بررسی اثر انتی باکتریال عصاره هیدروالکلی پوست انار بر روی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس

دکتر نیکا معصومی [۱] ، دکتر ماندانا خطیبی [۲*] ، دکتر سید رضا حسینی‌دوست [۳] ، دکتر شادی سرهرودی [۴]
۱- دندانپزشک؛تهران؛ایران
۲-دانشیار، گروه بیماریهای دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران
۳-استاد، گروه میکروب شناسی، قارچ شناسی، علوم پایه، دانشکده دارو سازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران
۴-استادیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران
وصول مقاله: ۱۴۰۲/۴/۳۰ اصلاح نهایی: ۱۴۰۲/۸/۱۲ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱

Evaluation of Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Pomegranate Peel Extract on Staphylococcus aureus

Nika Masoumi[1], Mandana khatibi[2], Seyed Reza Hoseinidoust[3], Shadi sarahroodi[4]
1- Dentist,private practice,Tehran,Iran
2- Associate Professor, Department of Oral medicine, Faculty of Dentistry, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Microbiology, Mycology, Basic Sciences, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran,Iran
4- Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran,Iran

Received:July 2023 ; Accepted: December 2023

Abstract
Background & Aim: Staphylococcus aureus is one of the bacteria that make up the normal flora of the mouth and has been linked to conditions such as parotid infections. Parts of pomegranate were known to have antibacterial properties. Due to the properties for pomegranate and the importance of Staphylococcus aureus in the oral cavity, the incidence of dental caries and periodontal disease, finding and introducing a natural substance to replace chemical mouthwashes is crucial. in this study we investigated the antibacterial effect of pomegranate hydroalcoholic peel extract on staphylococous aureu.
Material and Methods: For this experimental-laboratory study, Bacteria divided into 6 groups including: four groups of pomegranate peel extract with concentrations of 10, 25, 50 and 100 mg / ml, a positive control and a negative control group. Also, 3 bacterial samples were used to determine the MIC. disk diffusion test was used to measure the diameter of the growth inhibition zone. microdilution broth technique was used to evaluate the minimum concentration of bacterial growth inhibition (MIC). the obtained data were statistically analyzed by SPSS ver: 26 software. One way ANOVA test was used to examine the growth inhibition halo.
Results: The overall results of inhibitory halo diameter evaluation showed that pomegranate extract had a inhibitory activity against Staphylococcus aureus. Bacteria were sensitive to a concentration of 25 mg / ml. That with increasing the concentration of the extract, the amount of antimicrobial effect on bacteria increases and a significant difference was shown between the diameter of the inhibition halo in four concentrations (P value <0.001) and the greatest effect was seen in 100 mg / ml concentration. In MIC study, the results showed that the effective amount of hydroalcoholic extract of pomegranate peel to prevent bacterial growth is in the range between 50 mg / ml.
Conclusion: According to the obtained results, the hydroalcoholic peel extract of pomegranate has antimicrobial effect and it seems that pomegranate extract can be consumed for antimicrobial use.
Key words: pomegranate hydroalcoholic peel extract,antibacterial,staphylococcus aureus

 # Corresponding Author: Mandanakhatibi@yahoo.com
J Res Dent Sci. 2024;21(1):35-45

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر ماندانا خطیبی پست الکترونیک: Mandanakhatibi@yahoo.com

خلاصه:

سابقه و هدف: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جز باکتری های تشکیل دهنده فلور نرمال دهان است و ارتباط آن با مواردی همچون عفونت های غدد بزاقی مشخص شده است. قسمت‌هایی از انار به عنوان موادی با اثر آنتی‌باکتریال شناخته شدند. با توجه به خواص انار و اهمیت استافیلوکوک ارئوس درحفره دهان، بروز پوسیدگی و بیماری های پریودنتال، همچنین به منظور یافتن و معرفی ماده ای طبیعی برای جایگزینی دهانشویه های شیمیایی،در این تحقیق تأثیر عصاره هیدروالکلی پوست انار را بر میزان رشد میکروارگانیسم استافیلوکوک اورئوس بررسی کردیم.

مواد و روشها: جهت انجام این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی، باکتری‌ها به ۶ گروه شامل :چهار گروه عصاره انار با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر، یک گروه گروه کنترل مثبت و یک گروه کنترل منفی تقسیم شدند.هم چنین به منظور تعیین MIC از ۳ نمونه باکتری استفاده شد.تکنیک دیسک گذاری (Disk diffusion test) برای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد بکار رفت. جهت ارزیابی حداقل غلظت مهار رشد باکتری (MIC) از تکنیک Microdilution broth استفاده شد. داده های بدست امده در محیط کشت ، با نرم افزار SPSS Ver:26 انالیز شد.جهت مقایسه هاله عدم رشد در چهار غلظت مختلف عصاره انار از ازمون one way ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج کلی ارزیابی قطر هاله عدم رشد نشان داد که عصاره انار فعالیت مهاری در برابر باکتری استافیلوکوک اورئوس دارد . اولین غلظتی که باکتری به ان حساسیت نشان داد mg/ml۲۵ بود و با افزایش غلظت عصاره میزان اثر ضدمیکروبی روی باکتری افزایش یافت و اختلاف معناداری بین قطر هاله عدم رشد در چهار غلظت، نشان داده ($P < 0.001$)و بیشترین تاثیر در غلظت mg/ml۱۰۰ دیده شد.در بررسیMIC نتایج نشان داد که مقدار موثر عصاره هیدروالکلی پوست انار برای جلوگیری از رشد باکتری ، ۵۰ میلی گرم بر میلی لیترمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست امده عصاره هیدروالکلی پوست انار خاصیت ضد میکروبی دارد و به نظر میرسد میتوان از عصاره اناربرای استفاده ضد میکروبی بهره جست.

