(مقالهٔ پژوهشی)

بررسی پدیدهٔ غیر فعال شدن داروهای ضد عفونی‌کنندهٔ کانال ریشه توسط پودر عاجی

محمد یزدی زاده[1]، سمیه قمری[2*]، میلادعلی کاظمی[3]، سحر جلالی[2]

۱-استادیارگروه اندودانتیکس.
۲-دستیار تخصصی گروه اندودانتیکس.
۳-دانشجوی دکترای حرفه ای دندانپزشکی.

۱و۲-گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳-دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
سمیه قمری؛ گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۸۳۴۳۴۷۹۶
Email: somaye_ghamari@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: مطالعهٔ حاضر با هدف ارزیابی تأثیر عاج دندانی بر خاصیت ضد عفونی‌کنندگی محلول‌های هیپو کلریت سدیم کلرو هگزیدین، یدین و پتاسیم یدین انجام شد.

روش بررسی: باکتری مورد مطالعه در این تحقیق انترو کوکوس فکالیس کد ۱۳۹٤ بود که پس از کشت در محیط TSA از کلونی خالص آن سوسپانسیون با غلظت ۰/۵٪ pepton water تهیه شد. همچنین از دندان مولر سوم نهفته برای تهیهٔ سوسپانسیونی از پودر عاجی استفاده شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به آن اضافه شد و در زمان‌های صفر، یک و ۲٤ ساعت ۱۰ میکرولیتر از محلول برداشته و کشت داده شد. در گروه کنترل از ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به جای پودر عاجی استفاده شد. بعد از ۲٤ ساعت تعداد کلونی‌ها با میکروسکوپ و روش مشاهدهٔ چشمی شمارش شده و نتایج با نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون مان‌ویتنی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: براساس نتایج این مطالعه کلرو هگزیدین ۰/۲٪ هیپو کلریت سدیم ۵٪ و ۱٪، یدین ۲٪ و یدید پتاسیم ٤٪ در زمانهای ۱،۰ و ۲٤ ساعت باکتری را در محیط کشت حذف نمودند. همچنین کاهش غلظت هیپو کلریت سدیم از ۵٪ به ۱٪ اثری بر فعالیت آنتی‌باکتریال این ماده در مجاورت با پودر عاجی در شرایط آزمایشگاهی در زمان‌های مختلف آزمایش ندارد، ولی در مورد کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ و یدین ۰/۲٪ یدید پتاسیم ۰/٤٪ در مجاورت با پودر عاجی فقط در زمان ۲٤ ساعت قادر به حذف باکتری هستند.

نتیجه‌گیری: این آزمایش نشان داد که عاج توانایی مهار کردن خاصیت ضد باکتریال مواد ضد عفونی کننده کانال ریشه را دارا می باشد که این مقدار مهار شدگی با غلظت مواد و زمان تماس آن ها با عاج درارتباط می باشد.

کلید واژگان: ضد عفونی‌کننده‌های داخل کانال، عاج، کانال ریشه.

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۳/۵/۱۹ اعلام قبولی: ۱۳۹۳/۶/۱

مقدمه

میکرو ارگانیسم‌ها عامل اصلی بیماری‌های پالپ و پری-اپیکال می‌باشد و انتشار میکروب‌ها از کانال عفونی می‌تواند باعث درگیری بافت‌های پری‌اپیکال گردد (۱،۲) هر چند پاک-سازی مکانیکی و کاربرد محلول‌های شستشو دهندهٔ دارای خاصیت ضد میکروبی، اغلب میکروب‌های داخل کانال ریشه را حذف می‌کند، ولی نشان داده شده است که در اکثر موارد بخشی از فلور میکروبی، همچنان باقی می‌ماند (۳-۵)

مطالعات به طور قطعی ثابت کرده‌اند که آماده‌سازی با وسایل و بدون توجه به جنس آنها (استنلس‌استیل یا نیکل تیتانیوم) قادر به ضد عفونی کردن کانال ریشه نیست.

بنابراین نیاز است تا برای حذف بیشتر میکروبها و لایهٔ اسمیر از شست‌وشو دهندهٔ مؤثر استفاده کنیم. نشان داده شده که پاتوژن اندودنتیکی Enterococcus faecalis رایج‌ترین میکرو ارگانیسم که از دندانهای بهبود نیافته پس از درمان اندودنتیکی به دست آمده، نسبت به خاصیت آنتی‌باکتریال کلسیم هیدروکساید مقاوم است E.faecalis در موارد درمان مجدد یافت شده و از بین بردن آن از کانال ریشه مشکل است. محلولهای شست‌وشو جهت حذف میکرو اورگانیسمها ضروری می‌باشند، و در طول زمان، مواد شیمیای مختلفی جهت دستیابی به این هدف ارائه شده‌اند. محلول شست‌وشو دهندهٔ ایده‌ال یا ترکیبی از شست‌وشو دهنده‌ها باید باکتری را بکشد، بافت نکروتیک را حل کند، کانال را لغزنده سازد، لایهٔ اسمیر را بر دارد، و بافت سالم را تحریک نکند (۶).

تنوع گسترده‌ای از مایعات شست‌وشو دهنده وجود دارد (۷) از جمله هیپو کلریت سدیم، MTAD،EDTA (ترکیبی از Doxy Cyclin، اسید سیتریک و یک شست‌وشو دهنده به نام Tween 80، کلرو هگزیدین و یدین پتاسیم یداید. تاکنون مطالعات زیادی در زمینهٔ محلولهای ضدعفونی کنندهٔ کانال و ویژگی‌های آنها در درمان ریشه انجام شده است (۸). مطالعات Invitro بر روی خواص ضد باکتری محلولهای ضد عفونی هیپو کلریت سدیم و کلر هگزیدین نشان دادند که هر دو ماده در محیط کشت قادرند تا باکتری را حذف نمایند، ولی داخل کانال، خواص ضد باکتریال این دو محلول تغییر می‌کند و اثر ضد باکتریال کمتری پیدا می‌کنند(۹). یک توضیح در این مورد غیر فعال شدن تمام یا بخشی از خاصیت ضد باکتریال محلولهای شست‌وشو دهنده توسط اجزای عاج دندانی می‌باشد (۴، ۵).

مطالعهٔ حاضر با هدف ارزیابی تأثیر عاج دندانی بر خاصیت ضد عفونی‌کنندگی محلول‌های هیپوکلریت سدیم ۱ و ۵ درصد کلرو هگزیدین ۰/۲٪ و۰/۰۲٪، یدین ۰/۲٪ و ۲٪ و پتاسیم یداید ۴ ٪ و ۰/۴٪ انجام شد. علت انتخاب این غلظتها مقایسهٔ مطالعه با سایر مطالعه‌های گذشته می‌باشد (۳، ۴، ۵، ۷). با توجه به اینکه در مطالعه‌های گذشته پودر عاجی بدون حذف سمان و پاک‌سازی کانال تهیه و نمونه‌ها قبل از اینکه به پودر عاجی تبدیل شوند، اتو کلاو شده‌اند و احتمال آلودگی در زمان تهیه پودر عاجی وجود دارد، لذا در این مطالعه، سمان حذف و کانال پاک‌سازی شده و ذرات قبل و بعد از استاندارد سازی اتو کلاو شدند تا تأثیر احتمالی سمان و مواد آلی موجود در کانال حذف شود.

