل بیماری‌های دهان و دندان‌ها ایفا می‌کنند. اکثر پاتوژن‌های پریودنتال بی‌هوازی هستند، و تعداد آن‌ها در محیط عفونت بستگی به محیط بیوفیلم ایجاد شده و پاکت پریودنتال دارد (۷). بیوفیلم یک اجتماع میکروبی پیچیده است که درون ماتریکس پلی‌ساکاریدی و یا پروتئینی محصور شده است. بیوفیلم می‌تواند توسط باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی ایجاد شود. امروزه مقاومت باکتریایی ایجاد شده در فاز بیوفیلم به مواد ضدمیکروبی یک مسئله مهم جهانی است (۶). بیوفیلم باکتریایی از جنبه‌های مختلفی مانند بیماری‌های وابسته به عفونت‌های مزمن انسانی، پلاک دندان، دارای اهمیت است. تخمین زده شده است که بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت انسانی مربوط به تشکیل بیوفیلم توسط باکتری مهاجم است (۸).

در چند سال اخیر با گرایش مردم به استفاده از داروهایی با منشأ گیاهی به دلیل عوارض جانبی و مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد شده توسط داروهای شیمیایی و از سوی دیگر تأکید سازمان بهداشت جهانی در جایگزینی تدریجی مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی موجب شده که محققان به استفاده از گیاهان در صنایع داروسازی و تولید مواد ضد میکروبی با کمترین عوارض روی بیاورند. آلوئه‌ورا (Aloe vera) یک گیاه با دوام با گل‌های زرد است که تنها برگ‌های این گیاه ارزش دارویی دارند. برگ آلوئه‌ورا اغلب به عنوان گیاهان دارای خواص ضد میکروبی معرفی شده و مورد تحقیق و کاربرد درمانی قرار گرفته است (۱). با توجه به عوارض غیر قابل برگشت داروهای شیمیایی همچنین مقاومت باکتری‌ها در برابر این دسته از داروها که به معضلی جهانی تبدیل شده است، و از سوی دیگر تأکید سازمان بهداشت جهانی در جایگزینی تدریجی مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی موجب شده که محققان به استفاده از گیاهان در صنایع داروسازی و تولید مواد ضد میکروبی با کمترین عوارض روی بیاورند.

آلوئه‌ورا (Aloe Vera) یک گیاه با دوام با گل‌های زرد است که تنها برگ‌های این گیاه ارزش دارویی دارند. مطالعه حاضر بر آن بوده است تا

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]

به بررسی پتاسیل ضد میکروبی گیاه آلوئه‌ورا بر علیه باکتری‌های SRB عامل بیماری پریودنتال بپردازد و در انتها میزان بیان ژن بیوفیلم باکتری SRB (bfr) تحت تاثیر عصاره گیاه آلوئه‌ورا را پایش نماید. داده‌های مطالعاتی نشان داده است که این گیاه دارویی در درمان التهاب مخاط دهان کاربرد دارد (۹). با توجه به مطالب ذکر شده و تأیید اثرات ضد باکتریایی ژل آلوئه‌ورا به نظر می‌رسد این ژل برای مقابله با انواع پوسیدگی‌های دندانی بسیار مفید باشد و بتوان از آن به عنوان یک ماده فعال برای پیشگیری از پوسیدگی‌های دندانی در خمیر دندان‌ها و ژل‌های تمیز کننده دندان استفاده نمود(۱۲-۱۰). مطالعات قبلی اغلب اثرات ضد میکروبی آلوئه‌ورا را اثبات نموده‌اند اما اثر عصاره این گیاه بر روی تشکیل بیوفیلم و مکانیسم آن بر روی بیوفیلم در باکتری‌های احیاگر سولفات به صورت دقیق مشخص نشده است. از این رو هدف این مطالعه بر آن بوده است تا با بررسی مولکولی ژن بیوفیلم باکتری‌های احیا کننده سولفات (SRB) جدا شده از عفونت پریودنتال بیماران، تاثیر عصاره گیاهی آلوئه‌ورا بر بیان آن را با روش Real time-PCR بسنجد.

