

Comparison of the Effect of Grape Seed Extract with and without Fluoride Varnish and their Synergistic Effects on Oral *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus mutans*-an in-vitro Study

Azam Nahvi¹,
Ali Jafari²,
Hamid Reza Goli³,
Ali Davoodi⁴,
Seyed Jaber Mousavi⁵,
Mahnaz Nemati²,
Banafsheh Soleimani⁶

¹ Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Dentist, Sari, Iran

³ Associate Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Pediatric Dentist, Sari, Iran

(Received October 17, 2023; Accepted November 5, 2023)

Abstract

Background and purpose: Fluoride varnish application is a successful approach in preventative dentistry. Considering the antimicrobial capabilities of Grape Seed Extract (GSE) and its impact on tooth remineralization, the current study was conducted to compare the effect of this extract, with and without fluoride varnish, as well as their synergistic effects on the caries-causing bacteria *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*.

Materials and methods: In the current laboratory-analytical study, the disk agar diffusion (growth inhibition halo) and microbroth dilution tests were used to investigate the antibacterial properties and minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds. Ampicillin and Erythromycin discs were utilized for positive control, and sterile physiological serum was used for negative control. The collected data was analyzed using SPSS software (version 16) and analysis of variance (ANOVA), Kruskal-Wallis, U-Man-Whitney, and independent t-tests.

Results: The largest diameter of the growth inhibition halos in *S. mutans* and *L. acidophilus* were found in 2.5 mg/ml varnish (12.0±0.7 mm) and 5 mg/ml GSE (13.6±1.1 mm), respectively. Moreover, the smallest halo diameter was recorded in 2.5 mg/ml GSE (7.0±0.9 mm) and the combination of the two extracts at 2.5 mg/ml concentration (5.6±0.9 mm), respectively. Varnish had the lowest MIC in both bacterial species tested (1.8±0.7 mg/ml), and there was no evidence of a synergistic interaction between the two compounds; however, GSE performed comparatively similar to varnish at a dosage of 5 mg/ml.

Conclusion: Based on the findings of the present study, GSE can be considered an acceptable alternative to fluoride varnish in the early phases of dental caries treatment and prevention.

Keywords: fluoride varnish, grape seed extract, GSE, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans*

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 1):48-58 (Persian).

Corresponding Author: Banafsheh Soleimani- Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
(E-mail: banafsheh.soleimani@yahoo.com)

مقایسه‌ی تأثیر عصاره‌ی هسته‌ی انگور با و بدون واریش فلوراید و اثر سینرژیسیم آن‌ها بر استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دهانی؛ یک پژوهش آزمایشگاهی

اعظم نحوی¹
علی جعفری²
حمیدرضا گلی³
علی داوودی⁴
سید جابر موسوی⁵
مهناز نعمتی²
بنفشه سلیمانی⁶

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از واریش فلوراید رویکردی مؤثر در دندان‌پزشکی پیشگیرانه است. با توجه به خواص آنتی‌میکروبیال عصاره‌ی هسته‌ی انگور (GSE: Grape Seed Extract) و اثرگذاری آن بر مینرالیزاسیون دندانی، مطالعه‌ی حاضر با هدف مقایسه‌ی تأثیر این عصاره با و بدون واریش فلوراید و نیز اثر سینرژیسیم آن‌ها بر باکتری‌های پوسیدگی زای استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی و تحلیلی حاضر، از تست‌های دیسک آگار دیفیوژن (قطر هاله‌ی مهار رشد) و میکروبراث دایلوژن برای بررسی خواص آنتی‌باکتریال و حداقل غلظت مهار (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) ترکیبات استفاده شد. برای کنترل مثبت، از دیسک آمپی‌سیلین و اریترومایسین و برای کنترل منفی، از سرم فیزیولوژیک استریل استفاده شد. تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ورژن 16 و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و نیز آزمون‌های کروسکال‌والیس، یو-من‌ویتنی و تی مستقل صورت گرفت. $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بیشترین قطر هاله‌ی مهار رشد در استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب، در واریش 2/5 (12/0±0/7mm) و 5 mg/ml GSE (13/1±6/1mm) و نیز کمترین قطر هاله به ترتیب، در 2/5 GSE (7/0±0/9mm) و ترکیب دو عصاره در غلظت 2/5 mg/ml (5/0±6/9mm) به ثبت رسید. واریش کمترین MIC را در هر دو گونه‌ی باکتریایی به ثبت رساند (1/0±8/7mg/ml) و هیچ گونه اثری از سینرژیسیم میان دو ماده دیده نشد؛ با این حال، GSE در غلظت 5 mg/ml عملکردی نسبتاً مشابه با واریش نشان داد.

استنتاج: GSE می‌تواند جایگزینی مناسب برای واریش فلوراید به منظور پیشگیری و کنترل پوسیدگی‌های دندانی در مراحل اولیه در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، عصاره‌ی هسته‌ی انگور، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، واریش فلوراید، GSE

E-mail: banafsheh.soleimani@yahoo.com

مؤلف مسئول: بنفشه سلیمانی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی

1. دانشیار، گروه کودکان، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دندان‌پزشک، ساری، ایران

3. دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استادیار، گروه فارماکوتوکی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

6. متخصص دندان‌پزشک اطفال، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1402/7/25 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/8/6 تاریخ تصویب: 1402/8/14