روش بررسی

این مطالعه، یک مطالعهٔ آزمایشگاهی بنیادی کاربردی می‌باشد. در این مطالعهٔ آزمایشگاهی از سوش استاندارد انتروکوکوس فکالیس کد ۱۳۹۴ استفاده شد. سوش استاندارد از کلکسیون قارچ‌ها و باکتریهای مؤسسهٔ تحقیقات صنعتی _عفونی ایران تهیه گردید. به منظور تهیهٔ سوسپانسیون باکتری، با استفاده از لوپ تلقیح استریل حداکثر ۵-۴ کلونی مجزا از کشت استوک و خالص شده را برداشته و به یک لوله حاوی ۵-۴ میلی‌لیتر از محیط مولر هینتون براث تلقیح کرده و محیط به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرما-گذاری شد.

مراحل کشت نمونهٔ باکتری لیوفیلیزه شده (ایجاد یک فرآوردهٔ پایدار از یک مادهٔ بیولوژیکی از طریق سرد کردن سریع و گرفتن آب از این فرآوردهٔ یخزده تحت خلاء شدید)

به منظور آماده‌سازی باکتری تهیه شده از نمونهٔ لیوفیلیزه شده، تحت شرایط کاملاً استریل بعد از شکست سرنگ حاوی پودر باکتری، باکتری مورد نظر را در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مغذی BHI وارد کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرما گذاری می‌شد. بعد از مشاهدهٔ کدورت در محیط به منظور نگهداری باکتری، آن را به محیط آگار دار مانند نوترینت آگار و یا بلاد آگار انتقال داده شد.

تهیهٔ محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth)

به منظور مقایسهٔ رشد باکتری با لولهٔ مک فارلند، ۴ لوپ استاندارد از باکتری مورد نظر را در محیط TSB کشت داده و با مقایسهٔ کدورت محیط حاوی باکتری با لولهٔ مک فارلند، غلظت مناسبی از باکتری را به‌دست می‌آوریم.

تهیهٔ محیط کشت TSA (Triptic soy agar)

در این مطالعه از پودر محیط کشت **TSA** مرک (Merck) استفاده شد. پودر را در ۱ لیتر آب مقطر حل نموده و آن را در حرارت ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتو کلاو، به مدت ۱۵ دقیقه استریل نمودیم. بعد از سرد شدن محیط ۲۵ میلی-لیتر از محیط کشت را در صفحه‌هایی که قطر آنها ۱۰-۹ سانتی‌متر می‌باشد، ریخته و پس از سفت شدن محیط برای کنترل استریل بودن، صفحه‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند.

تهیهٔ محیط کشت Pepton Water

میزان ۱۵ گرم پودر محیط کشت آگار را در ۱ لیتر آب مقطر حل نموده و آن را در حرارت ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتو کلاو، به مدت ۱۵ دقیقه استریل نمودیم.

۳-۲-۵ تهیهٔ محلول‌های شست‌وشو دهندهٔ هیپوکلریت سدیم، کلرو هگزیدین‌استات و یدین پتاسیم یداد

هر یک از محلول‌های شت‌وشو دهنده در این مطالعه در غلظت خاصی مورد مطالعه قرار گرفتند. محلول هیپوکلریت سدیم در غلظت‌های ۱٪ و ۵٪، محلول کلرو هگزیدین استات در غلظت‌های ۰/۲٪ و ۰/۰۲٪، یدین ۰/۲٪ و ۲٪ و پتاسیم یداید ۴ ٪ و ۰/۴٪ به‌کار برده شدند.

تهیهٔ پودر عاج دندان

در این بررسی تجربی آزمایشگاهی، تاج ۱۵ عدد دندان عقل جراحی شده سالم و بدون پوسیدگی از ناحیهٔ CEJ قطع شد. کانال‌های ریشه با استفاده از فایل دستی و به روش Step back تا شمارهٔ ۴۰ فایل شدند، سپس توسط دریل‌های گیتس گلیدن شماره‌های ۲ و ۳ گشادسازی کرونال تکمیل شد. در فواصل کاربرد وسایل، شست‌وشو با ۲ میلی‌لیتر نرمال‌سالین انجام شد. به منظور حذف سمان از سطح ریشه، با استفاده از فرز فیشور ۰/۸ شیار راهنما در ۴ جهت ریشه ایجاد شد و پس از آن تمام سمنتوم با استفاده از دیسک پرداخت از سطح ریشه حذف گردید، سپس نمونهٔ اتو کلاو شده و توسط آسیاب دستی خرد شدند و توسط الک آزمایشگاهی شمارهٔ ۲۰۰ به اندازهٔ ۷۰ میکرونی استاندارد سازی شدند و پودر حاصل جهت مراحل بعدی در محیط خشک نگهداری شد.

تهیهٔ سوسپانسیون پودر عاجی

برای حذف احتمال آلودگی طی مراحل تهیهٔ پودر عاجی، مجدداً آن را توسط اتو کلاو استریل کرده و سوسپانسیونی متشکل از ۲۸ میلی‌گرم پودر عاجی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد.

۴-۲-۸ تهیهٔ سوسپانسیون باکتریایی

۱۰۰ میکرولیتر از باکتری مورد مطالعه (انترو کوکوس فکالیس) از محیط TSB به محیط TSA انتقال داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرما گذاری شد. سپس از کلونی‌های خالص این باکتری سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵٪ در Pepton water تهیه شد.

تهیهٔ محلولهای هیپو کلریت سدیم و مجاورت آن با سوسپانسیون باکتریایی

به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی محلول هیپو کلریت سدیم در غلظت‌های ۱٪ و ۵٪، در ابتدا غلظت‌های مورد بررسی تهیه شده، ۵۰ میکرو لیتر از هر غلظت محلول همراه با ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون پودر عاجی درون یک میکرو تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه گرما گذاری شد. بعد از گذشت یک ساعت، ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری به مخلوط

فوق اضافه شد. در زمان‌های صفر، یک ساعت و ۲۴ ساعت، ۱۰ میکرو لیتر از محلول میکرو تیوب‌ها برداشته شد و توسط سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های یک دهم، یک صدم و یک هزارم تهیه گردید، سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت TSA کشت داده شد. نرمال‌سالین به عنوان کنترل منفی به جای پودر عاجی به‌کار برده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون شمارش تعداد کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت توسط شمارش چشمی انجام شد و آزمایش در هر گروه سه بار تکرار شد. نتایج با نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون مان ویتنی مورد بررسی قرار گرفت و ($P <$ ۰/۰۱) به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

تهیهٔ محلولهای کلرو هگزدین‌استات و مجاورت آن با سوسپانسیون باکتریایی

به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی محلول کلرو هگزدین‌استات در غلظت‌های ۰/۲٪ و ۰/۰۲٪ در ابتدا غلظت-های مورد بررسی تهیه شد، ۵۰ میکرولیتر از هر غلظت محلول همراه با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پودر عاجی درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه گرما گذاری شد. بعد از گذشت یک ساعت، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به مخلوط فوق اضافه شد. در زمان های صفر، یک ساعت و ۲۴ ساعت، ۱۰ میکرولیتر از محلول میکروتیوب‌ها برداشته شد و توسط سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های یک دهم، یک صدم و یک هزارم تهیه گردید، سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت TSA کشت داده شد. نرمال‌سالین به عنوان کنترل منفی به جای پودر عاجی به‌کار برده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، شمارش تعداد کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت توسط شمارش چشمی صورت گرفت و آزمایش در هر گروه سه بار تکرار شد.