کلید واژه‌ها: عصاره هیدروالکلی پوست انار، آنتی باکتریال، استافیلوکوک اورئوس

مقدمه:

بیش از ۷۰۰ گونه باکتریایی به عنوان فلور نرمال در حفره دهان شناسایی شده اند که برخی از این باکتری‌ها در ایجاد بیماری های دهان همانند پوسیدگی دندان و بیماری های پریودنتال نقش دارند.[۱] باکتری استافیلوکوکوس ارئوس جز باکتری های تشکیل دهنده فلور نرمال دهان است و ارتباط آن با مواردی همچون انگولار کلایتیس، عفونت های غدد بزاقی(پاروتید)، موکوزیت استافیلوکوکی، دنچر استوماتیت و حتی شکست درمان ایمپلنت دندانی مشخص شده است[۲]. همچنین این باکتری از حفره دهان گروه مشخصی از بیماران همچون کودکان، افراد مسن، افراد دارای بیماری سیستمیک از جمله ارتریت روماتوئید و بیماران دارای مشکلات پریودنتال و پوسیدگی های دندانی ایزوله شده است[۳].

برای جلوگیری از وقوع این بیماری ها و بهبود بهداشت دهانی نیاز به روش هایی برای کنترل پلاک و در وهله اول کنترل بیوفیلم، بدون اسیب به تعادل بیولوژیکال حفره دهان، است. دهان شویه ها و مواد انتی باکتریال به عنوان راهی برای کنترل پلاک استفاده میشوند[۴].از سال ۱۹۷۰ دهان‌شویه کلرهگزیدین به دلیل اثر بلندمدت ضدباکتریایی برای کنترل بهداشت دهانی بکار رفته است[۵] .با این حال کلرهگزیدین عوارض جانبی از جمله ایجاد لکه روی دندان و مخاط دهان،حس سوزش، ایجاد مقاومت باکتریایی در استفاده طولانی مدت و هم‌چنین مزه‌ی ناخوشایند برای بسیاری از بیماران قابل قبول نیست[۶]. امروزه بعضی از مواد و دهان‌شویه‌های گیاهی خواصی هم‌چون ضدمیکروب‌بودن و مقابله با تشکیل پلاک دندانی را از خود نشان می‌دهد ، همین امر باعث توجه بیشتر به گیاهان دارویی شده است. [۷]

انار یکی از خوراکی‌های مفید و بومی ایران است که در برخی مناطق آسیا و مدیترانه نیز یافت می‌شود و می‌تواند به صورت آب‌میوه و یا به عنوان ماده اضافه‌شده در مربا و ژله استفاده شود. از گذشته‌های دور انار به دلیل خاصیت درمانی مورد توجه بوده است[۸]. قسمت‌هایی از انار مانند آب انار و یا پوست انار به عنوان موادی با اثر آنتی‌باکتریال شناخته شدند، هسته انار هم‌چنین به عنوان ماده‌ای با خاصیت ضدقارچی شناخته شده است [۹]. هم چنین بیان شده است که انار خاصیت بازدارندگی در مقابل التهاب های متعدد و بیماری های مزمن را دارا است[۱۰].انار به دلیل داشتن تانین (tannin) و پلی‌فنول،آنتی‌اکسیدانی قوی است. از ان برای درمان انواع زخم‌ها، من جمله آفت دهانی ،اسهال، عفونت‌های انگلی، دیابت و بیماری‌های قلبی و عروقی استفاده می‌شود [۱۱]. با توجه به خواص برشمرده شده برای انار و اهمیت استافیلوکوک ارئوس درحفره دهان، بروز پوسیدگی های دندانی و بیماری های پریودنتال، همچنین به منظور یافتن و معرفی ماده ای طبیعی برای جایگزینی دهانشویه های شیمیایی و دارای عوارض جانبی،در این تحقیق تأثیر عصاره هیدروالکلی پوست انارra بر میزان رشد سویه میکروارگانیسم استافیلوکوک اورئوس تهیه شده از مجموعه باکتری های سازمان پژوهش علمی صنعتی ایران، به روش انتشار دیسک در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه ازاد اسلامی واحد داروسازی بررسی کردیم.