مقدمه

پوسیدگی دندان‌ی از بیماری‌های شایع مزمن کودکان و بزرگسالان در سراسر جهان است (1). متابولیسم کربوهیدرات‌ها توسط باکتری‌های کلونیزه شده بر سطوح دندان‌ی سبب تولید اسید، دیمیرالیزاسیون و ایجاد حفره‌های پوسیدگی دندان‌ی می‌شود (2). از گونه‌های مهم باکتریایی مؤثر در ایجاد پوسیدگی می‌توان به *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* اشاره کرد (3). امروزه، محققان بر این باورند که پوسیدگی‌های اولیه به‌خوبی بازگشت‌پذیر هستند و توقف دیمیرالیزاسیون مینایی با مهار تشکیل پلاک و فاکتورهای حفاظتی بزاق ممکن خواهد بود (1). فلوراید و ترکیبات حاوی آن از مواد مهم موجود در دندان‌پزشکی پیشگیرانه است. فلوراید مانع دیمیرالیزاسیون و نیز سبب تحریک رمینرالیزاسیون مینایی می‌شود. هم‌چنین، در متابولیسم باکتری‌های پوسیدگی‌زا مداخله می‌کند (4). استفاده از Minimally Invasive (MI) Varnish شویوه درمانی پیشگیرانه‌ای است که با آزادسازی ترکیبات کلسیم، فسفات و فلوراید، می‌تواند نقشی کلیدی در توقف پوسیدگی دندان‌ی ایفا کند. این محصول بیش از سایر وارنیش‌های فلوراید موجود، بر سطوح دندان‌ی باقی می‌ماند و مقادیر بالای فلوراید و کلسیم را در حفره‌ی دهان آزاد می‌کند (5). به‌طور کلی، وارنیش‌ها بیش از دیگر محصولات حاوی فلوراید، نظیر دهان‌شویه و خمیردندان‌ها، به سطوح دندان‌ی می‌چسبند و لذا، به‌عنوان منابع آزادکننده‌ی آهسته عمل می‌کنند (6). غلظت یون فلوراید پس از استفاده از وارنیش، به بیش از 12000 ppm نیز می‌رسد. این غلظت برای برخی از باکتری‌ها، نظیر *استرپتوکوکوس موتانس*، سمی است. هم‌چنین، مهار رشد این باکتری تا هفته‌ها ادامه خواهد یافت (7). در سال‌های اخیر، توجه به خواص درمانی گیاهان دارویی و مواد طبیعی حاصل از آن‌ها، به‌منظور یافتن موادی با فعالیت ضدپوسیدگی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و بالینی (in vivo)، افزایش چشمگیری یافته

است (8). از بین این فیتوکانتیتوئنت‌ها (Phytoconstituents)، چندین ماده‌ی پلی‌فنولیک، مانند تانین (کاتشین) و فلاونوئیدها، قابل اعتمادتر از سایر مولکول‌های زیستی به نظر می‌رسند (8). پتانسیل ضدپوسیدگی درخور توجهی در آلکالوئیدها مشاهده شده است (8). تانین موجود در متابولیت‌های گیاهی می‌تواند از ایجاد پلاک میکروبی دندان‌ی جلوگیری کند و باعث پیشرفت رمینرالیزاسیون مینای دندان‌ی شود (8). انگور (*Vitis vinifera L.*) از گیاهانی است که دارای ترکیبات پلی‌فنولیک، به‌خصوص تانین‌ها و فلاونوئیدها است (8). انگور منبعی سرشار از ویتامین‌ها و فیبر است و پوست و هسته‌ی آن غنی از پلی‌فنول‌ها (Polyphenols) و به‌طور ویژه Proanthocyanidins است (9). هم‌چنین، عصاره‌ی هسته‌ی انگور (Grape Seed Extract: GSE) خواص دارویی درخور توجهی دارد که استفاده از آن برای درمان بسیاری از بیماری‌ها، از جمله سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی‌عروقی، زخم معده و التهابات پوستی مؤثر است (9). به‌علاوه، GSE به‌علت پتانسیل ترمیم دندان‌ی، پیشگیری از پوسیدگی و غنی بودن از مواد آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب، همواره شایسته‌ی توجه بوده است (1، 10). اتصال GSE به سوبسترای کربوهیدرات که برای پرولیزاسیون میکروارگانیزم‌ها ضروری است، مانع از تشکیل پلاک روی سطح دندان‌ی می‌شود (1). هم‌چنین، آثار GSE علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی گزارش شده است (10).

با توجه به نقش مهم پیشگیری از پوسیدگی دندان‌ی در بهبود سلامت عمومی جامعه و نیز وجود اثرهای آنتی‌باکتریال در عصاره‌ی هسته‌ی انگور (GSE)، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرهای ضد میکروبی GSE در مقایسه با وارنیش فلوراید MI و نیز ترکیب این دو و ارزیابی اثرهای سینرژسم احتمالی علیه دو گونه‌ی باکتریایی پوسیدگی‌زای *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی تجربی و آزمایشگاهی (in vitro) حاضر با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399.005، به تصویب کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران رسید.