تهیهٔ محلول‌های یدین پتاسیم یداید و مجاورت آن با سوسپانسیون باکتریایی

به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی محلول یدین پتاسیم یداید در ابتدا غلظت‌های مورد بررسی تهیه شده، ۵۰ میکرولیتر از هر غلظت محلول همراه با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پودر عاجی درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی-لیتری استریل ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه گرما گذاری شد. بعد از گذشت یک ساعت، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به مخلوط فوق اضافه شد. در زمان‌های صفر، یک ساعت و ۲۴ ساعت، ۱۰ میکرولیتر از محلول میکروتیوب‌ها برداشته شد و توسط سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های یک دهم، یک صدم و یک هزارم تهیه گردید.

سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت TSA کشت داده شد. نرمال‌سالین به عنوان کنترل منفی به جای پودر عاجی به‌کار برده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، شمارش تعداد کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت توسط شمارش چشمی صورت گرفت و آزمایش در هر گروه سه بار تکرار شد (شکل‌های ۱ تا ۷).

یافته‌ها

در بررسی اثر ضد باکتریایی هیپو کلریت سدیم ۱٪ و ۵٪ نتایج زیر حاصل شد

میانگین نتایج شمارش کلونی‌های انتروکوک فکالیس گروه آزمون پس از تماس با هیپو کلریت ۱٪ و ۵٪ در زمان-های صفر، یک و ۲۴ ساعت و تمام رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ صفر بود. در گروه کنترل هم نتایج مشابه گروه آزمون بود.

نتایج آزمون آماری مان ویتنی برای هیپو کلریت سدیم ۵٪ و ۱٪

در این قسمت از آزمون آماری مان ویتنی برای مقایسهٔ میانگین تعداد کلونی در دو گروه کنترل و آزمون استفاده شده است. آزمون مان ویتنی از آزمون‌های ناپارامتریک بوده و انجام آن مستلزم فرض خاصی بر داده‌ها نیست.

تفسیر: در این قسمت دو گروه کنترل و آزمون در حضور محلول هیپو کلریت سدیم (با دو غلظت متفاوت)، از نظر تعداد کلونی و با استفاده از آزمون مان ویتنی مقایسه شدند. زمانی که غلظت ۵٪ و ۱٪ بوده تعداد کولونی در تمام تکرارهای دو گروه صفر مشاهده شد، بنابراین در این حالت آزمون اجرا نشد.

در بررسی اثر ضد باکتریال یدین ۰/۲٪ پتاسیم یدید ۰/۴٪ و یدین ۲٪ و پتاسیم یداید ۴٪ نتایج زیر حاصل گردید

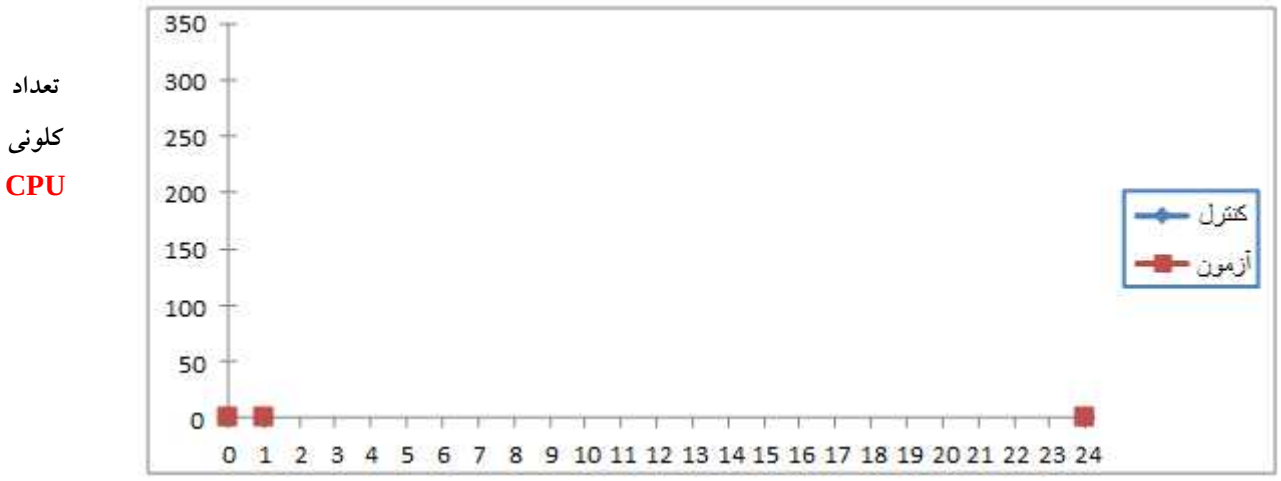
میانگین نتایج شمارش کلونی‌های انتروکوک فکالیس گروه آزمون پس از تماس با یدین ۲٪ و پتاسیم یداید ۴٪ در زمان-های صفر، یک و ۲۴ ساعت و تمام رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ صفر بود.

میانگین نتایج شمارش کلونی‌های انتروکوک فکالیس گروه آزمون پس از تماس با یدین ۰/۲ ٪ و ۲٪ و پتاسیم یداید ۴٪ و ۰/۴ ٪ در زمان صفر و رقت ۱/۱۰: 105 CPU و در زمان صفر و رقت ۱/۱۰۰: 12CPU و در زمان یک ساعت و رقت ۱/۱۰: 11CPU بود. در سایر زمان‌ها و رقت‌ها نتایج شمارش کلونی صفر بود. در گروه کنترل تمام نتایج شمارش کلونی-های انترکوک فکالیس در تمام زمان‌ها و رقت‌ها صفر بود.