اثر انتی باکتریال به سمیت انتخابی علیه میکروارگانیسم ها اطلاق و به طور عمده به دو گروه تقسیم میشود: باکتریوسیدال که به کشته شدن باکتری و باکتریواستاتیک که به جلوگیری از تکثیر و یا رشد باکتری بدون از بین بردن باکتری اطلاق میشود.اثر انتی باکتریال توسط مکانیسم های مختلفی از رشد یا تکثیر باکتری جلوگیری میکند یا باعث مرگ ان میشود.این مکانیسم ها شامل :۱) تاثیر روی دیواره سلولی باکتری ۲) تاثیر روی ریبوزوم های باکتری ۳) تاثیر روی رونویسی نوکلییک اسیدها ۴) تاثیر روی غشای سیتوپلاسمی میباشد.[۱۲] انار با نام علمی punica granatum گیاهی است متعلق به اسیا .یکی از قدیمی ترین میوه هاست وبه صورت مداوم در تمام دنیا برای درمان بیماری های مختلف در پزشکی سنتی مورد استفاده قرار میگیرد.با توجه به خاصیت آنتی باکتریال انار تحقیقات زیادی پیشنهاد کرده اند که از عصاره انار به عنوان انتی بیوتیک استفاده شود؛ زیرا عوامل بیماری زایی که نسبت به آنتی بیوتیک مقاوم هستند با انار میتوانند کشته شوند[۱۱]. تحقیقات نشان داده‌ند که عصاره پوست انار که ۵۰ درصد وزن این میوه را شامل می‌شود، فعالیت ضد میکروبی در مقایسه با سایر اجزای گیاه دارد.[۱۳]خاصیت انتی میکروبیال عصاره پوست اناربه دلیل وجود ۶۳ مولکول سنگین وزن فنولیک،الاژی تانین،پروانتوسیانیدین،فلاونید،گالیک اسید و الاژیک اسیدوپونیکالاژین A و B میباشد.[۱۴] ترکیبات فنلی موجود در پوست انار از جمله تانین ها از طریق چند مکانیسم مختلف خاصیت ضد میکروبی ایجاد میکنند.این ترکیبات قادرند پروتیئن های غشای سلولی میکروارگانیسم هارا تجزیه کنند و در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد کنند که در نتیجه ان سلول میکروبی از بین میرود و یا باعث دناتوره شدن برخی انزیم های میکروبی مانند گلیکوزیل ترانسفراز که نقش مهمی در اتصال محکم باکتری به سطح دندان دارد شوند.بدین صورت از مکانیسم چسبندگی باکتری ها به سطح دندان جلوگیری میشود.[۱۳] به علاوه ترکیبات فنلی با برخی مواد مغذی محیط مانند کربوهیدراتها،پروتئین ها ،ویتامین ها و مواد معدنی تشکیل کمپلکس داده و انها را از دسترس میکروارگانیسم ها خارج میکند که در نتیجه روی متالوانزیم ها تاثیر میگذارند و از تجمع میکروب ها جلوگیری میکنند.[۱۵]پلی فنل ها همچنین تاثیر به سزایی روی جمعیت باکتریایی از طریق کاهش PH محیط دارند[۱۷،۱۶] در ضمن اسید گالیک و پونیکالاژین موجود در عصاره پوست انار ،میتوانند از طریق مکانیسم کاهش

نفوذ ، اثر انتی بیوتیکی پوست انار را توجیه کند.[۱۸] مطالعات نشان داده استخراج عصاره با حلال اتانول (۶۵-۸۵٪)باعث باقی ماندن تانن ها،پلی فنل ها و پروسیانیدین ها و تاثیر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ ها میشود.[۱۹] هم چنین عصاره اتانولی پوست انار حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فنولیک و فلاونید نسبت به عصاره استونی و متانولی و ابی میباشد.در نتیجه اتانول حلال خوبی برای استخراج پلی فنل ها میباشد و پروانتوسیانین عصاره های اتانولی و استونی بیشتر از متانولی است.[۲۰] استافیلوکوک جز کوکسی های گرم مثبت کروی و هوازی است. در زیر میکروسکوپ به شکل خوشه انگور مشاهده میشود.این باکتری به صورت تغییر ناپذیری در فلور نرمال بینی، دهان و پوست یافت میشود.[۲۱] امروزه ثابت شده است که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس باعث مشکلات جدی در انسان ها و حیوانات از جمله عفونت های بیمارستانی و پس از جراحی در بافت نرم که درمانشان با انتی بیوتیک مشکل است، میگردند. علاوه بر این، استافیلوکوکها از عوامل اتیولوژیک پوسیدگی دندان و بیماری های پریودنتال میباشند.[۲۲-۲۸]

هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر عصاره هیدروالکی پوست انار بر رشد میکروارگانیسم استافیلوکوک اورئوس بود.