روش بررسی

نمونه برداری: تحقیق حاضر به صورت مورد- شاهدی با اخذ تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه و رضایت نامه کتبی آگاهانه از بیماران در بخش پریودنتولوژی بیمارستان شهید شکری انجام شد. سن و جنس و نیز بیماری‌های زمینه‌ای در دو گروه همسان سازی می‌گردید. برای ورود به مطالعه تشخیص بیماری پریودنتیت مزمن توسط پریودنتولوژیست و بر اساس معاینات کلینیکی، تاریخچه پزشکی و دندانپزشکی، بررسی عدم اتصال نسوج و میزان لقی دندان، خونریزی در حین پروب کردن، میزان عمق پروب و استفاده از رادیوگرافی‌های دندان به عمل آمد. افراد دارای عفونت‌های غیر از عفونت دندان که آنتی بیوتیک مصرف می‌کردند یا رضایت کتبی برای استفاده از نمونه برای مطالعه را امضا نمی‌کردند از مطالعه کنار گذاشته می‌شدند. معیار تشخیصی پریودنتیت بر اساس امتیازدهی CDC working group بود. حجم نمونه براساس فرمول نمونه گیری جسی- مورگان ۱۰۰ نفر در نظر گرفته شد که شامل ۵۰ نفر افراد سالم و ۵۰ نفر مبتلا به عفونت پریودنتال میکروبی نمونه گیری انجام شد. نمونه گیری از پلاک دندانی با استفاده از پروب و وسایل دندانپزشکی و توسط دندانپزشک صورت می‌گرفت.

جدا سازی باکتری: در آزمایشگاه پاسارگاد به منظور جدا سازی باکتری‌ها از دو پلیت بلاد آگار در شرایط هوازی و بی‌هوازی استفاده شد. سپس از تست‌های رایج میکروبیولوژی به منظور شناسایی دقیق ایزوله‌های میکروبی نظیر رنگ آمیزی گرم، تست‌های قند کیت API و تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد. نهایتاً باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی SRB کشت گردیدند تا سویه‌های خالص جدا سازی شوند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR): استخراج DNA از باکتری توسط کیت QIAamp Minikit (QIAGEN, Germany) و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. غلظت الیگونوکلئوتید توسط اسپکتروفتومتر با خواندن میزان OD در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (NanoDrop, USA) تعیین گردید .خلوص DNA با استفاده از تعیین نسبت OD در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (۱/۵ تا ۲) مشخص گردید که نشان می‌داد محلول حاوی DNA به طور مناسبی خالص شده است. سکانس حفاظت شده ژن‌های BFR و 16srRNA باکتری‌های SRB در سایت NCBI تعیین شد. پرایمرها با استفاده از سکانس‌های شناسایی شده طراحی شدند (جدول ۱). سکانس‌های هدف به کمک روش PCRبا شرایط زیر و در ۳۵ چرخه انجام شد تکثیر شدند. مراحل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه، یک دقیقه در۵۶ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سنتز پایانی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه. تفکیک قطعات DNA توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز دو درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید انجام شده و قطعات حاصل تعیین سکانس گردیدند. سویه‌های جدا شده توسط آنالیز سکانس 16srRNA شناسایی گردید.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی (3-5)	طول نوکلئوتید
bfr forward	GCGAAAGTCATCGAAGTGCTGA	bp ۳۶۰
bfr reverse	CGGCAAGTTCTCCGTAGTCCAT	bp ۳۶۰

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]

عصاره گیری و تهیه MIC گیاه آلوئه‌ورا

گیاه آلوئه‌ورا به صورت تازه تهیه شده و چند بار با آب شستشو داده شدند. سپس در محلی تاریک طی چند روز خشک و وسیله دستگاه خردکن، آسیاب گردیدند. عصاره گیری از مقدار ۲۰۰ گرم از مواد آسیاب شده به همراه ۵۰۰ سی سی آب معمولی با دستگاه رفلاکس به مدت هشت ساعت در دمای جوش به روش تقطیر انجام شد. حداقل غلظت مهارکنندگی با کمک روش میکرو براث دایلوشن (Dilution Broth Micro) در پلیت‌های ۹۶ خانه استریل تعیین شد. بدین منظور از محیط کشت مولر هینتون براث محتوی معادل نیم مک فارلند از باکتری مورد مطالعه، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه گردید. بدین ترتیب غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. وجود کدورت نشان دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود. غلظت موجود در یک چاهک قبل از چاهک دارای تغییر جهشی کدورت، به عنوان MIC تعیین می‌گردید و در نهایت تأثیر غلظت MIC گیاه آلوئه‌ورا بر روی باکتری‌های احیا کننده سولفات ایزوله شده که واجد ژن bfr می‌باشد بررسی می‌گردید. رقت‌های این مطالعه از رقت ۱/۲۰۴۸ شروع شده و تا ۱/۱۲۸ ادامه یافت.