تهیه عصاره‌ی هسته‌ی انگور

ابتدا، نمونه‌ی هرباریومی انگور (*Vitis vinifera* L.) خریداری‌شده را هیئت علمی گروه فارماکونگوزی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأیید کرد (BE2-22-211) و هسته‌های انگور جداسازی شد. برای عصاره‌گیری از هسته‌های انگور، از روش پرکولاسیون استفاده شد و استانداردسازی بر اساس فنول تام و با روش فولین سیو کالتیو انجام شد. بدین منظور، عصاره‌ی تهیه‌شده با روتاری غلیظ شد و با فریزدرایر به صورت پودر خشک درآمد. همچنین، برای تعیین فنل تام، مقدار 1 میلی‌لیتر از محلول 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتری عصاره با 1 میلی‌لیتر محلول 3 برابر رقیق‌شده‌ی واکنشگر فولین ترکیب و به لوله‌ی آزمایش منتقل شد. سپس، برای مدت 5 دقیقه در دمای اتاق و محلی تاریک، انکوبه شد و مقدار 1 میلی‌لیتر محلول 10 درصد (W/W) سدیم کربنات به آن اضافه و برای مدت 60 دقیقه، در دمای اتاق انکوبه شد و در نهایت، در طول موج 765 نانومتر، با دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب آن خوانده شد. هم‌چنین، منحنی کالیبراسیون با استفاده از مقادیر استاندارد گالیک اسید و با انجام پروسه‌ی قبلی بر گالیک اسید، تهیه و تنظیم شد و مقدار تام ترکیبات فنلیک تعیین شد. این مراحل روی عصاره تا سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. هم‌چنین، به عنوان بلانک از محلولی استفاده شد که از ابتدا، بدون عصاره و حاوی بقیه‌ی اجزای واکنش بود (8، 11، 12).

کشت باکتریایی و تهیه‌ی غلظت‌های لازم

دو سویه‌ی استاندارد استرپتوکوکوس موتانس

(*Streptococcus mutans* PTCC 1683) و لاکتوباسیلوس

اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356)

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به صورت لیوفیلیزه، خریداری شد. به منظور احیا و رشد باکتری‌های لیوفیلیزه، 1 میلی‌لیتر محیط کشت براث (مایع) به ماده‌ی خشک (باکتری لیوفیلیزه) اضافه و مخلوط شد تا به شکل سوسپانسیون یکنواخت درآید. بدین صورت که از محیط کشت MRS براث برای کشت لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و از محیط کشت TSB (حاوی 5 درصد خون گوسفند) برای کشت استرپتوکوکوس موتانس استفاده شد. سپس، محتویات روی MRS آگار و بلاد آگار، به ترتیب برای رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس موتانس، کشت داده شدند و به مدت 48 ساعت، در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد، در جار بی‌هوازی (در دستگاه whitley jar gassing system و در شرایط خلأ) و در 10 درصد CO_2 (در انکوباتور CO_2 دار شرکت Binder، آلمان)، به ترتیب برای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس موتانس، انکوبه شدند و برای تأیید این سویه‌ها، تست‌های میکروبی‌شناسی در آزمایشگاه میکروبی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. سپس، باکتری‌ها در فریزر با دمای 20- درجه‌ی سانتیگراد تا روز آزمایش نگهداری شدند.

در روز آزمایش، باکتری‌های مذکور روی محیط‌های کشت خود، کشت داده شدند و به مدت 48 ساعت، در شرایط مذکور انکوبه شدند. پس از رشد و مشاهده کلونی باکتری‌ها، سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک‌فارلند (معادل $1/5 \times 10^8$ CFU/ml) در سرم فیزیولوژیک استریل (نرمال سالین) تهیه شد و جذب نوری آن در 625 نانومتر، اندازه‌گیری شد. جذب نوری در محدوده‌ی 0/08 تا 0/13 ثبت شد و با استاندارد نیم مک‌فارلند از لحاظ کدورت، مقایسه شد. سپس، غلظت‌های متفاوتی از وارنیش فلوراید (V-Varnish، Korea، Vericom) و عصاره‌ی هسته‌ی انگور و

بررسی حداقل غلظت مهاره‌ها
(MIC) Minimum Inhibitory Concentration

به منظور تعیین MIC عصاره‌ی هسته‌ی انگور، وارنیش فلوراید و ترکیب آن‌ها، از غلظت 5 میلی گرم بر میلی لیتر ترکیبات و از روش Microbroth Dilution و میکروپلیت 96 خانه‌ای U شکل استریل استفاده شد. ابتدا، 100 میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برات برای استریتوکوکوس موتانس و MRS برات حاوی سیستمین برای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به تمام چاهک‌ها اضافه شد. سپس، رقت‌های سریالی از GSE، وارنیش فلوراید و ترکیب این دو در چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد. میکروپلیت 96 خانه‌ای U شکل دارای 8 ردیف و 12 ستون است. ستون‌های 1 تا 10 حاوی غلظت‌های مختلف ماده‌ی مدنظر و سوسپانسیون میکروبی بود و ستون 11 به عنوان کنترل منفی تنها، حاوی محیط کشت و ترکیب مدنظر و ستون 12 نیز به عنوان کنترل مثبت تنها، حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی بود. بدین صورت که ابتدا 100 میکرولیتر از GSE با غلظت 5 میلی گرم بر میلی لیتر به چاهک اول اضافه شد و سپس، غلظت‌های مختلف تا 9 شماره رقت از چاهک دوم به چاهک آخر (2/5، 1/25، 0/625، 0/312، 0/156 و...) افزوده شد. در مرحله‌ی بعد، 100 میکرولیتر از سوسپانسیون 0/5 مک فارلند 1/100 رقیق شده‌ی باکتری مدنظر به هریک از چاهک‌ها اضافه شد که در این حالت، تعداد باکتری‌ها در هر چاهک معادل 10^5 CFU/mL بود. در نهایت، میکروپلیت‌ها به مدت 24 تا 48 ساعت، در دمای 37°C و در شرایط مساعد هر باکتری، انکوبه شدند. با بررسی چشمی کدورت ایجاد شده در چاهک‌ها، کمترین رقت از ماده‌ی مدنظر که در چاهک مربوط به آن رقت کدورتی مشاهده نمی‌شد، میزان MIC در نظر گرفته شد. مجدداً از پودر اریتروماسین و آمپی سیلین به عنوان کنترل استفاده شد (13، 14). به منظور تأیید نتایج، تمامی مراحل پنج بار تکرار شدند (13).