مواد و روش ها:

تحقیق با کد اخلاق (IR.IAU.DENTAL.REC.1400.033)به روش تجربی و آزمایشگاهی انجام شد. ابتدا با توجه به اهمیت و ارتباط موضوع ، این تحقیق در گروه بیماری های دهان،فک و صورت دانشکده دندانپزشکی ازاد اسلامی تهران طراحی و در شورای دانشکده به تصویب رسید ؛سپس سویه استاندارد باکتری استافیلوکوک اورئوس از سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران با کد(PTCC25923)تهیه[۲۹]و بقیه مراحل آزمایشگاهی در ازمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ازاد اسلامی ، دانشکده داروسازی انجام شد.

برای انجام آزمایش، باکتری‌ها به ۶ گروه شامل :چهار گروه عصاره انار با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر[۲۳]که در هر گروه تعداد ۶ نمونه باکتری، یک گروه کلرهگزیدین ۰/۲ درصد شامل یک نمونه باکتری به عنوان گروه کنترل مثبت و یک گروه دیسک بلانک شامل یک نمونه باکتری به عنوان گروه کنترل منفی تقسیم شدند.هم چنین به منظور تعیین MIC تعداد ۳ نمونه باکتری استفاده شد.

برای تهیه سوسپانسیون باکتری از غلظت نیم مک فارلند و محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد و در انتها با یک سوآپ استریل مقداری از سوسپانسیون باکتری بر روی محیط کشت تلقیح و سپس چاهک بر روی پلیت ایجاد گردید.[۲۴]

تهیه عصاره هیدروالکلی پوست میوه انار:

در ابتدا به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی انار مقدار ۸۴۰ گرم پوست انار به صورت خرید اینترنتی از سایت panjnoosh.comخریداری شد. با استفاده از دستگاه آسیاب صنعتی این مقدار پوست تبدیل به ۷۷۵ گرم پودر انار شد. در مرحله بعد میزان ۷۷۵ گرم پودر پوست خشک شده در ۱۰۰۰ میلی لیتر الکل ۷۰ درصد در ظرف دکانتور خیسانده شد. پس از گذشت ۴ ساعت مشاهده شد که جذب حلال گیاه بالا بوده و به همین دلیل مجددا میزان ۸۷۵ میلی لیتر الکل ۷۰ درصد به دکانتور اضافه و هم زده شد. عصاره تهیه شده پس از ۷۲ ساعت از دکانتور خارج و به ظرف پیرکس رو باز منتقل شد. به منظور خشکاندن عصاره این ظروف برای مدت ۴ روز در جلوی آفتاب قرار گرفتند. در این میان پس از ۴۸ ساعت اولیه میزان ۵۰۰ میلی لیتر الکل ۷۰ درصد به عصاره اضافه و هم زده شد.

در روز چهارم عصاره حاصله به وسیله‌ی اسپاتول جمع آوری و در دستگاه روتاری در شرایط خلا و دمای ۴۰ درجه قرار داده شد تا الکل باقی مانده در عصاره از آن جدا شود. سپس به ظرف غیر شفاف و در بسته منتقل و در یخچال نگهداری شد. میزان نهایی عصاره‌ی بدست آمده ۲۹۸ گرم بود. به منظور تهیه عصاره در غلظت های مختلف ۱ گرم از پودر عصاره در ده میلی لیتر اب دو بار تقطیر حل و با فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرونی صاف شد.با استفاده از محاسبات نسبی رقیق سازی جهت تهیه محلول عصاره با غلظتهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با آب دو بار تقطیر انجام گردید.در عصاره هیدروالکلی که اینجا منظور هیدرواتانولی می‌باشد، هم می‌توان اجزای قطبی و هم بعضی از اجزای غیر قطبی گیاه را خارج کرد که خواص کاملتری از گیاه را نشان میدهد. پس بر این اساس پاسخ احتمالی آنتی باکتریال عصاره هیدروالکلی پوست میوه انار بر استافیلوکوک اورئوس بهتر و قوی تر میباشد و نتیجه بهتری را در مهار رشد باکتری میبینیم و این به عنوان مزیت محسوب می‌شود.[۱۳]

انجام تست قطر هاله عدم رشد :

بعد از تهیه عصاره انار مقدار مشخصی از ان را در DMSOدی متیل سولفواکسید)دو درصد حل کردیم تا استوک بدست اید(۳۰) مقدار ۳۰ میلی لیتر[۲۴] از غلظت های ۱۰,۲۵,۵۰,۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر[۳۰] عصاره انار داخل چاهک قرار داده شد. از چاهک گروه های شاهد کنترل مثبت ،حاوی۳۰ میلی لیتر کلرهگزیدین ۰.۲ درصد (ناژو (Najo-و کنترل منفی بلانک(باکتری بدون افزودن ماده) نیز استفاده شد .پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در جار قرار گرفت.سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک هارا به کمک کولیس ورنیه برحسب میلی متر پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری و ثبت کردیم .

کمترین غلظت مهارکنندگی یا MIC :درواقع همان کمترین غلظت عامل ضد میکروبی است که به طور کامل مانع از رشد میکروارگانیسم در لوله یا چاه میکرودایلوشن می‌شود . یکی از مناسب ترین روش های تعیین ارزش MICاستفاده از متد رقت سریالی است که بر اساس میلی گرم بر میلی لیتر بیان می شود.

