دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دانشکده دندانپزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای دندانپزشکی

موضوع:

مقایسه اثر دود سیگار و سیگارت بر رشد استرپتوکوک موتانس و استرپتوکوک سنگوئیس به روش in vitro

اساتید راهنما:

جناب آقای دکتر هومن ابراهیمی

جناب آقای دکتر عبدالله بازرگانی

استاد مشاور:

خانم دکتر سارا پور شهیدی

دانشجویان:

فاطمه کریمی

الهام انصاری فرد

سال تحصیلی ۸۸-۸۷

۱۳۸۹/۲/-۶

مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
شعبه مازندران

۱۳۵۰۲۸

به نام خدا

ارزیابی پایان نامه

پایان نامه جهت دریافت مدرک دکترای دندانپزشکی عمومی تحت عنوان:

"مقایسه اثر دود سیگار و سیگارت بر رشد استرپتوکوک موتانس واسترپتوکوک سنگوئیس به روش آزمایشگاهی"

توسط فاطمه کریمی و الهام انصاری فرد در تاریخ ۸۸/۶/۳۱در کمیته بررسی پایان نامه مطرح و با نمره .....۱۷.۲۵..... و درجه .....عالی..... به تصویب رسید.

اساتید راهنما:

۱. جناب آقای دکتر هومن ابراهیمی

۲. جناب آقای دکتر عبدالله بازرگانی

استاد مشاور:

۱. سرکار خانم دکتر سارا پورشهیدی

اساتید هیئت داوری:

۱. جناب آقای دکتر هومن ابراهیمی

۲. جناب آقای دکتر عبدالله بازرگانی

۳. جناب آقای دکتر عبدالعزیز حق نگهدار

۴. سرکار خانم دکتر سارا پورشهیدی

۵. سرکار خانم دکتر زهره جعفری

۶. سرکار خانم دکتر مشاورنیا

۱۳۸۹/۲/-۶

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده فارسی..... ۱

فصل اول: مقدمه..... ۲

فصل دوم:بررسی متون..... ۳

روش مطالعه باکتری ها..... ۴

طبقه بندی باکتری ها..... ۴

استرپتوکوک ها..... ۵

استرپتوکوک های ویریدنس..... ۶

استرپتوکوک موتانس..... ۹

استرپتوکوک سنگوئیس..... ۱۵

ترکیبات سیگارت..... ۱۷

ترکیبات دود سیگارت..... ۱۹

ترکیبات سیگار..... ۲۵

عوارض سیگار..... ۲۷

فصل سوم:مروری بر مقالات..... ۲۸

اثرات سیگار بر بدن انسان ۲۸

اثرات سیگار بر حفره‌دهان..... ۲۹

سیگار و پوسیدگی دندانی..... ۳۱

اثرات سیگار بر جمعیت میکروبی دهان..... ۳۴

فصل چهارم:مواد و روش ها ۴۰

اهداف..... ۴۰

فرضیات..... ۴۳

نوع مطالعه..... ۴۴

نمونه مورد مطالعه..... ۴۴

حجم نمونه..... ۴۴

وسائل و مواد مورد استفاده..... ۴۴

انتخاب سیگار و سیگارت ۴۶

کشت سویه ها در بلاد آگار ۴۷

محیط ها و نحوه تهیه آنها..... ۴۸
انکوباسیون نهایی سویه های موتانس و سنگوئیس..... ۴۹
تهیه عکس دیجیتالی و اندازه گیری قطر کلنی ها..... ۴۹
نحوه محاسبه قطر کلنی ها در برنامه فتوشاپ..... ۴۹
تستهای آنالیر داده ها ۵۰
فصل پنجم:یافته ها..... ۵۱
فصل ششم:بحث و نتیجه گیری ۶۲
پیشنهادات..... ۷۷
خلاصه انگلیسی..... ۷۸
منابع..... ۷۹
ضمائم

چکیده :

زمینه و اهداف:هدف از این تحقیق مطالعه ی اثر دود سیگار و سیگارت بر رشد استرپتوکوک موتانس و سنگوئیس و بررسی نسبت رشد موتانس به سنگوئیس در این محیط ها می باشد.