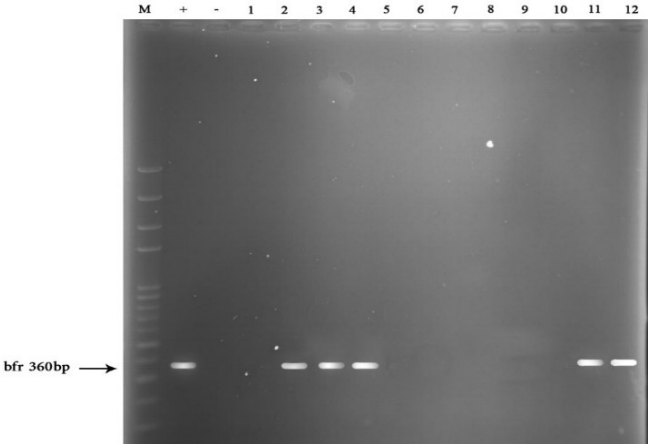
بررسی بیان ژن:

RNA توتال باکتری‌های SRB به کمک کیت RNA isolation kit (QIAGEN, Germany) و با توجه به دستورالعمل سازنده استخراج شده و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. CDNA با استفاده از Thermoscript reverse transcriptase (Invitrogen, USA) سنتز شده و Real time-PCR با استفاده از کیت Real time-PCR kit (QIAGEN, Germany) و مطابق با دستورالعمل کارخانه انجام گرفت. Real time-PCR روی سیستم Step One Plus System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems) انجام گرفت. میزان نسبی بیان ژن با استفاده از 16SrRNA به عنوان رفرنس خانه دار تعیین گردید و نهایتاً اختصاصیت واکنش PCR توسط آنالیز منحنی ذوب در مرحله نهایی PCR تعیین گردید. داده‌های Real time-PCR به کمک نرم افزار موجود در دستگاه ABI به روش ΔΔCT – آنالیز شد و عدد نهایی ($2^{-\Delta\Delta CT}$) حاصل از تکرارهای مختلف به کمک نرم افزار Microsoft Office Excel تجزیه و تحلیل آماری شد. بررسی‌های آماری با استفاده از SPSS19 و روش T-test صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج جدا سازی باکتری و MIC عصاره آلوئه‌ورا: به منظور انجام این مطالعه ۵۰ نفر بیمار دارای عفونت‌های پریودنتیال و ۵۰ فرد سالم از نظر بیماری‌های دهان و دندان در نظر گرفته شدن که میانگین سنی ۲۵ سال (از ۲۱ تا ۳۴ سال) داشتند و از نظر تعداد هر جنس برابر بودند. باکتری‌های SRB در طی مراحل مختلف جدا سازی و کشت، از بافت‌ها و آبسه‌های پریودنتیک جدا سازی شد و در محیط‌های عمومی و اختصاصی SRB کشت شده و رنگ آمیزی شد. همچنین داده‌ها نشان داد که میزان میزان MIC برابر با ۵۱۲ میکروگرم بر لیتر بوده است.

بررسی نتایج مولکولی باکتری‌های SRB: باکتری‌های جدا سازی شده با روش‌های مولکولی و بررسی ژنومی در حد گونه و جنس شناسایی گردیدند. داده‌ها نشان داد که ۱۲ باکتری SRB از ۱۰۰ نمونه جدا سازی شد که ۵ سویه دارای ژن BFR بودند (شکل ۱).