غلظت های نهایی عصاره با آماده کردن ۴رقت مختلف عصاره انار در محیط کشت مایع و در لوله‌های با حجم کم (پلیت میکروتیتراسیون ۹۶ خانه‌ای) به دست امد. سپس بعد از رقیق کردن سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده با مقیاس نیم مک فارلند هر لوله با حجم مناسبی از تلقیح میکروبی آماده شد. بعد از انکوبه شدن لوله ها به مدت ۷۲ ساعت، محیط کشت های مایع توسط دستگاه الایزا ریدر و در طول موج ۶۳۰ خوانده شدند

داده های بدست امده در محیط کشت مورد مطالعه با نرم افزار SPSS Ver:26 انالیز شد. بعد از تهیه MIC و قطر هاله عدم رشد،جهت مقایسه هاله عدم رشد در چهار غلظت مختلف عصاره انار با توجه به تبعیت داده ها از توزیع نرمال از ازمون one way ANOVA استفاده شد. همچنین به منظور بررسی وجود و یا عدم وجود اختلاف معنادار بین میزان قطر هاله عدم رشد در میان گروه‌ها از آزمون تکمیلی Tukey-HSD استفاده شد. میانگین MIC نیز همراه با انحراف معیار محاسبه و ضریب تغییرات (CV)ارائه شد.

یافته ها

براساس قطرهاله عدم رشد ؛جدول ۱ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره انار، میزان تاثیر آنتی باکتریال آن نیز افزایش می یابد.

جدول۱- میزان هاله عدم رشدبرحسب گروههای موردمطالعه

گروه ها	هاله عدم رشد میانگین ± انحراف معیار	CV	حداقل - حداکثر
عصاره انار ۱۰mg/ml	R	R	R
عصاره انار ۲۵ mg/ml	۱۲/۱±۱/۳	۱۰/۷	۱۰-۱۴
عصاره انار ۵۰ mg/ml	۱۳/۳±۱/۳	۹/۷	۱۱-۱۵
عصاره انار ۱۰۰ mg/ml	۱۵/۸±۱/۴	۸/۸	۱۴-۱۸
کلرهگزیدین ۲ درصد	۲۲	۰	۲۲-۲۲
دیسک بلانک	۰	۰	۰
نتیجه آزمون	در آزمون one way ANOVA اختلاف معناداری بین قطر هاله عدم رشد چهار غلظت نشان داده شد. (P value< 0.001)		

علاوه بر این طبق آزمون Tukey-HSD قطر هاله عدم رشد در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر با یکدیگر تفاوت معناداری نداشت ($P>0.05$)اما قطر هاله عدم رشد در میان باقی غلظت‌ها مانند غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با یکدیگر تفاوت معناداری داشت.($P<0.05$)

در بررسی MIC به وسیله میکرودایلوشن براث نتایج نشان داد که کمترین مقدار موثر عصاره هیدروالکلی پوست انار برای جلوگیری از رشد باکتری ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر است.

بحث:

نتایج کلی قطر هاله عدم رشد نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار اثر ضد میکروبی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد و با افزایش غلظت عصاره، اثر آنتی باکتریال نیز افزایش میابد؛ اما تاثیر آن در مقایسه با کلرهگزیدین ۰/۲٪ به طور معنا داری کمترمی‌باشد.

در بررسی MIC به روش میکروبراث دایلوشن به این نتیجه رسیدیم که مقدار موثر عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار برای جلوگیری از رشد باکتری ۵۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعهJacob و همکاران در هند با هدف مشاهده‌ی تفاوت اثر دو دهانشویه کلرهگزیدین و عصاره پوست انار بر روی باکتری‌های S.mutans, Lactobacilli, Viellonella تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میانگین تعداد باکتری‌ها مشاهده نشد؛ در حالی که آنالیز داخل گروهی بین زمانهای مختلف جمع آور بزاق، کاهش چشمگیر تعداد باکتری SMutans را بعد از گذشت چهار هفته (t۲) نشان داد (P=۰.۰۲۶). با این حال نتایج مشابهی برای باکتری‌های Lactobacilli و Veillonella بدست نیامد.[۶]

در این بررسی تفاوت معنی داری بین میزان تاثیر دهانشویه کلرهگزیدین و عصاره انار بر روی باکتری لاکتوباسیل گزارش نشده است در صورتی که در مطالعه‌ی ما کلرهگزیدین تاثیر انتی میکروبیال بیشتری نسبت به عصاره انار را نشان داد.تفاوت میکروارگانیسم های مورد مطالعه و نوع استفاده از عصاره انار توجیه تفاوت نتایج است،به نظر میرسد اصولا استافیلوکوک اورئوس نسبت به باکتری های مورد مطالعه تحقیق Jacob مقاومتر باشد و دیرتر به درمان با عصاره های گیاهی پاسخ دهد.