مواد و روش ها:سوش های استاندارد استرپتوکوک موتانس (ATCC25175) واسترپتوکوک سنکوئیس(ATCC10556) روی محیط بلاد آگار گشت داده شدند و برای 48 ساعت در محیط های مختلف که شامل هوای اتمسفر، دی اکسید کربن، کم اکسیژن، سیگار و سه نمونه سیگارت (وینستون،وینستون اولترالایت وکنت) انکوبه شدند.پس از تهیه عکس دیجیتالی، در برنامه نرم افزاری فتوشاپ ،قطر کلنی ها اندازه گیری شد.سپس داده ها توسط تست های آماری POST HOC وgeneral linear model آنالیز گردیدند .

نتایج:نتایج نشان داد محیط های سیگار، سیگارت، دی اکسیدکربن و کم اکسیژن همگی بطور معنی داری سبب افزایش رشد باکتری های مورد مطالعه گردیدند. (p=0/000) و در همه محیط ها به غیر از دود سیگار رشد موتانس بیشتر از سنگوئیس بود .قطر کلنی های موتانس در محیط های دی اکسید کربن ،کم اکسیژن ،سیگار ،سیگارت های وینستون ،وینستون اولترالایت و کنت نسبت به محیط اتمسفری به ترتیب 82٪، 65٪، 69٪، 106 ٪،80 ٪ ، 92٪ افزایش و قطر کلنی های سنگوئیس به ترتیب 45٪، 53 ٪، 137٪،89٪، 40٪، 55٪ افزایش نشان دادند.

بحث: مطالعه حاضر حاکی از اثر افزایشی دود سیگارت برنسبت موتانس/سنگوئیس است اما دود سیگار این رابطه را کاهش داد.

فصل اول:

مقدمه

فصل اول: مقدمه

دهان یکی از متنوع ترین جمعتیهای میکروبی را در خود جای داده است. بیش از 350 الی 400 نوع میکروارگانیسم در دهان یافت می شود. در هر میلی لیتر از بزاق بیش از صد میلیون میکروارگانیسم وجود دارد(۱). استرپتوکک موتانس و استرپتوکک سنگوئیس دو باکتری مهم در حفره دهان هستند. استرپتوکک موتانس عامل اصلی پوسیدگی دندان است. استرپتوکک سنگوئیس نقش عمده ای در ایجاد پوسیدگی دندان ندارد اما بعنوان یکی از باکتریهای اولیه تشکیل پلاک میکروبی محسوب می گردد. طبق تحقیقات ثابت شده است که هر چه نسبت استرپتوککهای پوسیدگی زا شامل استرپتوکک موتانس نسبت به استرپتوککهای غیر پوسیدگی زا نظیر سنگوئیس بیشتر باشد، خطر ایجاد پوسیدگی دندان افزایش می یابد و بالعکس. در حقیقت استرپتوککهای غیر پوسیدگی زا که جزء فلورنرمال هستند ممکن است مطلوب باشند چرا که قابلیت کنترل یا مهار میکروارگانیسمهای بیماری زا را دارا هستند(۲).