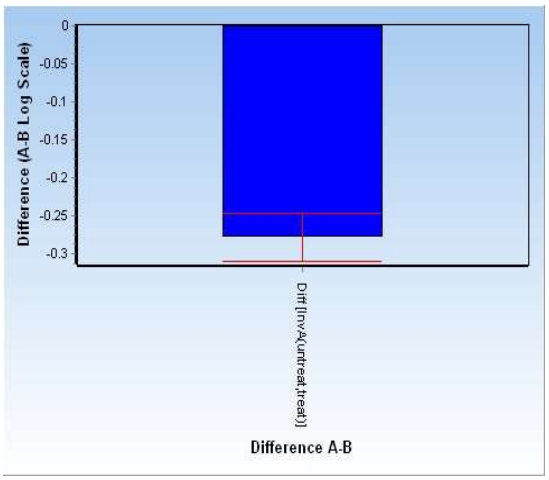
شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR. ستون M:ladder، ستون +: کنترل مثبت، ستون منفی: بلانک، ستون ۱ تا ۱۲: نمونه‌ها

نتایج آزمون Real time-PCR: آنالیز مناسب داده‌ها نقش به سزایی در به دست آوردن نتایج معتبر و مرتبط در هر سیستم آزمایشگاهی دارد، اما برای ارزیابی تغییرات در بیان mRNA ژن‌ها بسیار مهم و حیاتی

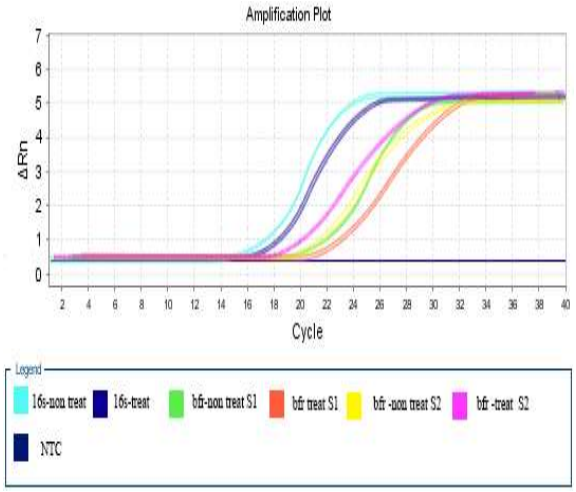
[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]

است. بر خلاف DNA که تقریبا در تمام سلول‌های بدون تغییر باقی می‌ماند اما RNA به صورت موقتی بیان می‌شود و میزان آن نیز بسته به نوع سلول، مرحله تکوینی و فیزیولوژی و پاتولوژی متفاوت است. بنابراین کمی کردن RNA بسیار وابسته به آزمایش و ذاتاً متغیر است. باید دقت زیادی کرد تا پارامترهای مختلف تحت کنترل باشند تا بتوان داده‌های به دست آورد که از نظر تکنیکی دقیق و معتبر هستند تا بتوان به دنبال ارتباط و تفسیر زیستی آن رفت. صرف نظر از دستگاه مورد استفاده برای انجام واکنش Real time-PCR، شرطهای بنیادی مشخصی برقرار باشد. برای تعیین میزان سرکوب بیان ژن به صورت کمی از تکنیک Real time-PCR استفاده شد. واکنش Real time-PCR برای ژن bfr و با استفاده از ژن مرجع 16s انجام شد. داده‌های Real time-PCR به کمک نرم افزار موجود در دستگاه ABI به روش $\Delta\Delta C_T$ – آنالیز شد و عدد نهایی ($۲^{-\Delta\Delta CT}$) حاصل از تکرارهای مختلف به کمک نرم افزار Microsoft Office Excel تجزیه و تحلیل آماری شد.

نتایج بررسی بیان ژن BFR که در ساخت بیوفیلم سویه‌ها دخیل است نشان داد که میزان Fold Change برای ژن bfr برابر ۱/۲۱- بوده است. این داده بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۲۱ برابر کاهش یافته است (CI=۹۵٪, P=۰/۰۰۴۵) (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۱- نمودار نشان دهنده تفاوت در میزان بیان ژن هدف بر اساس Fold Change



نمودار ۲- مقایسه بیان ژن هدف و خانه دار در نمونه تیمار شده (treated) و نشده (non-treated) با عصاره آلوئه‌ورا

بحث و نتیجه گیری

باکتری‌های موجود در محیط دهان به خصوص نواحی بین دندان‌ها و لثه، بافت پیرامون دندان را عفونی می‌کنند و موجب التهاب آن می‌شوند. عفونت و التهاب ایجاد شده در ادامه منجر به بیماری پریودنتال یا التهابات لثه‌ای می‌شود که در اغلب موارد به دلیل عفونت لثه و استخوان اطراف دندان‌ها بوجود می‌آید. در نتیجه عدم مسواک زدن و پاکیزگی دهان و دندان، باکتری‌ها برای مدتی طولانی بر روی دندان‌ها باقی می‌مانند، پس از مدتی با کلونیزه شدن در روی بافت مذکور و ایجاد بیوفیلم منجر به تشکیل لایه‌ای بنام پلاک دندانی می‌شوند.