در مطالعهDiniasti M و همکاران که در سال ۲۰۲۰در اندونزی با عنوان تأثیر آنتی‌باکتریال عصاره سفید پوست انار (PUNICA GRANATUM L) بر استرپتوکوک سانگوئیس انجام شد،یک گروه کنترل مثبت با کلرهگزیرین ۰/۲٪ و یک گروه کنترل منفی و ۵ گروه با عصاره‌های ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۲۵٪، ۱۲/۵٪، ۶/۲۵٪ انار مورد بررسی قرار گرفتند. هاله عدم رشد برای همه‌گروه‌ها به جز دو گروه با غلظت‌های ۶/۲۵٪ و ۱۲/۵ تشکیل و نتیجه

گرفته شد رابطه‌ای میان عدم رشد باکتری و غلظت عصاره پوست سفید انار وجود دارد. به طور کلی عصاره پوست سفید انار در غلظت‌های ٪۲۵، ٪۵۰ و ٪۱۰۰ دارای خاصیت آنتی‌باکتریال عنوان شد. [۲۳] در این مطالعه مانند مطالعه ما غلظت های متفاوتی از انار بررسی و نشان داده شد که با افزایش غلظت عصاره،تاثیر انتی باکتریال ان افزایش میابد که از این جهت با مطالعه ما همسو میباشد. البته در این تحقیق تنها قطر هاله عدم رشد معیار بررسی بوده در حالی که در مطالعه ما MIC که معیار مهار کامل رشد باکتری است علاوه بر قطر هاله عدم رشد ،مورد نظر بوده.

در مطالعه Zazharskyi و همکاران در سال ۲۰۱۹ در کشور اوکراین که به بررسی فعالیت آنتی باکتریال تزریقات گیاهی در برابر استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس و سودوموناس آئروژینوزا پرداخت، از ۴۸ گیاه مختلف (دانه، علف، برگ و پوست) از جمله دانه انار ، پرتقال، اسطوخودوس، مگنولیا، بادرنجبویه ، پونه کوهی و غیره استفاده شد. بیشترین خاصیت مهاری روی باکتری اورئوس را گیاه جینسینگ گذاشت که در مقایسه با گروه کنترل ؛ ۱/۴۶ برابر تاثیر آنتی باکتریال داشت. از طرف دیگر گیاه انار بالاترین خاصیت ضد میکروبی خود را روی دو باکتری اپیدرمیس (۳/۵۳ برابر گروه کنترل) و آئروزینوزا (۵/۴۶ برابر گروه کنترل) نشان داد. در انتها مشخص شد که تاثیرگونه های گیاهی بر روی باکتری های مورد مطالعه از بنزیل پنیسیلین (کنترل مثبت)بیشتر است.[۲۲] در این مطالعه مانند مطالعه ما تاثیر انتی باکتریال عصاره انار بر روی باکتری استافیلوکوک اورئوس نشان داده شده.

در مطالعه‌ی Nozohour و همکاران در سال ۲۰۱۸ که به بررسی اثرات انتی باکتریال عصاره‌ی الکلی دانه و پوسته‌ی انار بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پرداخت، عصاره‌ی اتانولی انار اثر مهاری بیشتری نسبت به تتراسایکلین و کلرامفنیکل بر روی باکتریها داشت. MIC و MBC عصاره دانه انار برای اورئوس به طور معنی داری بیشتر از عصاره پوست انار بود.. مقادیر MBC و MIC نشان می‌دهد که خاصیت آنتی باکتریال عصاره پوست انار پتانسیل مهاری بیشتری روی باکتریها در مقایسه با عصاره دانه انار دارد و بین این دو تفاوت اماری معناداری وجود دارد.[۲۴] به جهت تایید تاثیر انتی میکروبیال پوست انار بر استافیلوکوک اورئوس از طریق MIC و قطر هاله عدم رشد مشابهت نتایج با مطالعه ما وجود دارد.

مطالعه دیگری توسط Kunte S و همکاران در سال ۲۰۱۸ در کشور هند به صورت In vitro تحت عنوان بررسی مقایسه‌ای اثر آنتی‌میکروبیال عصاره دانه انار در مقابل استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل ،با هدف بررسی کارایی آنتی‌باکتریال عصاره پوست انار، دهان شویه Hiora و کلرهگزیدین انجام شد.[۲۵] نتایج این مطالعه اثر ضد میکروبی انار را تایید کرد،از این جهت و در این زمینه با مطالعه ما همسو میباشد .

مطالعه‌ی دیگری توسط Ferranzzano و همکاران با هدف بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره هیدروالکلی پوسته و آب انار علیه باکتریهای کاریوژنیک انجام شد ونتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی پوسته و آب انار قابلیت مقابله با باکتریهای اصلی پوسیدگی‌زا را دارند.[۲۶] و هم راستا با تحقیق ما اثربخشی عصاره هیدروالکلی بر میکروب ها نشان داده شده است.باید توجه داشت که میکروارگانیسم های مورد بررسی در این دوتحقیق متفاوتند و به دنبال این تفاوت MIC های متفاوت در مهار رشد گزارش شده است.