علاوه بر رژیم غذایی، بهداشت، داروها و ... عوامل متعددی بر تعادل میکروبی حفره دهان تأثیر می گذارند. سیگار نیز یکی از عواملی است که

گفته شده می تواند روی اکوسیستم میکروبی دهان موثر باشد(۳). برخی از محققین اظهار داشته اند که سیگار رشد باکتریهای دهان را افزایش می دهد (۵ و۴) و برخی دیگر نظر عکس داشتند (۷ و۶). محققینی که به تقویت رشد استرپتوکک موتانس توسط سیگار معتقدند در نتایجشان اظهار داشته اند چون سیگار رشد استرپتوکک موتانس را تقویت می کند خطر پوسیدگی دندان افزایش می یابد (۸). هر چند این گفته نادرست نیست، ولی لازم است علاوه بر تعیین اثر سیگار بر رشد استرپتوکک موتانس، تأثیر آن بر رشد باکتری رقیب آن یعنی استرپتوکک سنگوئیس نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. زیرا همانطور که گفته شد افزایش نسبت باکتریهای پوسیدگی زا به باکتریهای غیر پوسیدگی زا خطر ایجاد پوسیدگی دندان را افزایش می دهد. این تحقیق شکل گرفت تا به این سئوال پاسخ دهد : «آیا دود سیگار بر رشد استرپتوککهای موتانس و سنگوئیس اثر دارد و آیا این تأثیر در مورد دو باکتری به یک میزان است یا خیر.»

فصل دوم:

بررسی متون

فصل دوم : بررسی متون

روش مطالعه باکتریها : برای تشخیص و مطالعه خصوصیات یک باکتری ابتدا لازم است آن را از منبع مناسبی برداشت نمود. از آنجا که در یک مکان یک باکتری به طور خالص وجود ندارد و عموماً اجتماع پیچیده ای از آنها یافت می شود لازم است بعد از نمونه برداری، کشت اولیه از آنها به عمل آورد و از کلنی های تشکیل شده برای تهیه کشت خالص (Pure Culture) استفاده نمود. در یک کشت خالص فقط یک نوع باکتری وجود دارد. در مرحله بعد با روش های بیوشیمیایی مخصوص می توان به هویت اصلی باکتری پی برد و مطالعات مورد نظر را بر روی آن به عمل آورد (۹).

طبقه بندی باکتریها : بدون طبقه بندی، مطالعه باکتریها مشکل خواهد بود. روشهای مختلفی برای طبقه بندی باکتریها بکار می رود. شکل سلول و واکنش به رنگ آمیزی گرم و روشهای متابولیسم از معمول ترین روشهای طبقه بندی است. باکتریها از لحاظ شکل به سه دسته کوکسی، باسیل و اسپیروکت تقسیم می شوند. کوکسی ها کروی، باسیلها میله ای و اسپیروکتها رشته ای شکلند. کوکسی ها از لحاظ نحوه آرایش به سه

دسته استرپتوکک (زنجیره ای)، استافیلوکک (خوشه ای) و دیپلوکک (جفت جفت) طبقه بندی می شوند (۱۰). از آنجا که موضوع تحقیق مربوط به استرپتوکک هاست، بطور مختصر بشرح این دسته باکتریایی می پردازیم.

استرپتوککها :

استرپتوککها، کوکسیهای گرم مثبت، زنجیره ای و کاتلاز منفی هستند. روشهای مختلفی برای طبقه بندی استرپتوککها وجود دارد. یکی از اینها، طبقه بندی براساس نوع همولیز است. استرپتوککها براساس نوع همولیز به سه دسته تقسیم می شوند.

1-آلفا همولیتیک: به استرپتوکوک هایی که گلبول های قرمز خون را با کمک آنزیم آلفا همولیزین بصورت ناقص لیز میکنند ،آلفا همولیتیک گویند.لیز ناقص گلبول قرمز به صورت یک ناحیه سبز رنگ در اطراف کلنی دیده میشود.استرپتوکوکهای ویریدنس که استرپتوکوکهای عامل پوسیدگی دندان به این گروه تعلق دارند،جزء استرپتوکوک های آلفاهمولیتیک هستند.

2-بتاهمولیتیک:دسته ای از استرپتوکوک ها که با استفاده از آنزیم بتاهمولیزین قادر به لیز کامل گبولهای قرمز خون در محیط بلاد آگار می باشند،بتا همولیتیک گویند.لیز کامل گلبول قرمز یک ناحیه روشن در اطراف کلنی پدید می آورد.