آنتی بیوتیک‌های حاضر در مطالعه تهیه شد. غلظت‌های 5 و 2/5 میلی گرم بر میلی لیتر از وارنیش، GSE و نیز مخلوط دو عصاره در حلالی حاوی 90 درصد آب مقطر و 10 درصد دی متیل سولفواکسید (DMSO) تهیه شد. همچنین، از ترکیب آنتی بیوتیک‌های اریتروماسین و آمپی سیلین (سیگما، آلمان) برای کنترل مثبت یافته در غلظت‌های 0/5، 1، 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 و $\mu\text{g/ml}$ استفاده شد.

آزمایش دیسک آگار دیفیوژن

ابتدا کدورت‌های استاندارد نیم مک فارلند تهیه شده از باکتری‌های مورد آزمایش با استفاده از سوآپ سرپنبه‌ای، روی محیط‌های کشت مذکور، به صورت چمنی (سفره‌ای)، کشت داده شد. سپس، دیسک‌های کاغذی بلانک (پادتن طب، ایران) به قطر 6 میلی متر در پلیت‌های حاوی محیط کشت، با فاصله‌ی 15 میلی متر از لبه‌ی پلیت و 25 میلی متر از یکدیگر قرار داده شدند و به آن‌ها 20 میکرولیتر از غلظت‌های متفاوت از GSE و وارنیش فلوراید و نیز ترکیب این دو، اضافه شد. در این آزمایش، دیسک 15 میکروگرمی اریتروماسین و دیسک 10 میکروگرمی آمپی سیلین و هم چنین، غلظت‌های متفاوت از هر دو آنتی بیوتیک، به عنوان کنترل مثبت، به مقدار 20 میکرولیتر به دیسک‌های بلانک اضافه شد و سرم فیزیولوژیک استریل نیز کنترل منفی در نظر گرفته شد. همچنین، حلال DMSO به عنوان شاهد، به یک دیسک بلانک در هر دو محیط کشت اضافه شد تا وجود اثر آنتی باکتریال را مشخص کند. سپس، محیط‌های کشت در انکوباتور 37 درجه‌ی سانتی گراد با شرایط بی‌هوازی (برای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس) و در 10 درصد CO_2 (برای استریتوکوکوس موتانس) قرار داده شدند و بعد از 48 ساعت، قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها برحسب میلی متر و با خط کش اندازه گیری و مقایسه شدند. هر آزمایش برای هر باکتری، پنج بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار هاله‌های عدم رشد محاسبه شد (13).

آنالیزهای آماری

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه 16 آنالیز شدند. برای توصیف داده‌ها از شاخص‌های مرکزی (میانگین و میانه) و پراکندگی (انحراف معیار، دامنه‌ی میان چارکی و دامنه‌ی داده‌ها) استفاده شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. تحلیل داده‌ها با آزمون‌های کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis) با پست‌هاک‌دان، تی مستقل و یو-من‌ویتنی (U Mann-Whitney) انجام شد. سطح معنی‌داری کم‌تر از 0/05 در نظر گرفته شد ($P < 0/05$).

یافته‌ها

مقایسه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد در آزمایش Disk Agar Diffusion در جدول شماره 1، بیش‌ترین، کم‌ترین و میانگین $\pm$ انحراف معیار قطر هاله‌های عدم رشد گروه‌های سه‌گانه در

غلظت‌های مورد مطالعه در دو گونه‌ی باکتریایی ذکر شده است. بیش‌ترین و کم‌ترین میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب، در واریش 2/5 mg/ml و عصاره‌ی انگور 2/5 mg/ml دیده شد. در گونه‌ی باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیش‌ترین و کم‌ترین میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد به ترتیب، در عصاره‌ی واریش 5 mg/ml و ترکیب دو ماده در غلظت 2/5 mg/ml به ثبت رسید.

در مقایسه درون‌گروهی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به تفکیک گونه‌ی باکتریایی، تنها در عصاره انگور تفاوت چشمگیری میان دو غلظت 2/5 و 5 میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد ($P = 0/004$). با این حال، در گونه‌ی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، اختلاف چشمگیری میان غلظت‌های دو گانه در تمامی گروه‌ها به دست آمد ($P < 0/05$). مقایسه‌ی قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها در غلظت‌های یکسان نیز در استرپتوکوکوس موتانس نشان

جدول شماره 1: مقایسه قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی متر) بر اساس شاخص‌های دو گانه به تفکیک نوع گونه‌ی باکتریایی