با توجه به عوارض غیر قابل برگشت داروهای شیمیایی همچنین مقاومت باکتری‌ها در برابر این دسته از داروها که به معضلی جهانی تبدیل شده است، و از سوی دیگر تأکید سازمان بهداشت جهانی در جایگزینی تدریجی مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی موجب شده که محققان به استفاده از گیاهان در صنایع داروسازی و تولید مواد ضد میکروبی با کمترین عوارض روی بیاورند. آلوئه‌ورا (Aloe vera) یک گیاه با دوام با گل‌های زرد است که تنها برگ‌های این گیاه ارزش دارویی دارند.

مطالعه حاضر بر آن بوده است تا به بررسی پتاسیل ضد میکروبی گیاه آلوئه‌ورا بر علیه باکتری‌های SRB عامل بیماری پریودنتال بپردازد و در انتها میزان بیان ژن بیوفیلم باکتری SRB (bfr) تحت تأثیر عصاره

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]

گیاه آلوئه‌ورا را پایش نماید. داده‌های این مطالعه نشان داد که عصاره آلوئه‌ورا دارای اثرات معنی دار کاهشی بر روی بیان ژن دخیل در تولید بیوفیلم باکتری‌های SRB بوده است (۱۳،۱۴).

Jain و همکاران (۱۵) در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ به بررسی اثرات ژل آلوئه‌ورا (AVG) بر علیه پاتوژن‌های دهانی پرداختند. نمونه برداری زیر لثه و آسپیراسیون آبسه پری اپیکال و آبسه پریودنتال در ۲۰ بیمار انجام شد و نمونه به آبگوشت تیوگلیکولات منتقل شد و در آگار Mutans Sanguis و آگار خون انکوبه شد و در محفظه گاز بی‌هوازی کشت گردید. کلنی‌های تشکیل شده بیشتر با استفاده از روش‌های رنگ آمیزی گرم و آزمایش‌های تخمیر بیوشیمیایی (IMViC) شناسایی شدند. نتیجه این مطالعه نشان داد که غلظت بالاتر (۱۰۰٪، ۵۰٪) AVG موجب ایجاد یک هاله مهار قابل مقایسه با آفلوکساسین (۵ میکرو گرم) و سیپروفلوکساسین (۳۰ میکرو گرم) را تولید کرده است. این مطالعه نیز همچون مطالعه ما بر اثرات ضد باکتریایی آلوئه‌ورا تأکید می‌نماید.

Lawrence و همکاران (۱۶) در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۹ به جدا سازی و تخلیص اجزای ضد باکتریایی آلوئه‌ورا پرداختند. عصاره اتانول، متانول و استون ژل آلوئه‌ورا به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها در برابر چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از روش انتشار چاه آگار مورد مطالعه قرار گرفت. عصاره‌ها سطح متنوعی از فعالیت ضد میکروبی را در برابر عوامل بیماری‌زای آزمایش شده نشان دادند. این مطالعه نشان داد که فعالیت ضد میکروبی عصاره ژل آلوئه‌ورا به اثر هم افزایی ترکیبات مختلف وابسته است. با اثر ضد میکروبی طیفی گسترده ژل A.vera، می‌توان آن را در درمان بیماری‌های مختلف باکتریایی بیشتر توصیه کرد.

Salah و همکاران (۱۷) در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۷ به بررسی اثر داستیلاسیون بر فعالیت آنتی باکتریال و آنتی بیوفیلم عصاره آلوئه‌ورا پرداختند و نشان دادند که دی استلاسیون این عصار موجب از بین رفتن Acemannan موجود در این عصاره شده و خاصیت ضد بیو فیلمی و ضد باکتریال آن را از بین می‌برد. همچنین در مطالعه مشابه دیگری توسط Haque و همکاران (۱۸) در سال ۲۰۱۹ که به بررسی اثرات آنتی باکتریال ژل موضعی آلوئه‌ورا بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس، ای کلای و کلبسیلا انجام شد نشان داده شد که این عصاره دارای خاصیت باکتریسیدال است این یافته‌ها در مطالعات قبلی و بعدی توسط Ibrahim و همکاران (۱۹) تأیید شده بودند.