3-گاما همولیتیک:به استرپتوکوکهائی که قادر به لیز گلبول قرمز خون نیستند و هیچ نوع الگوی همولیزی ندارند،گاما همولیتیک یا غیر همولیتیک گویند(۱۱)

استرپتوکوکهای ویریدنس :

ویژگی های کلی:استرپتوکوکهای آلفا همولیتیک اصلی شامل دو گروه استرپتوکوک پنومونیه و استرپتوکوک ویریدانس است.این استرپتوکوکها بیشتر دارای الگوی همولیزآلفا هستند و رنگ کلنی آنها در بلاد آگار سبز است.البته الگوی های غیر همولیتیک و بتا نیز در آنها یافت می شود .در صفرا(دی اکسی کولات)حل نشده و دیسک اپتوچین بر رشد آنها بی تاثیر است.در محلول 6/5٪نمک طعام و همچنین در دمای 10درجه توانایی رشد ندارند،ولی دمای 45 درجه سانتیگراد را می توانند تحمل کنند .در

محیط حاوی 5٪ساکاروز پلی ساکارید لوان و دکستران تولید می کننـد و نیز قادرنداز کربوهیدراتها اسید تولید کننـد وPH را در حـدی کـه سـبب معدنی زدایی مینای دندان شود کاهش دهند. اسـترپتوککهای ویریـدانس قسمت اعظم فلورنرمال مجرای تنفسی فوقانی را تشکیل می دهند. تعـداد زیادی از استرپتوککهای گروه ویریدانس قادرند در شرایط بـی هـوازی یـا فشار اکسیژن کم بهتر از زمانیکه در هوا انکوبه می شوند، رشد کننـد کـه به این دسته میکروآیروبیـک گوینـد. همچنـین تعـداد زیـادی از آنهـا در غلظت 10٪ ـ 5 دی اکسید کربن رشد بیشتری از خود نشان مـی دهنـد که به این دسته کاپنوفیلیک می گویند. ویریدانسهای توانـایی اتصـال بـه سلولهای اپی تلیال و اندوتلیال را دارا هستند و این اتصال فاکتور کلیـدی در توانایی ایجاد بیماری توسط آنهاست. برخی از آنها ماننـد اسـترپتوکک موتانس از ساکاروز مقدار زیادی پلی ساکارید مانند دکستران یا لوان مـی سازند که نقش عمده ای در ایجاد پوسیدگی دندان به عهده دارند(۱۲).

انواع : گروه ویریدانس شامل چندین گونه استرپتوکک است کـه برخـی از مهمترین آنها استرپتوکک های موتانس، سالیواریوس، میتیس، سنگوئیس و میلری است (۱۲).

نقش استرپتوکوکهای ویریدانس در سلامت و بیماری:

استرپتوککهای ویریدانس بیش از نیمی از باکتریهای دهان را تشکیل می دهند (۱۳) و همین نسبت نقش بسیار مهم آنها را در فلورنرمال دهان نشان می دهد. در شرایط معمول و سلامت، موجودات غیر پوسیدگی زای ساکن دهان (مانند استرپتوکک سنگوئیس) قابلیت کلونیزاسیون روی دندانها را دارا هستند. ولی قابلیت ایجاد پوسیدگی را ندارند. این فرایند می تواند از جایگزینی میکروارگانیسم های پوسیدگی زا نظیر استرپتوکک موتانس در سطوحی که قبلاً با پلاک پوشیده شده اند، جلوگیری کند. بنابراین پلاکهایی که میکروارگانیسم های غالب آنها از انواع معمول ساکن در دهان مثل استرپتوکک سنگوئیس هستند ممکن است مطلوب باشند چراکه قابلیت کنترل یا مهار میکروارگانیسم های بیماریزا را دارا هستند (۱). استرپتوکک های ویریدانس قادرند با سنتز دکستران و لوان به دندان و دریچه های آسیب دیده یا مصنوعی قلب متصل گردند. نیمی از موارد آندوکاردیت عفونی تحت حاد توسط ویریدانس ها به وجود می آید که دو سوم موارد مربوط به استرپتوکک های موتانس و سنگوئیس است (۱۲). استرپتوککهای ویریدانس به همراه میکروارگانیسم های بی هوازی در بروز آبسه های مغزی، شکمی و کبدی، بروز سینوزیت، عفونی شدن زخمها و