شاخص	گروه / غلظت (mg/ml)	غلظت / (mg/ml) گروه	تعداد	انحراف معیار $\pm$ میانگین	بیش‌ترین و کم‌ترین	سطح معناداری
استرپتوکوکوس موتانس	مقایسه‌ی درون‌گروهی ترکیبات	عصاره‌ی انگور	5	11/1 $\pm$ 1/4	13 10	$T = 4/00$ $P = 0/004$
		2/5	5	7/0 $\pm$ 0/9	10 8	
	واریش	5	5	10/5 $\pm$ 3/5	14 1	$Z = 0/98$ $P = 0/421$
		2/5	5	12/0 $\pm$ 0/7	13 11	
	ترکیب	5	5	9/8 $\pm$ 0/8	11 9	$Z = 0/57$ $P = 0/690$
		2/5	5	9/0 $\pm$ 4/9	10 8	
مقایسه در غلظت‌های مساوی	5	عصاره‌ی انگور	5	11/1 $\pm$ 4/1	13 10	$\chi^2 = 4/84$ $P = 0/089$
		واریش	5	10/5 $\pm$ 8/5	14 1	
		ترکیب	5	9/8 $\pm$ 0/8	11 9	
	2/5	عصاره‌ی انگور	5	7/0 $\pm$ 0/9	10 8	$\chi^2 = 10/15$ $P = 0/006$
		واریش	5	12/0 $\pm$ 0/7	13 11	
		ترکیب	5	9/0 $\pm$ 4/9	10 8	
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	مقایسه‌ی درون‌گروهی ترکیبات	عصاره‌ی انگور	5	13/1 $\pm$ 6/1	15 12	$T = 2/67$ $P = 0/029$
		2/5	5	12/0 $\pm$ 0/7	13 11	
	واریش	5	5	13/0 $\pm$ 6/5	14 13	$Z = 2/69$ $P = 0/008$
		2/5	5	11/0 $\pm$ 0/7	12 10	
	ترکیب	5	5	9/0 $\pm$ 2/8	10 8	$Z = 2/66$ $P = 0/008$
		2/5	5	5/0 $\pm$ 6/9	7 5	
مقایسه در غلظت‌های مساوی	5	عصاره‌ی انگور	5	13/1 $\pm$ 6/1	15 12	$\chi^2 = 9/84$ $P = 0/007$
		واریش	5	13/0 $\pm$ 6/5	14 13	
		ترکیب	5	9/0 $\pm$ 2/8	10 8	
	2/5	عصاره‌ی انگور	5	12/0 $\pm$ 0/7	13 11	$\chi^2 = 11/30$ $P = 0/004$
		واریش	5	11/0 $\pm$ 0/7	12 10	
		ترکیب	5	5/0 $\pm$ 6/9	7 5	

T: نتیجه آزمون تی مستقل Z: نتیجه آزمون یو-من‌ویتنی χ^2 : نتیجه آزمون کروسکال-والیس

داد که تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات گوناگون در غلظت 5 mg/ml وجود ندارد ($P=0/089$). با این حال، قطر هاله‌ی عدم رشد گروه‌های سه‌گانه برای استرپتوکوکوس موتانس در غلظت 2/5 mg/ml و برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در هر دو غلظت مورد مطالعه به صورت درخور توجهی متفاوت بود ($P<0/05$). هم‌چنین، در هیچ‌یک از غلظت‌های مطالعه‌شده در دو گونه باکتریایی، ترکیب عصاره‌ی انگور و وارنیش فلوراید سبب افزایش مؤثر قطر هاله مهار رشد نسبت به هر یک از عصاره‌ها به تنهایی نشد.

نتایج بررسی حداقل غلظت مهاره‌ی عصاره‌ها ((MIC) Minimum Inhibitory Concentration)

مقایسه میانگین حداقل غلظت مهاره‌ی عصاره‌ها در غلظت 5 mg/ml (جدول شماره 2) نشان داد که گروه‌های سه‌گانه در هر دو گونه‌ی باکتری، تفاوت چشمگیری با یکدیگر دارند ($P<0/05$). هم‌چنین، ترکیب دو ماده‌ی عصاره هسته انگور و وارنیش فلوراید سبب افزایش درخور توجه حداقل غلظت مهاره‌ی در هر دو گونه‌ی استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شد.

جدول شماره 2: مقایسه MIC بین گروه‌ها به تفکیک گونه‌ی باکتریایی (بر حسب mg/ml)

باکتری	گروه	تعداد	انحراف معیار $\pm$ میانگین	کم‌ترین بیش‌ترین	سطح معناداری (آزمون کروسکال-والیس)
استرپتوکوکوس موتانس	عصاره‌ی انگور	5	3/1 $\pm$ 5/4	2/5 5/0	$\chi^2=10/36$ $P=0/006$
	وارنیش	5	1/0 $\pm$ 8/7	2/5 1/3	
	ترکیب	5	5/0 $\pm$ 0/0	5/0 5/0	
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	عصاره‌ی انگور	5	1/0 $\pm$ 8/7	2/5 1/3	$\chi^2=10/61$ $P=0/005$
	وارنیش	5	1/0 $\pm$ 8/7	2/5 1/3	
	ترکیب	5	5/0 $\pm$ 0/0	5/0 5/0	

بحث

این مطالعه‌ی آزمایشگاهی با هدف ارزیابی خواص آنتی‌باکتریال عصاره هسته انگور (GSE) در مقایسه با وارنیش فلوراید (V-Varnish) بر دو گونه‌ی باکتریایی

پوسیدگی‌زای دندان (استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) و نیز بررسی وجود سینرژیسم احتمالی ترکیب این دو ماده با یکدیگر انجام شد.