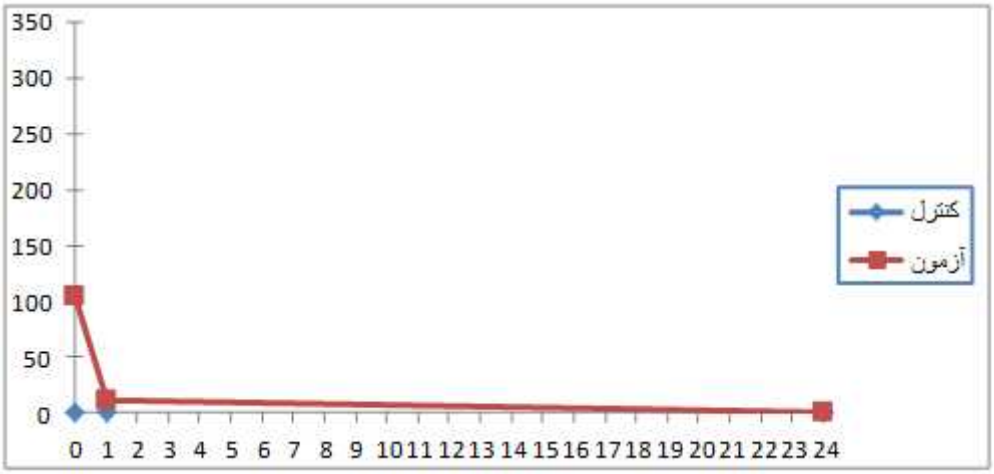
نتایج آزمون مان ویتنی برای مقایسهٔ میانگین تعداد کلونی در دو گروه کنترل و آزمون در زمان‌های صفر، و یک ساعت برای غلظت‌های ۰/۲٪ و ۰/۴٪ تفاوت معناداری را میان شمارش کلونی‌ها نشان داد.

جدول ۱: انحراف استاندارد ± میانگین تعداد کولونی

	هیپو کلریت سدیم	
	٪۵	٪۱
گروه کنترل	-	–
گروه آزمون	-	–



نمودار میزان رشد باکتری انترو کوکوس فکالیس بعد از تماس با یدین ۲٪ و پتاسیم یداید ۴٪ در زمانهای صفر، یک و ۲۴ ساعت



نمودار میزان رشد باکتری انترو کوکوس فکالیس بعد از تماس یدین ۰/۲٪ پتاسیم یدید ۰/۴٪ در زمانهای صفر، یک و ۲۴ ساعت

جدول ۲: زمان صفر

	یدین پتاسیم یدید	
	۲٪ و ۴٪	۰/۲٪و ۰/۴٪
U مان ویتنی	—	9.000
P – مقدار	—	.001★★

داشتن★★ نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنادار در سطح یک درصد می‌باشد. زمانی که غلظت ۲٪ و ۴٪ بوده تعداد کلونی در تمام تکرارهای دو گروه صفر مشاهده شده است.

جدول ۳: زمان یک ساعت

	یدین پتاسیم یدید	
	۲٪ و۴٪	۰/۲٪و۰/۴٪
U من- ویتنی	—	13.500
P – مقدار	—	.005★★

داشتن ★★ نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنادار در سطح یک درصد می‌باشد. زمانی که غلظت ۲٪ و۴٪ بوده تعداد کلونی در تمام تکرارهای دو گروه صفر مشاهده شده است.

جدول ۴: اثر ضد باکتریال کلرو هگزیدین ۰/۲٪ و ۰/۰۲٪

	گروه آزمون					
	کلرو هگزیدین					
	٪ ۰/۲			٪۰/۰۲		
رقت	$۱۰^{-۱}$	$۱۰^{-۲}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۱}$	$۱۰^{-۲}$	$۱۰^{-۳}$
ساعت ۰	۰	۰	۰	۱۷۸	۷۳	۷
ساعت ۱	۰	۰	۰	۱۱۳	۴۹	۹
ساعت ۲۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰

میانگین نتایج شمارش کلونی‌های انتروکوکوس فکالیس بعد از تماس با کلرو هگزیدین ۰/۲٪ در گروه آزمون

جدول ۵: میانگین نتایج شمارش کلونی¬های انترو کوکوس فکالیس بعد از تماس با کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ در گروه کنترل

گروه کنترل						
کلرو هگزیدین						
٪۰/۲			٪۰/۰۲			
رقت	۱۰ -۱	۱۰-۲	۱۰-۳	۱۰ -۱	۱۰-۲	۱۰-۳
ساعت ۰	۰	۰	۰	۳۴۰	۱۳۶	۲۹
ساعت ۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
ساعت ۲۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۶: نتایج آزمون آماری مان ویتنی برای کلرو هگزیدین ۰/۲٪ و ۰/۰۲٪ انحراف استاندارد ± میانگین تعداد کولونی

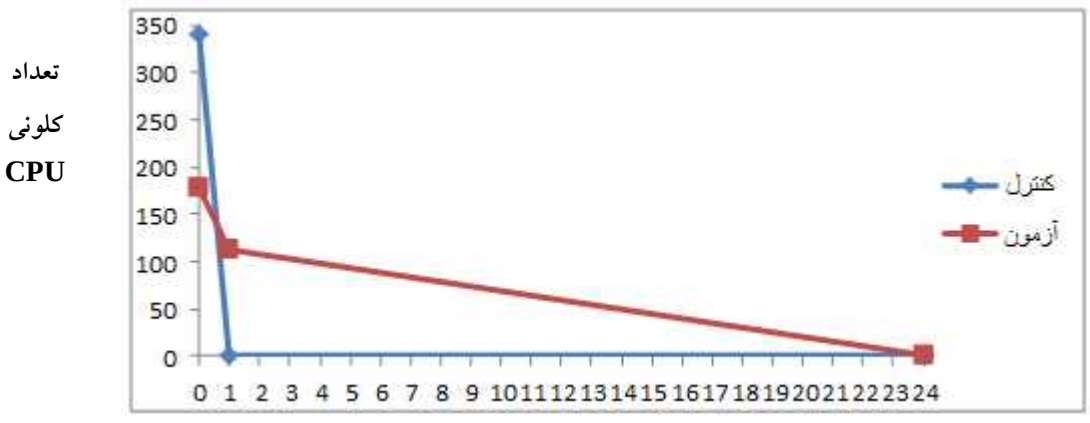
کلرو هگزیدین		
	٪۰/۲	٪۰/۰۲
گروه کنترل	.000±.000	55.666±21.752
گروه آزمون	.666±.402	43.250±10.401

بر طبق نتایج آزمون مان ویتنی تفاوت معنادار میان تعداد کلونی در زمان یک ساعت میان گروه کنترل و آزمون مشاهده شد در سایر زمانها تفاوتی مشاهده نشد.