منتژیت نقش دارند (۱۴). نوددرصد از گونه های هوازی باکتریهایی که عفونتهای دندانی را ایجاد می کنند از رده استرپتوککها و آنهم بیشتر استرپتوککهای ویریدانس است (۱۵). استرپتوکک سنگوئیس از این دسته به عنوان مهمترین عامل اندوکاردیت عفونی تحت حاد از بیشتر بیماران مبتلا ایزوله شده است (۱۶و۱۴).

استرپتوکک موتانس (Streptococcus mutans)

اولین بار Clarke در سال 1924 موفق به شناسایی یک باکتری گردید که می توانست اسید کافی برای ایجاد پوسیدگی دندان را تولید کند. او آن را «موتانس» نامید. درمطالعه in vitro موفق شد به وسیله این باکتری در دندان کشیده شده پوسیدگی ایجاد کند. سه سال بعد Abercrombie و Scott استرپتوکک موتانس را از نمونه بیمار مبتلا به اندوکاردیت ایزوله کردند. سرانجام در سال 1960 نام این استرپتوکک به عنوان عامل اصلی پوسیدگی دندان وارد چندین کتاب مرجع شد (۱۷).

استرپتوکک وقتی در شرایط بی هوازی در محیط کشت بلادآگار به مدت دو روز انکوبه می شوند، سفید یا خاکستری، گرد یا نامنظم و محدب هستند و 0/5 الی 1 میلی متر قطر دارند. گاهی اوقات به سطح بلادآگار

می چسبند. معمولاً آلفا یا غیر همولیتیک آن هم یافت شده است. روی آگار محتوی ساکارز کلنی های توده ای و خشن تولید می کنند که حدود 1 میلی متر قطر دارند که حاوی مایعی است که از پلی ساکارید خارج سلولی محلول در آب تشکیل شده است و بر سطح یا اطراف کلنی های آنها قرار می گیرد. گلوکان و فروکتان دو نوع پلی ساکارید خارج سلولی است که توسط این باکتری تولید می شود. نام آن بیانگر شکلهای متفاوتی است که این باکتری از خود نشان می دهد. زیرا علاوه بر شکل کوکسی، به اشکال میله ای کوتاه یا کوکوباسیل نیز دیده می شود. حرارت ایده آل برای رشد آن 36 درجه سانتیگراد است. ولی بین دمای 25 الی 45 درجه سانتیگراد نیز قادر به رشد است. در صفرای چهل درصد قادر به رشد است ولی در کلرور سدیم چهار درصد رشد نمی کند (۱۸). تقریباً همه قندهای معمولی که برای تشخیص استرپتوککها استفاده می شود توسط این باکتری تخمیر می گردد. وقتی که در محیط کشت مایع (broth) حاوی 5 درصد ساکاروز کشت داده شود، برخی کلنی ها به لوله آزمایش می چسبند. از دسته استرپتوکک های ویریدانس فقط استرپتوککهای موتانس و بوویس توانایی تخمیر قند مانیتول را دارند (۱۷).

رشد بیشتر سویه ها تحت شرایط بی هوازی تقویت می شوند (۱۸). استرپتوککهای گروه موتانس با تولید برخی از آنزیمها خود را در برابر اثرات سمی اکسیژن محیط محافظت می کنند (۱۹).