در این مطالعه، بیشترین میانگین هاله‌های عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس در گروه وارنیش فلوراید با غلظت 2/5 mg/ml ($12/0\pm0/7$ mm) و با اختلافی اندک پس از آن، در گروه GSE با غلظت 5 mg/ml ($11/1\pm4/1$ mm) و نیز کمترین قطر هاله در گروه GSE با غلظت 2/5 mg/ml ($7/0\pm0/9$ mm) مشاهده شد. هم‌چنین، افزایش اثر آنتی‌میکروبیال GSE با افزایش غلظت ماده بر استرپتوکوکوس موتانس دیده شد که با یافته‌های Zhao و همکاران همسو است. ایشان در مطالعه‌ی خود، اثربخشی غلظت‌های متفاوت GSE علیه بیوفلم‌های استرپتوکوکوس موتانس را بررسی کردند و نشان دادند که این عصاره در غلظت 2 mg/ml و 3 سبب مهار چشمگیر تشکیل کلونی‌های این باکتری می‌شود و این اثربخشی به دوز وابسته است (10). یافته‌های مطالعه‌ی Swadas و همکاران که در آن، اثرهای آنتی‌باکتریال کلرگزیدین گلوکونات 2 درصد و غلظت‌های مختلف GSE را بر استرپتوکوکوس موتانس بررسی کردند، نشان داد که GSE برخلاف غلظت‌های پایین، در غلظت‌های 250 mg/ml و 500 mg/ml دارای اثرهای مهاره‌ی چشمگیری نسبت به گروه کنترل منفی بر تعداد کلونی‌های این گونه‌ی باکتریایی است؛ با این حال، هم‌چنان کلرگزیدین تأثیرگذارتر بوده است (8). پژوهش ایشان از نقطه‌نظر وابستگی اثر آنتی‌باکتریال GSE به دوز، با مطالعه حاضر همسو است؛ با این حال، اختلاف درخور توجهی میان یافته‌های دو مطالعه در خصوص غلظت‌های بررسی‌شده وجود دارد. تفاوت در گروه کنترل مثبت در مطالعه ایشان و مطالعه حاضر و نیز تفاوت در چگونگی بررسی اثرهای مهاره‌ی GSE را می‌توان از علل احتمالی تفاوت در نتایج دو پژوهش دانست. در مطالعه حاضر، بیش‌ترین میانگین هاله‌های عدم رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در GSE و

باین حال، Smullen و همکاران در پژوهش خود، یافته‌هایی کاملاً مغایر با مطالعه‌ی حاضر گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ی ایشان، حداقل غلظت مهاري عصاره‌ی هسته‌ی انگور قرمز (*Vitis vinifera*) در استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به ترتیب، 0/5 و 8 به دست آمد (18). هسته‌ی انگور به‌طور چشمگیری غنی از ترکیبات فنولیک، نظیر فلاوونوئیدها، پروسیانیدین‌ها و آنتوسیانین‌ها است (19). با وجود این، تمام این محتوای فنولیک توسط فرایندهای مختلف عصاره‌گیری از هسته‌های انگور استخراج‌شدنی نیست (17)؛ در نتیجه، تفاوت در روش‌های عصاره‌گیری ممکن است از علل احتمالی تفاوت در نتایج مطالعات مذکور باشد. هم‌چنین، در مطالعه‌ی حاضر، از سویه‌های استاندارد دو گونه‌ی باکتریایی (*S. mutans* PTCC 1683 و *L. acidophilus* ATCC 4356) استفاده شد. پژوهش Smullen و همکاران با استفاده از سویه‌هایی متفاوت با سویه‌های استفاده‌شده در مطالعه حاضر (نظیر *L. acidophilus* NCTC 1723 و *S. mutans* 10499 and R9) انجام شد که احتمالاً در نتایج حاصل از مطالعه مؤثر است.

در این مطالعه، اثربخشی ضد میکروبی و وجود سینرژیسم احتمالی ترکیب واریش فلوراید و GSE توسط آزمون‌های دیسک آگار دیفیوژن و میکروبراث دایلوژن بررسی شد. یافته‌ها هیچ‌گونه اثری از وجود هم‌افزایی در ترکیب این دو ماده نشان ندادند. به‌علاوه، ترکیب دو ماده به‌طور چشمگیری، سبب افزایش MIC در هر دو گونه‌ی باکتریایی مورد مطالعه شد. در مطالعه‌ی Furiga و همکاران، استفاده از GSE در ترکیب با نوعی آمین فلوراید به نام Fluorinol، به ترتیب با غلظت‌های 2 و 10/2 mg/ml، باعث کاهش چشمگیر کلونی‌های باکتریایی در سویه‌های استرپتوکوک و لاکتوباسیلی شد که با مطالعه‌ی حاضر مغایرت دارد (20). تفاوت در روش اجرا و مواد استفاده‌شده در دو مطالعه احتمالاً توجیه‌کننده‌ی مغایرت در نتایج است. تاکنون،