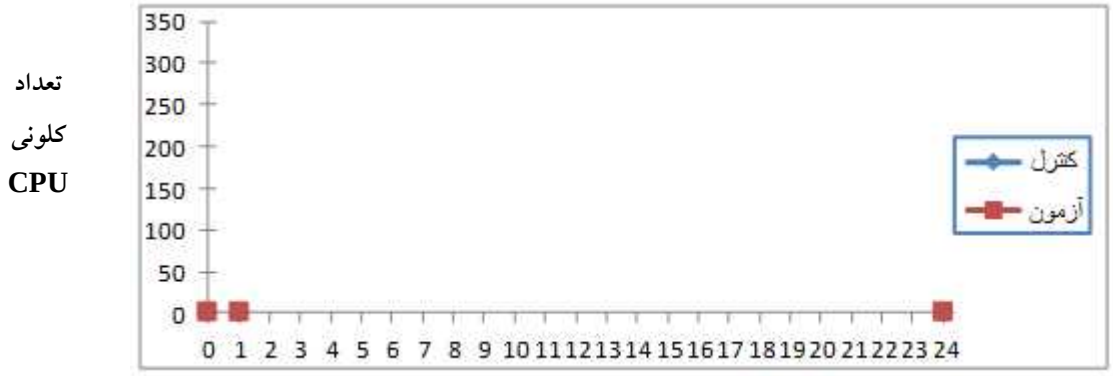
جدول ۷: زمان یک ساعت

کلرو هگزیدین		
	٪۰/۲	٪۰/۰۰۲
U مان ویتنی	-	.000
P –مقدار	-	.000★★

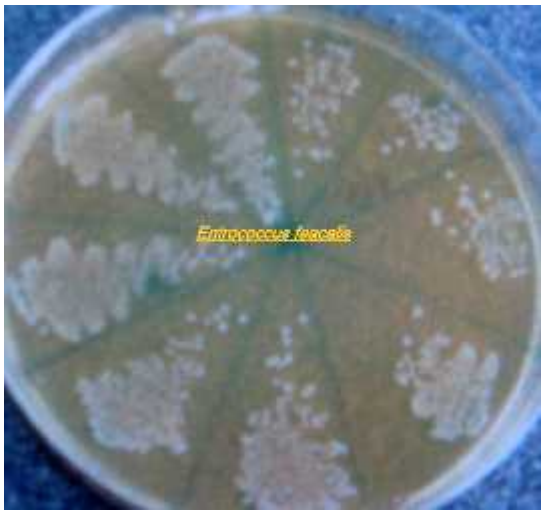
داشتن ★★ نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنادار در سطح یک درصد می‌باشد.



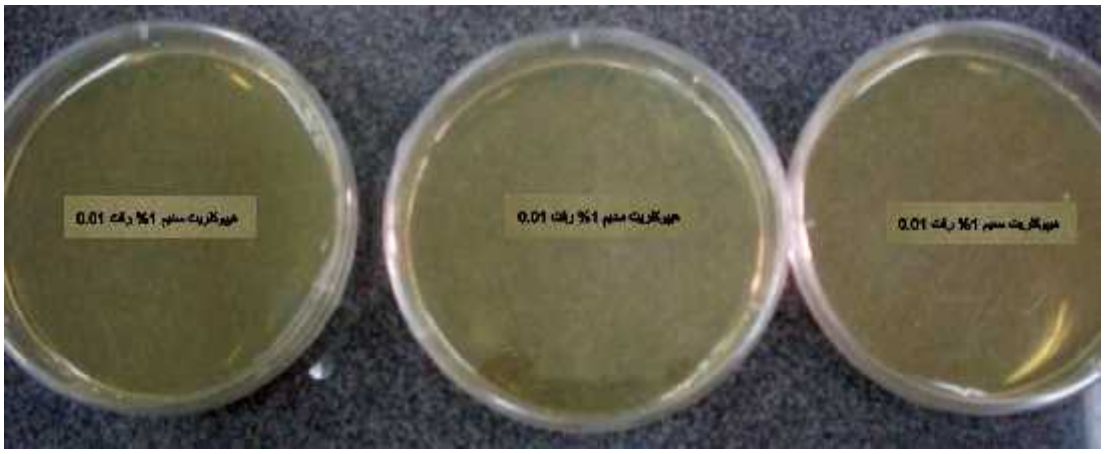
نمودار ۱: نمودار میزان رشد باکتری انترو کوکوس فکالیس بعد از تماس کلرو هگزیدین ۰/۲٪ در زمان‌های صفر، یک و ۲۴ ساعت



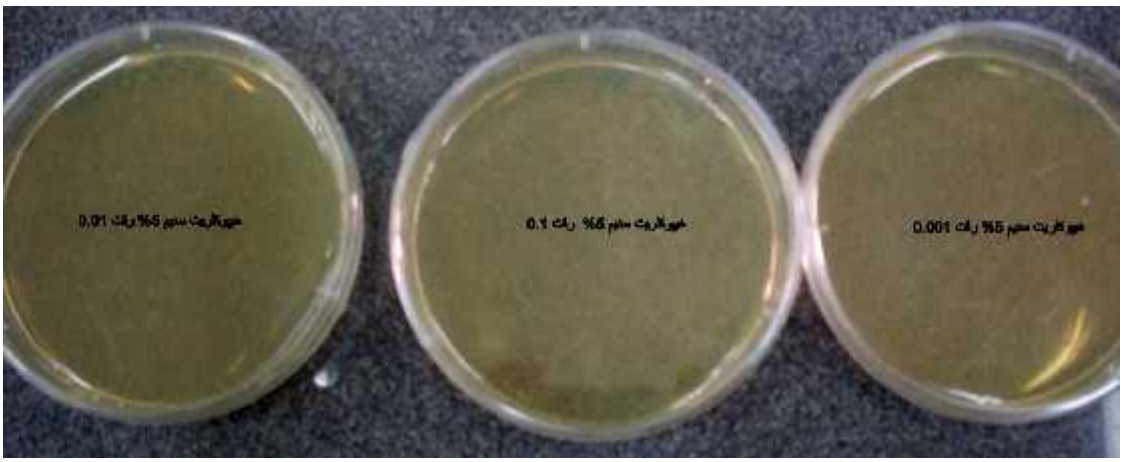
نمودار ۲: نمودار میزان رشد باکتری انترو کوکوس فکالیس بعد از تماس کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ در زمان‌های صفر، یک و ۲۴ ساعت



شکل ۱: رشد کلونی باکتری انترو کوکوس فکالیس روی محیط کشت

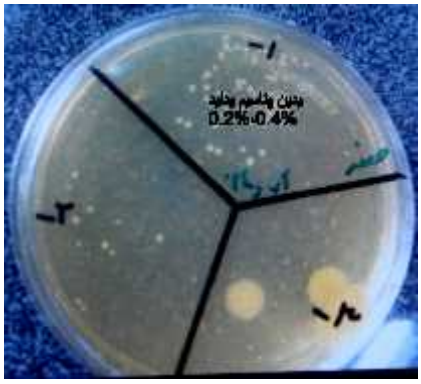


شکل ۲: نشان‌دهندهٔ عدم تأثیر پودر عاجی روی هیپو کلریت سدیم ۵٪ است، هیچ کلونی رشد نکرده است



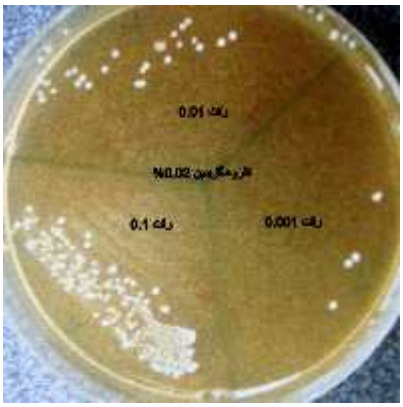
شکل ۳: نشان‌دهندهٔ عدم تأثیر پودر عاجی روی هیپو کلریت سدیم ۱٪ است، هیچ کلونی رشد نکرده است

شکل ۴: نشان‌دهندهٔ عدم تأثیر پودر عاجی روی یدین۲٪ پتاسیم یداید ۴٪ است، هیچ کلونی رشد نکرده است



شکل ۵: نشان‌دهندهٔ تأثیر پودر عاجی روی یدین ۰/۲٪ پتاسیم یدید ۰/۴٪ است. باکتری در زمان صفر و یک ساعت روی محیط کشت رشد کرده است.