مطالعه‌ای توسط Millo. و همکاران با هدف بررسی آزمایشگاهی تاثیر آنتی باکتریال ژل فرموله شده میوه انار در مقابل استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سنگوئیس و لاکتوباسیلوس کازئی انجام شد. نتایج آزمایش نشان داد که ژل ساخته شده انار از لحاظ آماری قدرت مهاری بسیار خوبی روی باکتری موتانس نسبت به کنترل

منفی دارد ولی قدرت مهاری آن مانند تحقیق حاضر از کلرهگزیدین کمتر است.[۲۷] با وجود تفاوت میکروارگانیسم های مورد مطالعه ،نتایج به مطالعه حاضر نزدیک میباشد.

مطالعه Invitro توسط Umarو همکاران در سال ۲۰۱۶ در کشور عربستان تحت عنوان اثر دهان‌شویه‌ی انار بر تعداد استرپتوکوک موتانس و PH بزاق، با هدف تعیین تاثیر بر روی PH بزاق و تعداد استرپتوکوک موتانس قبل و بعد از استفاده دهان‌شویه انار ، نشان داد که دهانشویه عصاره انار باعث کاهش قابل‌توجه تعداد باکتری های Smutans می‌شود.[۲۸] در رابطه با تاثیر آنتی باکتریال عصاره پوست انار این ازمایش با مطالعه ما همسو بوده با این تفاوت که غلظت های استفاده شده در این تحقیق از غلظت های بکار گرفته شده در تحقیق ما بالاتر بوده ؛بنابراین تاثیر ضد میکروبی گزارش شده در مطالعه ما در غلظت پایین تر گزارش شده است.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ در ایران Abdollahzadehو همکاران در ایران مطالعه‌ای با عنوان اثر آنتی باکتریال و آنتی فونگال پونیکا گراناتومِ عصاره پوست انار علیه پاتوژنهای دهانی انجام شد ،از میکروارگانیسم های استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سنگوئیس ، استرپتوکوکوس سلیواریس ، استافیلوکوکوس اورئوس ، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ، اکتینومایسس ونکوز، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کاندیدا آلبیکنس استفاده شد.نتایج آزمایش نشان داد که همه غلظت‌های MEPGP ۴,۸,۱۲ mg/ml باعث توقف رشد میکروارگانیسم‌ها استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (هاله عدم رشد ۱۱.۵و ۱۳.۵و ۱۳.۵) شدند. اما فقط در غلظت ۸ و ۱۲ mg/ml علیه Ssanguinis, Lacidophilus, Smutans و Ssalivaris اثر گذار بودند. همچنین تفاوت معنی داری در میان غلظت ها ازجهت تاثیر ضدمیکروبی وجود نداشت. ضمناً هیچ کدام از غلظت ها باعث توقف رشد Aviscosus و Calbicans نشدند.[۲۹] در این مطالعه تاثیر ضد میکروبی عصاره پوست انار بر استافیلوکوک اورئوس گزارش شده است و در توجیه عدم تفاوت معنا دار میان غلظت های مورد بررسی در این مطالعه میتوان به نزدیک بودن میزان غلظت ها ی به کار رفته اشاره کرد.در این تحقیق تنها قطر هاله عدم رشد معیار بررسی بوده در حالی که در مطالعه ما MIC که معیار مهار کامل رشد باکتری است علاوه بر قطر هاله عدم رشد ،مورد نظر بوده.

از مزایای تحقیق حاضر، به استفاده از دو تکنیک و معیار برای تعیین اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی پوست انار ،تحت کنترل بودن شرایط ازمایش ،دقت تکنیک های بکار رفته و مهارت مجریان ازمایش؛مشابهت گونه بکار گرفته شده استافیلوکوک اورئوس با گونه موجود درفلور دهانی میتوان اشاره کردکه تا حدودی تعمیم پذیری نتایج به حفره دهان را ممکن می‌سازد.

از محدودیت‌های این تحقیق به هماهنگی با گروه فارماکوگنوزی جهت تهیه عصاره و گروه میکروبیولوژی جهت انجام آزمایشات ؛ اشاره کرد؛ضمناانجام مطالعه نیازمند تهیه لوازم مختلف و گران قیمت بود.راه های مختلفی جهت حل عصاره به گونه‌ای که خود حلال اثر ضد میکروبی نداشته باشد، در نظر گرفته و مورد آزمایش قرار گرفت بنابراین وقت ومواد زیادی مصرف شد.تهیه سویه مورد نظر باکتری استافیلوکوک اورئوس نیز به آسانی امکان پذیر نبود.

هیچ تعارض منافعی در این تحقیق وجود نداشت،بدون حامی و با هزینه شخصی انجام شد،

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج بدست امده عصاره هیدروالکلی پوست انار خاصیت ضد میکروبی دارد و به نظر می‌رسد میتوان ازعصاره اناربرای استفاده ضد میکروبی(در محصولات مختلف دهان شویه و خمیر دندان ، ابنبات و ادامس گیاهی)بهره جست و میتوان از ان به عنوان اهمیت کلینیکی ازمایش یاد کرد.