عوامل مختلف ضد باکتریایی در مطالعات ذکر شده از عصاره آلوئه‌ورا جدا سازی شدند و اثرات آن‌ها مشخص گردید که در راستای یافته‌های این مطالعه است. علاوه بر این‌ها در مطالعه حاضر داده‌ها نشان داد که عصاره آلوئه‌ورا از طریق مهار ژن دخیل در تولید بیوفیلم خاصیت ضد بیو فیلمی خود را اعمال می‌نماید که ندرتا در مطالعه دیگری مورد بررسی قرار گرفته بود.

مطالعات Sayar و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۹ نشان داد که اثرات آلوئه‌ورا بر باکتری‌ها در ایران به ندرت انجام شده است، اخیراً به بررسی تأثیر خمیردندان حاوی آلوئه‌ورا بر شاخص‌های پریودونتال درافراد مبتلا به ژنژیویت پرداختند این مطالعه که از نوع کارآزمایی بالینی یک سو کور متقاطع بود، بر روی ۲۰ دانشجوی دندانپزشکی (شامل ۱۰ زن و ۱۰ مرد و با میانگین سنی (۴±۲۴/۵) که ژنژویت داشتند، انجام گرفت. هیچ تفاوت معنی‌داری میان دو خمیردندان در شاخص‌های پریودونتال افراد قبل و بعد از استفاده از آلوئه‌ورا و در مقایسه دو خمیردندان با هم پس از ۳۰ روز مشاهده نشد. به این ترتیب که پس از دوره سی روزه مطالعه، PI از ۳/۱±۱۴/۲ به ۰۲/۱±۸۴/۱ رسید و P-value بین گروهی نیز برای PI بی‌معنی بود.

نهایتاً داده‌ها نشان داد که تأثیر خمیردندان آلوئه‌ورا روی PI و GI مشابه خمیردندان فلورایددار بود، این خمیردندان می‌تواند به جای خمیردندان‌های شیمیایی تجویز گردد. استفاده از ژل آلوئه‌ورا تفاوت معنی‌داری را در شاخص‌های پریودنتال ایجاد نمی‌کند.

با توجه به اینکه مطالعه حاضر نشان داد که ژل آلوئه‌ورا دارای اثرات ضد بیو فیلمی است، به نظر می‌رسد دوره استفاده از ژل در مطالعه Athiban و همکاران (۲۱) کوتاه بوده باشد و همچنین بررسی‌های مولکولی در آن مطالعه صورت نگرفته است. مکانیسم دقیق اثرات ضد باکتریال عصاره آلوئه‌ورا مشخص نگردیده است اما علیرغم تفاوت در مواد تشکیل دهنده انواع آلوئه‌ورا، داده‌ها نشان داده است که اثرات ضد میکروبی آلوئه‌ورا به آنتراکینون‌های طبیعی موجود در گیاهان باز می‌گردد.

پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات آتی به بررسی اثرات آنتی بیو فیلمی سایر انواع گیاه آلوئه‌ورا پرداخته شده و با جدا سازی، آنالیز و بررسی اثر هر یک از اجزا بتوان زمینه را برای استفاده‌های دارویی و بالینی این گیاه

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]

بسیار کار آمد فراهم کرد. با توجه به مشکلات و عوارض روز افزون استفاده از مواد ضد باکتریایی شیمیایی و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی که از مهم‌ترین معضلات پیش روی جوامع انسانی است، همچنین داده‌های این مطالعه در اثبات اثرات ضد بیو فیلمی و ضد باکتریایی عصاره آلوئه‌ورا، به نظر می‌رسد که این ماده بتواند به عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی بهداشت دهان و دندان به کار رود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مطالعه‌ای در زمینه میکروبیولوژی است که اقتباسی از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد ۹۹۰۵۸۶۶ در شورای پژوهشی دانشکده علوم پایه ثبت شده است. بدین وسیله از آزمایشگاه میکروبی پاسارگاد و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1- Kushkevych I, Coufalová M, Vítězová M, Rittmann SK. Sulfate-Reducing Bacteria of the Oral Cavity and Their Relation with Periodontitis-Recent Advances. J Cli Med. 2020;9(8):2347.