شکل ۶: نشان‌دهندهٔ عدم تأثیر پودر عاجی روی کلرو هگزیدین ۰/۲٪ است، هیچ کلونی رشد نکرده است.



شکل ۷: نشان‌دهندهٔ تأثیر پودر عاجی بر روی کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ است، باکتری در زمان‌های صفر و یک ساعت روی محیط کشت رشد کرده است.

بحث

استفاده از مواد شست‌وشو دهندهٔ کانال، یکی از ارکان مهم در درمان اندودنتیک به شمار می‌آید که با هدف خروج دبری‌ها و حذف باکتری‌ها از کانال ریشه انجام می‌شود. در استفاده از هیپو کلریت سدیم این هدف با هدف دیگری توأم می‌گردد که آن، حل کردن بقایای پالپی و دبری‌های ارگانیک موجود در کانال ریشه است. کلرو هگزیدین، نوع دیگری از شست‌وشو دهنده‌های کانال است که کاربرد بسیار زیادی در درمان اندودنتیکی دارد و طبق مطالعه‌های تانگ (Tung) فعالیت آنتی‌میکروبی آن با هیپوکلریت سدیم برابر است و آن-چنان که وایت (White) در مطالعات خود نشان داد، دارای خاصیت دوام اثر می‌باشد(۱۰). مطالعات invitro بر روی خواص ضد باکتری محلولهای ضدعفونی هیپو کلریت سدیم، کلرو هگزیدین و یدین پتاسیم یداید نشان دادند که هر سه ماده در محیط کشت قادرند تا باکتری را حذف نمایند، ولی داخل کانال خواص ضد باکتریال این دو محلول تغییر می‌کند و اثر ضد باکتریال کمتری پیدا می‌کنند (۹) یک توضیح در این مورد غیر فعال شدن تمام یا بخشی از خاصیت ضد باکتریال محلول‌های شست‌وشو دهنده توسط اجزای عاج دندانی می-باشد (۴، ۵ و۷). مطالعات زیادی در این زمینه انجام شده که این آزمایش‌ها از نظر روش‌های اجرایی، زنجیرهٔ باکتری مورد مطالعه، زمان اینکوبیشن، شرایط و محیط کشت متفاوت هستند. مطالعهٔ حاضر نیز از جملهٔ همین مطالعات بوده که در آن، با هدف بررسی پدیدهٔ غیر فعال شدن داروهای ضد عفونی‌کنندهٔ کانال ریشهٔ دندان توسط عاج دندانی صورت گرفت.

مطالعهٔ انجام شده بر روی سه محلول شست‌وشو دهندهٔ کانال ریشه و هر کدام در دو غلظت انجام گرفت. باکتری مورد مطالعه، انتروکوکوس فکالیس بود. انتروکوکوس فکالیس

یک کوکوسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که به نوعی با حفره‌های دهانی و مجرای گوارشی هم‌زیست شده است (۱۱). این باکتری در دندان‌پزشکی نقش بسیار مهمی را در ایجاد عفونت‌های مزمن و یا ثانویه کانال ریشهٔ دندان ایفا می‌کند. انتروکوکوس فکالیس یک میکرو ارگانیسم مقاوم می‌باشد که توانایی زنده ماندن در کانال ریشهٔ دندان را داشته و به عنوان تنها میکرو ارگانیسم و یا یکی از اجزای اصلی فلور در آن منطقه محسوب می‌شود(۴). حذف باکتری انتروکوکوس در درمان ریشه و درمان‌های مجدد از مهمترین اهداف درمان محسوب می‌شود.

خاصیت ضد باکتریال محلول‌های ضد عفونی‌کننده کانال در مطالعات in vivo می‌تواند توسط عوامل مختلف کاهش پیدا کند، این عوامل شامل: عدم دسترسی محلول به کل کانال، زمان تماس کوتاه مدت، نفوذ کم در داخل عاج، وجود لایهٔ بیو فیلم و غیرفعال شدن خاصیت ضد عفونی کنندگی به وسیلهٔ مواد و ترکیب شیمیایی موجود در کانال ریشهٔ دندان می‌باشد.

مدلهای مطالعات in vitro شامل بلوکهای عاجی، پودر عاجی و دندان کشیده شده می‌باشد. علت انتخاب پودر عاجی به عنوان مدل آزمایشگاهی توانایی استانداردسازی ذرات در اندازه‌های مساوی، امکان استفاده از مقدار مساوی در هر بار آزمایش، و عدم نیاز به زمان طولانی برای عفونی شدن عاج، چون عاج به صورت پودر می‌باشد و افزایش سطح تماس محلول ضد عفونی‌کننده با عاج است. از معایب پودر عاجی عدم تشکیل لایه بیو فیلم و عدم وجود ساختار میکرو آناتومیکال ریشه است.

هیپو کلریت سدیم شایع‌ترین محلول شست‌وشو دهندهٔ کانال است که هنوز هیچ توافق کلی بر روی غلظت مطلوب آن وجود ندارد(۱۲). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که استفاده از غلظت‌های بالاتر هیپو کلریت سدیم قابل پیش‌بینی‌ترین روش برای کشتن باکتری‌های داخل کانال و برداشتن بیو فیلم داخل کانال است(۱۴و۱۳). در این مطالعه، مشابه مطالعات قبلی هیپو کلریت تغلیظ شده از شست‌وشو دهنده‌های دیگر بر اساس زمان صرف شده برای حذف تمام باکتری‌ها بهتر بود (۱۵–۱۷) و به هر حال استفاده از هیپو کلریت سدیم مورد بحث است، چون وقتی به فضای پری‌رادیکولار وارد می‌شود، می‌تواند سبب تحریک شدید شود (۱۸).

در مطالعهٔ حاضر آن‌چنان که گفته شد، غلظت ۵٪ و۱٪ هیپو کلریت سدیم به‌کار برده شد. در این مطالعه، پودر عاجی تأثیری بر خاصیت ضد باکتری هیپو کلریت سدیم ۵٪ و ۱٪ نداشت و این مواد در حضور پودر عاجی خاصیت خود را حفظ کرده و در زمان‌های صفر، یک و ۲۴ ساعت هیچ‌گونه کلونی رشد نکرده. در گروه کنترل (وجود آب مقطر به جای پودر عاجی) هر دو ماده توانایی حذف باکتری در زمانهای صفر،یک و ۲۴ ساعت را دارا بودند. هاپاسالو (Haapasalo) و همکاران در مطالعه‌ای به صورت invitro تأثیر پودر عاجی بر روی هیپوکلریت سدیم ۱٪ را بررسی کردند (۳) در پایان آزمایش خاصیت آنتی‌باکتریال هیپو کلریت سدیم ۱٪ در زمان صفر کاهش پیدا کرد، ولی در زمان یک و ۲۴ ساعت ساعت توانست به‌طور کامل از رشد باکتری جلوگیری کند. حسن رزمی و همکاران در مطالعه‌ای به صورت invitro میزان غیر فعال شدن هیپو کلریت سدیم ۵٪ و ۱٪ را بررسی کردند، در پایان آزمایش هیپو کلریت سدیم ۵٪ بعد از تماس با پودر عاجی در زمان صفر، یک و ۲۴ ساعت به‌طور کامل مانع از رشد باکتری شد و هیپو کلریت سدیم ۱٪ در زمان صفر نتوانست باکتری را به‌طور کامل مهار کند، ولی در زمان یک و ۲۴ ساعت مانع رشد باکتری شد.