واریش فلوراید 5 mg/ml (به ترتیب با 13/1±6/1 و 13/0±6/5 mm) و کم‌ترین میانگین هاله‌ی مهار رشد در ترکیب دو عصاره در غلظت 2/5 mg/ml (5/0±6/9 mm) دیده شد. اثرگذاری وابسته به دوز در هر سه گروه GSE، واریش و ترکیب دو عصاره دیده شد. هم‌چنین، میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در غلظت‌های دو گانه‌ی مورد مطالعه، در گروه‌های GSE و واریش، بزرگ‌تر از استرپتوکوکوس موتانس بود. در مطالعه‌ی Ramy و Rajasekar که به بررسی اثر آنتی‌باکتریال GSE تقویت‌شده با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکساید بر باکتری‌های گرم مثبت پرداخته بودند، هاله‌ی عدم رشد بزرگ‌تری در گونه‌های لاکتوباسیلوس نسبت به استرپتوکوکوس موتانس مشاهده شد (15). یافته‌های مطالعه‌ی Tabasco و همکاران نیز بیانگر تأثیر چشمگیر GSE بر مهار رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بود (16)؛ لذا، یافته‌های این دو مطالعه با مطالعه‌ی حاضر همسو است. نتایج پژوهش Hervert-Hernández و همکاران، هم‌چون مطالعه‌ی حاضر، حاکی از اثرهای مهاري GSE بر رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بود. ایشان هم‌چنین، افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس را با افزایش غلظت GSE گزارش کردند که همسو با یافته‌های این مطالعه است (17). در بررسی رقت‌های سریالی از گروه‌های سه گانه در این پژوهش، واریش فلوراید در هر دو گونه‌ی باکتریایی بهترین عملکرد را نشان داد و میانگین کمترین حداقل غلظت مهاري (MIC) در این گروه به ثبت رسید (1/0±8/7 mg/ml). GSE در مهار رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس عملکرد مهاري مشابهی با واریش نشان داد؛ باین حال، در مهار استرپتوکوکوس موتانس در غلظت‌های پایین موفق نبود. حداقل غلظت مهاري GSE علیه استرپتوکوکوس موتانس در مطالعه‌ی Zhao و همکاران، 2 mg/ml الی 3 گزارش شده است که از میانگین به‌دست‌آمده در مطالعه‌ی حاضر (3/1±5/4 mg/ml) کم‌تر است (10).

مطالعه‌ی مشابهی با استفاده از وارنیش فلوراید و GSE روی دو گونه‌ی باکتریایی مذکور به منظور مقایسه با مطالعه‌ی حاضر انجام نشده است؛ با این حال، در پژوهش‌های پیشین، GSE به عنوان عامل ضدپوسیدگی و عامل رمینرالیزه کننده‌ی بافت‌های دندانی، با موادی حاوی فلوراید، نظیر سیلوردی آمین فلوراید (SDF)، بررسی شده است. بر اساس یافته‌های Firouzmandi و همکاران، استفاده از SDF، بیش از GSE سبب افزایش میکروهاردنس در لایه‌ی عاج پوسیده‌ی داخلی (inner carious dentin layer) شد. هم چنین، هیچ گونه نشانه‌ای از سینرژیسیم در استفاده‌ی هم‌زمان از SDF و GSE مشاهده نشد (21). از آن جاکه استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به ترتیب، عوامل آغازگر و پیش‌برنده‌ی فرایند پوسیدگی دندانی شناخته می‌شوند (22)، می‌توان نتایج مطالعه Firouzmandi و همکاران را همسو با مطالعه‌ی حاضر در نظر گرفت؛ در نتیجه، بر اساس مطالعه‌ی مذکور و نیز یافته‌های پژوهش حاضر، بایستی فرضیه‌ی وجود اثرهای سینرژیسیم در ترکیبات GSE و فلوراید را مردود دانست.

امروزه، در دندان پزشکی پیشگیرانه، به اثرهای ضدپوسیدگی فلوراید که ناشی از مهار دمینرالیزاسیون و تحریک رمینرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه است، بسیار توجه شده است (4). V. وارنیش استفاده شده در مطالعه‌ی حاضر، حاوی قند زایلیتول و CPP-ACP بود که نوعی پروتئین استخراج شده از شیر است که به یون‌های کلسیم و فسفات متصل شده است. زایلیتول عاملی مؤثر بر مهار رشد استرپتوکوکوس موتانس حفره‌ی دهان است. CPP-ACP نیز تقویت کننده چسبندگی یون‌های کلسیم و فلوراید در محیط دهان است و رمینرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه را سرعت می‌بخشد (23-25).

به تازگی، بررسی خواص دارویی عصاره‌های گیاهی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته و مطالعات بسیاری با هدف جایگزینی محصولات شیمیایی رایج و نیز بهبود خواص درمانی آن‌ها با

بهره‌گیری از عصاره‌های طبیعی انجام شده است. در پژوهش حاضر، با وجود اینکه عصاره‌ی هسته‌ی انگور در مقایسه با وارنیش فلوراید، خواص آنتی میکروبیال نسبتاً مشابهی را نشان داد، هیچ گونه اثری از هم‌افزایی میان این دو ماده در ترکیب آن‌ها مشاهده نشد. از آن جاکه به پیشگیری از پوسیدگی‌های دندانی بیش از پیش توجه می‌شود، به نظر می‌رسد که عصاره‌ی هسته‌ی انگور در غلظت مناسب بتواند جایگزینی پذیرفتنی برای وارنیش فلوراید در دندان پزشکی پیشگیرانه باشد. با این حال، می‌بایست پژوهش‌ها برای دستیابی به ترکیبی مؤثرتر از وارنیش فلوراید با استفاده از دیگر عصاره‌های گیاهی ادامه یابد.

محدودیت‌ها

مطالعه آزمایشگاهی حاضر همچون تمامی پژوهش‌های *in-vitro* بدون در نظر گرفتن شرایط و متغیرهای تأثیرگذار بالینی، همچون تغذیه، رعایت بهداشت، اسیدیت، حجم، خاصیت بافری و غلظت بزاق، اثرهای باکتری‌های موجود در فلور نرمال و نیز دیگر میکروارگانیسم‌های پوسیدگی‌زای کلونیزه‌شونده در حفره‌ی دهانی انجام گرفت. با توجه به یافته‌های این مطالعه و خواص آنتی باکتریال درخور توجه عصاره‌ی هسته‌ی انگور علیه دو گونه‌ی پوسیدگی‌زای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس موتانس، توصیه می‌شود که پژوهش‌هایی بالینی هم‌راستا با این مطالعه صورت گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی مصوب با کد 4113 از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و همچنین دارای کد اخلاق از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.1399.005) می‌باشد. بدین وسیله، از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌شود.

References

1. Delimont NM, Carlson BN. Prevention of dental caries by grape seed extract supplementation: A systematic review. *Nutr Health* 2020; 26(1): 43-52.
2. Zajkani E, Zeighami H, Zaeefjou A. Comparision of the effect of fluoride 0.2% and a combination mouthwash (xylitol and fluoride) on streptococcus mutans and lactobacillus acidophilus growths. *J Dent Med* 2017; 30(1): 57-64 (Persian).
3. Nahvi A, Goli HR, Davoodi A, Hosseinnataj A, Sheydayee S, Jafari A, et al. Antimicrobial and Synergistic Effects of Garlic and Cinnamon Extract Compared with Fluoride Varnish on Oral Lactobacillus acidophilus and Streptococcus mutans in Laboratory Conditions. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2023; 32(217): 46-56 (Persian).
4. Jullien S. Prophylaxis of caries with fluoride for children under five years. *BMC Pediatr* 2021; 21(1): 1-11.
5. Cochrane NJ, Shen P, Yuan Y, Reynolds EC. Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. *Aust Dent J* 2014; 59(1): 100-105.
6. Baik A, Alamoudi N, El-Housseiny A, Altuwirqi A. Fluoride varnishes for preventing occlusal dental caries: A review. *Dent J (Basel)* 2021; 9(6): 64.
7. Kamotsay K, Herczegh A, Rozgonyi F, Nász I, Gintner Z, Bánóczy J. Effect of fluoride on cariogenic oral microorganisms (an in vitro study). *Acta Microbiol Immunol Hung* 2002; 49(1): 47-58.
8. Swadas M, Dave B, Vyas SM, Shah N. Evaluation and comparison of the antibacterial activity against Streptococcus mutans of grape seed extract at different concentrations with chlorhexidine gluconate: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2016; 9(3): 181.
9. Gupta M, Dey S, Marbaniang D, Pal P, Ray S, Mazumder B. Grape seed extract: Having a potential health benefits. *J Food Sci Technol* 2020; 57(4): 1205-1215.
10. Zhao W, Xie Q, Bedran-Russo AK, Pan S, Ling J, Wu CD. The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. *J Dent* 2014; 42(8): 1010-1018.
11. Mirkarimi M, Amin-Marashi SM, Bargrizan M, Abtahi A, Fooladi I, Ali A. The antimicrobial activity of grape seed extract against two important oral pathogens. *Zahedan J Res Med Sci* 2013; 15(1): 43-46.
12. Mousavi F, Shirzadi Karamolah K, Mahmoudi H. Antimicrobial Effect of Extracts of Daphne Oleoides on Bacteria Isolated from Dental Plaque. *J Mashhad Dent Sch* 2019; 43(4): 387-400 (Persian).
13. Elgamaly H, Safy R, Makharita R. Influence of Medicinal Plant Extracts on the Growth of Oral Pathogens Streptococcus Mutans and Lactobacillus Acidophilus: An In-Vitro Study. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; 7(14): 2328-2334.
14. Zarei M, Rajabnia M, Moghadamnia AA, Khafri S, Khodadadi E. Effect of different Vitis vinifera seed extracts on lactobacillus acidophilus and casei bacteria. *Caspian J Dent Res* 2021; 10(1): 42-47.
15. Ramya G, Rajasekar A. Enhanced antibacterial effect of titanium dioxide nanoparticles mediated grape seed extract on oral pathogens- Streptococcus mutans and lactobacillus [Internet]. *J Evol Med Dent Sci* 2021; 10(22): 1656-1662.

16. Tabasco R, Sánchez-Patán F, Monagas M, Bartolomé B, Victoria Moreno-Arribas M, Peláez C, Requena T. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiol* 2011; 28(7): 1345-1352.
17. Hervet-Hernández D, Pintado C, Rotger R, Goñi I. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *Int J Food Microbiol* 2009; 136(1): 119-122.
18. Smullen J, Koutsou G, Foster H, Zumbé A, Storey D. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2007; 41(5): 342-329.
19. Krasteva D, Ivanov Y, Chengolova Z, Godjevargova T. Antimicrobial potential, antioxidant activity, and phenolic content of grape seed extracts from four grape varieties. *Microorganisms* 2023; 11(2): 395.
20. Furiga A, Roques C, Badet C. Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria. *J Appl Microbiol* 2014; 116(4): 761-771.
21. Firouzmandi M, Shafiei F, Jowkar Z, Nazemi F. Effect of silver diamine fluoride and proanthocyanidin on mechanical properties of caries-affected dentin. *Eur J Dent* 2019; 13(02): 255-260.
22. Salehi M, Molania T, Nemati N, Goli HR, Nahvi A. Antimicrobial Effect of Kids Dentifrices on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: An In-Vitro Study. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2022; 32(209): 24-32 (Persian).
23. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010; 89(11): 1187-1197.
24. Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monog Oral Sci* 2011; 22: 146-157.
25. Attiguppe P, Malik N, Ballal S, Naik SV. CPP-ACP and fluoride: a synergism to combat caries. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019; 12(2): 120.