2- Barton LL, Fauque GD. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. Adv Appl Microbiol. 2009;68:41-98.

3- Hao OJ, Chen JM, Huang L, Buglass RL. Sulfate-reducing bacteria. Cri rev Enviro Sci Tech. 1996;26(2):155-87.

4- Dou W, Jia R, Jin P, Liu J, Chen S, Gu T. Investigation of the mechanism and characteristics of copper corrosion by sulfate reducing bacteria. Corrosion Science. 2018;144(1):237-48.

5- Robichaux M, Howell M, Boopathy R. Growth and activities of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in human oral cavity. Cur Mic. 2003;47(1):12-6.

6- Dogruöz N, Ilhan-Sungur E, Göksay D, Türetgen I. Evaluation of microbial contamination and distribution of sulphate-reducing bacteria in dental units. Environ Monit Assess. 2012;184(1):133-9.

7- Kushkevych I, Coufalová M, Vítězová M, Rittmann S. Sulfate-Reducing Bacteria of the Oral Cavity and Their Relation with Periodontitis-Recent Advances. J Clin Med. 2020;9(8):2347.

8- Kushkevych I, Castro Sangrador J, Dordević D, Rozehnalová M, Černý M, Fafula R, et al. Evaluation of physiological parameters of intestinal sulfate-reducing bacteria isolated from patients suffering from IBD and healthy people. J Cli Med. 2020;9(6):1920.

9- Moghaddam AA, Radafshar G, Jahandideh Y, Kakaei N. Clinical evaluation of effects of local application of Aloe vera gel as an adjunct to scaling and root planning in patients with chronic periodontitis. J Dent. 2017;18(3):165.

10- Mangaiyarkarasi SP, Manigandan T, Elumalai M, Cholan PK, Kaur RP. Benefits of Aloe vera in dentistry. J Pharmacy and Bioallied Sci. 2015;7(Suppl 1):S255.

11- Singh HP, Sathish G, Babu KN, Vinod KS, Rao HP. Comparative study to evaluate the effectiveness of Aloe vera and metronidazole in adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. J Intl Oral Health. 2016;8(3):374.

12- Dodwad V, Arora K. Effects of Aloe vera gel, Aloe vera irrigation in treatmentof chronic periodontitis-A clinico-microbiological study. KDJ. 2011;34(1):48-51.

13- Ghorbani M, Nezhad-Mokhtari P, Ramazani S. Aloe vera-loaded nanofibrous scaffold based on Zein/Polycaprolactone/Collagen for wound healing. Int J Biological Macromolecules. 2020;153:921-30.

14- Arshad A, Yun S, Si Y, Han F, Zhang Y, Zhang Y, et al. Aloe vera-peel derived porous carbon integrated Co/Mn-oxide based nano-hybrids: An efficient electrocatalyst in advanced photovoltaics. J Pow Sou. 2020;451:227731.

15- 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 Cli Diag Res. 2016;10(11):ZC41.

16- Lawrence R, Tripathi P, Jeyakumar E. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from Aloe vera. Bra J Mic. 2009;40(4):906-1.

17- Salah F, El Ghoul Y, Mahdhi A, Majdoub H, Jarroux N, Sakli F. Effect of the deacetylation degree on the antibacterial and antibiofilm activity of acemannan from Aloe vera. Industrial Crops and Products. Industrial Crops and Products. 2017;103:13-8.

18- Haque S, Saha S, Salma U, Nishi M, Rahaman M. Antibacterial Effect of Aloe vera (Aloe barbadensis) leaf gel against Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Mymensingh Med J. 2019;28(3):490.

19- Ibrahim W, Sarwar Z, Abid S, Munir U, Azeem A. Aloe vera leaf gel extract for antibacterial and softness properties of cotton. J Tex Sci & Eng. 2017;7(301):2.

20- Sayar F, Shariatmadar Ahmadi R, Rezazadeh Sefideh M, Fathiazar A. Evaluation of the efficacy of Aloevera toothpaste on Periodontal index in patients with gingivitis. Res Dent Sci. 2019;16(2):72-7.

21- Athiban PP, Borthakur BJ, Ganesan S, Swathika B. Evaluation of antimicrobial efficacy of Aloe vera and its effectiveness in decontaminating gutta percha cones. J Consery Dent. 2012;15(3):246-8.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-20]