در مقایسه با مطالعهٔ هاپاسالو و رزمی، در این مطالعه هیپوکلریت سدیم ۱٪ در زمان صفر نیز توانایی حذف باکتری را دارا بود. عدم حذف سمان، مواد آلی پالپ و یک بار اتو کلاو کردن نمونه‌ها در مطالعات گذشته، می‌تواند دلیل این اختلاف باشد.

هاپاسالو و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه‌ای به صورت invitro تأثیر پودر عاجی بر کلرو هگزیدین ۰/۰۵٪ را بررسی کردند(۳) در پایان آزمایش خاصیت آنتی‌باکتریال کلرو هگزیدین در زمان صفر و یک ساعت کاهش پیدا کرد ولی در ۲۴ به‌طور کامل مانع رشد باکتری شد. پورتنیر (Portenier) و همکاران(۲۰۰۱) در مطالعه‌ای میزان غیر فعال‌شدن کلرو هگزیدین.۰۵٪ توسط پودر عاجی، Hydroxy apatite و Bovin serum albuminرا بررسی کردند در پایان خاصیت آنتی‌باکتریال کلرو هگزیدین به‌طور قوی

توسط Bovin serum albuminمهار شد و مقدار کمتری توسط پودر عاجی مهار شد، این مهار شدگی در زمان‌های صفر و یک ساعت بود، Hydroxy apatite تأثیری بر خاصیت کلرو هگزیدین نداشت.

در این مطالعه، شمارش کلونی‌های باکتریایی پس از تماس با کلرو هگزیدین ۰/۲٪ در تمام رقت‌ها پس از زمان-های صفر و یک و ۲۴ ساعت صفر بود. و در کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ بعد از ۲۴ ساعت شمارش باکتری‌ها صفر بود. در مطالعهٔ گومز(Gomes)و همکارانش(۱۵) و ویانا (Vianna) و همکارانش (۱۶) نشان دادند که کلرو هگزیدین حتی در غلظت کم ۰/۲٪ E.Foecalis را ظرف مدت ۳۰ ثانیه حذف می‌کند. اما مورگنتال (Morgental) و همکارانش نشان دادند که کلرو هگزیدین ۲٪ در کاهش شمار E.Foecallis در یک دقیقه مؤثر نبود (۱۹). این تفاوت در نتایج ممکن است به خاطر تفاوت در روش کار و مارک کلرو هگزیدین استفاده شده و زمان‌های بررسی کشت باکتریایی باشد.

پورتنیر و همکاران در سال ۲۰۰۲ در مطالعه‌ای غیر فعال شدن خاصیت آنتی باکتریال کلرو هگزیدین۰/۰۲٪ توسط پودر عاج، ماتریکس عاجی، عاجی که با EDTA و سیتریک اسید در تماس بوده، کلاژن نوع 1 و heat killed Microbias whole cell بررسی کردند. ماتریکس عاجی و سلولهای کشته شده با گرما بیشترین تأثیر مهاری را روی کلرو هگزیدین داشتند، درحالی که عاجی که با EDTA و سیتریک اسید مخلوط شده بود، فقط مقداری مهار شدگی را نشان داد (۵). پودر عاجی نیز در زمان صفر و یک ساعت بعد از تماس با کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ باعث مهار شدن آن شد، ولی بعد از ۲۴ ساعت تأثیری روی خاصیت آنتی‌باکتریال کلرو هگزیدین نداشت. رزمی و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه-ای، میزان غیر فعال شدن داروهای ضد عفونی‌کنندهٔ کانال ریشه را توسط عاج معدنی، عاج دمینرالیزه، ماتریکس عاجی و جزء معدنی عاج بررسی کردند. نتیجه این‌گونه بود که کلرو هگزیدین ۲٪ و ۰/۲٪ پس از تماس با هر ۴ گروه مهار کننده به طور کامل باکتری فکالیس را در زمانهای صفر، یک و ۲۴ ساعت از بین بردند. در این مطالعه پودر عاجی تأثیری بر خاصیت ضد باکتریال کلرو هگزیدین ۰/۲٪ نداشت و این ماده در حضور پودر عاجی خاصیت خود را حفظ کرده و در زمانهای صفر، یک و ۲۴ ساعت هیچ‌گونه کلونی رشد نکرد، در این قسمت نتایج با مطالعهٔ رزمی هم‌خوانی دارد. پودر عاجی باعث کاهش خاصیت ضد باکتریال کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ در زمان صفر و یک ساعت شده و در این قسمت نتایج با مطالعات هاپاسالو و پورتنیر هم‌خوانی دارد و در سطح یک در صد تفاوت معنادار وجود دارد ($p<۰/۰۱$). ولیکن در زمان ۲۴ ساعت قادر به حذف باکتری می‌باشد. در گروه کنترل (وجود آب مقطر به جای پودر عاجی) کلرو هگزیدین ۰/۲٪ توانایی حذف باکتری در زمان‌های صفر، یک و ۲۴ ساعت را دارا می‌باشد. کلرو هگزیدین ۰/۰۲٪ توانایی حذف باکتری را در زمان صفر نداشته، اما در زمان یک و ۲۴ ساعت هیچ‌گونه کلونی رشد نکرده. در این قسمت نتایج این مطالعه با مطالعهٔ پورتنیر و رزمی یکسان است.

در این مطالعه پودر عاجی تأثیری بر خاصیت ضد باکتری یدین پتاسیم یداد ۴٪ ندارد و این ماده در حضور پودر عاجی خاصیت خود را حفظ کرده و در زمان‌های صفر، یک و ۲۴ ساعت هیچ‌گونه کلونی رشد نکرده. ولی پودر عاجی باعث کاهش خاصیت ضد باکتریال یدین ۰/۲٪ پتاسیم یداید ۰/۴٪ در زمان صفر و یک ساعت شده و در سطح یک در صد تفاوت معنادار وجود دارد ($p<۰/۰۱$) ولی این ماده در زمان ۲۴ ساعت قادر به حذف باکتری می‌باشد.