انواع : این باکتری به همراه شش باکتری دیگر به دسته بزرگتری به نام «Streptococci Group Mutans» تعلق دارد که از لحاظ برخی واکنشهای بیوشیمیایی و خصوصیات ژنتیکی با هم متفاوتند (۲۰).

گروه استرپتوکک موتانس شامل هفت استرپتوکک مختلف و هشت سروتیپ است که از a تا h نامگذاری می شود. استرپتوکک موتانس (سروتیپ f/e/c) و استرپتوکک سوبرینوس (سروتیپ g/d) معمول ترین گروه هایی هستند که در انسان ایزوله شده اند. سروتیپ های استرپتوکک موتانس اولین بار بوسیله Zinner و همکاران وی در سال 1965 تشریح شد Bratthall به تعداد سروتیپ های آن افزود. ابتدا پنج سروتیپ که از a تا e نامگذاری می گردد برای شناسایی سروتیپ های این استرپتوکک مورد استفاده قرار گرفت. Perch و همکارانش دو سروتیپ f و g را به آنها اضافه کردند. هشتمین سروتیپ (h) اخیراً از دهان میمونهای ماکاکه ایزوله گردید (۱۸). همه سروتیپ های استرپتوکک موتانس توانایی ایجاد

پوسیدگی را دارند (۲۱). معمول ترین عضو این گروه همان استرپتوکک موتانس است. استرپتوکک سوبرینوس، رتوس، کریکتوس در درصد کمتری از جمعیت های انسانی یافت می شوند (۱۷).

اهمیت : استرپتوکک موتانس عامل اصلی پوسیدگی دندان است. موتانس از ساکاروز چندین نوع پلی ساکارید خارج سلولی می سازد که در کلونیزاسیون آن به بافت سخت دندان و مخاط دارای اهمیت ویژه است و یکی از استرپتوککهایی است که در افراد مبتلا به اندوکاردیت عفونی ایزوله شده است (۱۵). هر چند برخی از محققین پوسیدگی را نوعی عفونت می نامند، این باکتری در عفونت های بافت نرم چندان معمول نیست (۱۷).

فاکتورهای بیماریزایی استرپتوکک موتانس : خاصیت پاتوژنیسیته استرپتوکک موتانس به وجود چندین فاکتور ویرولانس مربوط می شود که برخی از آنها شامل موارد زیر است.

الف ـ اتصال : 1ـ آنزیم فروکتوزیل ترانسفراز و گلیکوزیل ترانسفراز : این آنزیمها سنتز گلوکان محلول و غیر محلول و فروکتان را از ساکاروز

تسهیل می کنند و سبب اتصال باکتری به پلیکل دندان می گردنـد (۲۲). پلیکل به لایه ای بدون سلول و بی شکل از مواد آلی اطلاق می شـود کـه طی 2 ساعت پس از زدودن کامل تمام مواد آلی و باکتریها از سطح دندان بر روی آن تشکیل شده و قادر است به طول کامل سطح ناحیه ای را کـه قـبلاً عریـان بـوده بپوشـاند و در درجـه اول از رسـوب انتخـابی اجـزای پروتئینی بزاق از جمله لیزوزیم، آلبـومین، IgA و IgG بوجـود مـی آیـد (۲۳).

2ـ Cell surface protein antigen I/II : پروتئین هایی هستند که بر روی دیواره سلولی بیشتر اسـترپتوککهای مـرتبط بـا انسـان قـرار مـی گیرند و سبب اتصال به مولکولهای بـزاق و دیگـر باکتریهـا در پـلاک مـی گردند.

3ـ Glucan – binding proteins (GbP_s) : پروتئین سـطح سـلول باکتری است که سبب اتصال باکتری به دندان می گردد.

4ـ Dextran Sucrase : آنزیمی که سـبب شکسـتن سـاکاروز و تولیـد ماتریکس خارج سلولی می شود و به پیشرفت کلونیزاسیون باکتری کمک می کند (۲۲).