هاپاسالو در مطالعهٔ خود (۳) میزان غیر فعال شدن یدین ۰/۲٪ پتاسیم یدید ۰/۴٪ و یدین ۲٪ و پتاسیم یداید ۴٪ در برخورد با پودر عاجی را بررسی کرد. در آن مطالعه یدین ۲٪ و پتاسیم یداید ۴٪ به طور کامل مانع رشد باکتری در زمان صفر، یک، و ۲۴ شد، ولی یدین ۰/۲٪ پتاسیم یدید ۰/۴٪ نتوانست باکتری را مهار کند و در ۳ زمان‌های صفر، یک و۲۴ ساعت به طور کامل غیر فعال شد. پورتنیر نیز در مطالعهٔ خود میزان غیر فعال شدن یدین پتاسیم یدید ۰/۲٪ و ۰/۴٪ در برخورد با پودر عاجی، Hydroxy apatite و Bovin serum albumin بررسی کرد، در آن مطالعه ولی یدین ۰/۲٪ پتاسیم یدید ۰/۴٪ بعد از تماس با پودر عاجی در زمانهای صفر، یک و ۲۴ ساعت به طور کامل غیر فعال شد ولی Hydroxy apatite و Bovin serum تأثیری بر

خاصیت یدین پتاسیم یدید نداشته‌اند. در مطالعات گذشته یدین ۰/۲٪ پتاسیم یدید ۰/۴٪ در زمان صفر، یک و ۲۴ ساعت غیر فعال شده بود. (به طور کامل غیر فعال شده بود) عدم حذف سمان، مواد آلی پالپ و یک بار اتو کلاو کردن نمونه‌ها در مطالعات گذشته، می‌تواند دلیل این اختلاف باشد. در گروه کنترل (وجود آب مقطر به جای پودر عاجی) یدین پتاسیم یدید در هر دو غلظت توانایی حذف باکتری در زمان-های صفر، یک و ۲۴ ساعت را دارا می‌باشند.

نتیجه‌گیری

این آزمایش نشان داد که عاج توانایی مهار کردن خاصیت ضد باکتریال مواد ضد عفونی‌کنندهٔ کانال ریشه را دارا می‌باشد که این مقدار مهار شدگی با غلظت آنها و زمان تماس آن‌ها با عاج در ارتباط است. با توجه به اینکه کاهش غلظت هیپو کلریت سدیم از ۵٪ به ۱٪ اثری بر فعالیت آنتی-باکتریال این ماده در مجاورت با پودر عاجی در شرایط invitro در زمان‌های مختلف آزمایش ندارد و هر دو ماده در تمام زمانها باکتری را از بین می‌برند، لذا استفاده از هیپو کلریت سدیم ۱٪ به دلیل سمیت کمتر توصیه می‌شود، در مورد استفاده از کلرو هگزیدین و یدین پتاسیم یدید، به دلیل مهار شدن در غلظت‌های پایین توصیه می‌شود که از غلظت-های بالاتر این مواد استفاده شود.

قدردانی

بخشی از این مقاله، حاصل طرح تحقیقاتی دانشجویی مصوب دانشکدهٔ دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز می‌باشد. بدین وسیله از اعضای محترم شورای پژوهشی این دانشکده تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1-kakeshashi H. The effect of surgical exposures of dental pulp in germ free and conventional laboratory rats. Oral surgery 1965 Sep; 20: 340-9.
2-Moller K. influence of periapical of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Scand J Dent 1981 Dec; 89(6):475-84.
3-Haapasalo HK, Siren *E*K, Waltimo TMT, Orstavik D. Inactivation of local root canal medicaments by dentin: an in vitro study. Int Endod J 2000; 33(2):126-31.
4-Portiner I, Haapasalo H, Orstavik D, Mitsuo Y, Haapaalo M. inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidin digluconate against enterococcus faecalis by dentin matrix, collagen type 1 and heat killed microbial whole cells. J Endod 2002; 28(9): 634-7.
5-Kennedy J HD. Enterococcus faecalis the root canal survivor and star in post- treatment disease. Auest dent J 2003; 6(1):135-9.
6-Razmi H, Aligholi M, Sadeghi SD. Evaluation of inactivation of intracanal antiseptics by dentin, demineralized dentin, dentin matrix and mineral component of dentin. TUMS Electronic J 2007; 19(4): 17-23.
7-Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent J 2008; 58: 329-339.
8-Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. Clinic Mic Rev 1994; 7(4): 462-78.
9-Raphael D, Wong TA, Moodnick R, Borden BG. The effect of temperature on the bactericidal efficiency of sodium hypochlorite. J Endod 1981; 7(7): 330-4.
10-Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Laufs R, Claussen M, Wirth R. Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(1): 39-42.
11-Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006 May; 32(5): 389–98.
12-Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, et al. Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms. J Endod 2006; 32(6): 527–31.
13-Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, "et al". The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. J Endod 2006; 32(5): 434–7.
14-Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. Int Endod J 2001; 34(6): 424–8.
15-Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 97(1): 79–84.
16-Stojicic SS, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. Int Endod J 2012; 45(4): 363–71.

17-Kleier DJ, Averbach RE, Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: experience of diplomates of the American Board of Endodontics. J Endod 2008; 34(11): 1346–50.
18-Morgental RD, Singh A, Sapppal H. Dentin Inhibits the Antibacterial Effect of New and Conventional Endodontic Irrigants. J Endod 2013; 39(3): 406-

Evaluation of Inactivation of Intracanal Antiseptics by Dentin; in Vitro Study

Mohammad Yazdizadeh[1], Somayeh Ghamari[2*], Milad Ali Kazemi[3], Sahar Jalali[2]

1-Assistant Professor of Endodontic.
2-Post Graduate Student of Endodontic.
3-Under Graduate Student.

1,2-Department of Endodontic, School of Dentistry, Ahwaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran.
3-School of Dentistry, Ahwaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran.

**Corresponding author:*
Somayeh Ghamari; Department of Endodontic, School of Dentistry, Ahwaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran.
Tel:+9183434796
Email:
somaye_ghamari@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: The present study attempts to investigate the tooth dentin influence on antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, chlorhexidine, iodin and potassium iodide.

Subjects and Methods: *Enterococcus foecalis* (1394 code) was cultured in TSA environment where the purred colony suspension in concentration of 0.5% peptone water was supplied. In this direction, 15 intact impacted third molars teeth that has been extracted by surgical, chips into dentinal powder through mesh 200 in order to produce suspension of 28 mg dental powder in 50 μL distilled water, then incubated by irrigate liquid for 1 hr under 37°C. Adding 50 μL of bacteria suspension results in final suspension applied is culture at 0, 1 and 24 hr. Control group was subjected to 50 μL of distilled water instead of dental powder.

During 24 hours, colonies were counted under the microscope and analyzed by Mann-Whiteny test using SPSS software.

Results: Results shows that CHClN 0. 2%, NaOCl 1%, 5%, I 2% and KI 4% eliminate bacteria after 0, 1 and 24 hours while CHX 0.02%, I 0.2%, KI 0.4% were only able to remove bacteria after 24 hr. Reduction of NaOCl concentration from 5% to 1% did not affect its antibacterial efficacy against dentin powder under *in vitro* during 24 hr period of the experimental conditions.

Conclusion: Through this experimental study it is demonstrated that the dentin have the ability to inhibit antibacterial effect of root canal disinfectant material. The amount of inhibition depends on concentration and the time that material are in contact with dentin.

Keywords: Root canal, Dentin, Intra-canal antiseptics.

►*Please cite this paper as:*
Yazdizadeh M, Ghamari S, Kazemi M, Jalali S. Evaluation of Inactivation of Intracanal Antiseptics by Dentin; in Vitro Study. Jundishapur Sci Med J 2015;13(6):635-649

Received: Jan 15, 2014 **Revised: Aug 10, 2014** **Accepted: Aug 23, 2014**