سپاسگزاری:

با تشکر از همکاران ازمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ازاد اسلامی ، دانشکده داروسازی

References:

1-Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J. Clin. Microbiol.2005;43(11):5721.

2. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. Staphylococcus aureus and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? Am. J. Infect. Control. 2015 ;43(1):35-7.

3. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. Staphylococcus aureus in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br. Dent. J. 2003;195(12):701-3.

4. Baehni PC, Takeuchi Y. Anti- plaque agents in the prevention of biofilm- associated oral diseases. Oral Dis. 2003;9 Suppl 1:23-9.

5. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, Casas-Agustench P, Farnham G, Liddle L, Burleigh M, White D. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. Sci. Rep.2020;10(1):1-8.

6. Jacob B, Malli Sureshbabu N, Ranjan M, Ranganath A, Siddique R. The Antimicrobial Effect of Pomegranate Peel Extract versus Chlorhexidine in High Caries Risk Individuals Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Randomized Triple-Blind Controlled Clinical Trial. Int J Dent. 2021:2021:5563945.

7. Yarahmadi N, Hashemian F, Doust RH. Clinical Effects of Chlorhexidine 0.2% and Cetylpyridinium 0.05% Combination in Comparison with Chlorhexidine, Cetylpyridinium and Persica in Reducing Oral Bacteria in Healthy Individuals. J. Pharm. Care. 2020;8(3):116-22.

8. Gulube Z, Patel M. Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. Microb Pathog. 2016:98:45-9.

9. Mishra P, Marwah N, Agarwal N, Chaturvedi Y, Suohu T. Comparison of Punica granatum, Terminalia chebula, and Vitis vinifera Seed Extracts used as Mouthrinse on Salivary Streptococcus mutans Levels in Children. JCDP. 2019;20(8):920-7.

10. Hanafy SM, Abd El-Shafea YM, Saleh WD, Fathy HM. Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. J. Genet. Eng. & Biotechnol. 2021;19(1):1-0.

11.El-Sharkawy MS. Evaluation of the Antimicrobial Effect of Pomegranate Extract on Streptococcus Mutans. Al-Azhar D J. 2019;6(4):467-73.

12. Walley S. Essential microbiology for dentistry. Br. Dent. J. 2012 Apr;212(7):69

13. Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (Punica granatum L.). Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 2010;9(3):273-81.

14. Qu W, Breksa III AP, Pan Z, Ma H. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. Food Chemistry. 2012;132(3):1585-91.

15. Estabraghi E, Sadeghpour M, Mehrabani A. Study of pomegranate hydromethanol extract on Staphylococcus aureus and Escherichia coli by microplate in laboratory conditions. Journal of Payavard Salamat. 2018;12(3):183-92.

16. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. J. Ethnopharmacol. 2012;143(2):397-405.

17. Endo EH, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against Candida albicans. Res. Microbiol. 2010;161(7):534-40.

18. Shanmugam S, Annadurai M, Rajendran K. Ethnomedicinal plants used to cure diarrhea and dysentery in Pachalur hills of Dindigul district in Tamil Nadu, Southern India. J. Appl. Pharm. Sci. 2011 Oct 1;1(8):94.

19. Jafari A.Moslehishad M,Ghanavi Z. Effect of solvent on antimicrobial compounds extracted from pomegranate waste and antimicrobial power of the extract. 3rd International Congress and 26th National Congress of Food Science and Technology of Iran.2019;3(23).

20. Aravindraj S, Preethi M, Sivapathasundharam B. Antimicrobial Effects of Punica Granatum Extracts On Staphylococcus aureus,Streptococcus mutans,Lactobacillus acidophilus, Enterococcus faecalis and Candida albicans. Int J Curr Microbiol App Sci.2017:6(9):2762-74.

21. Foster, Timothy J. "Staphylococcusaureus." Molecular Medical Microbiology (2002): 839-888.

22. Zazharskyi V, Davydenko P, Kulishenko O, Borovik I, Brygadyrenko V, Zazharska N. Antibacterial activity of herbal infusions against staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis and pseudomonas aeruginosa in vitro. Magyar Allatorvosok Lapja. 2019;141(11):693-704.

23. Diniasti M, Delima AR, Zakki M. ANTIBACTERIAL EFFECT OF WHITE POMEGRANATE PEEL EXTRACT (PUNICA GRANATUM L) AGAINST STREPTOCOCCUS SANGUINIS. ODONTO: Dental Journal. 2020 Aug 5;7(1):18-24.

24. Nozohour Y, Golmohammadi R, Mirnejad R, Fartashvand M. Antibacterial activity of pomegranate (Punica granatum L.) seed and peel alcoholic extracts on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa isolated from health centers. Journal of Applied Biotechnology Reports. 2018 Mar 30;5(1):32-6.
25. Kunte S, Kadam N, Patel A, Shah P, Lodaya R, Lakde L. Comparative evaluation of antimicrobial properties of pomegranate peel extract against Streptococcus mutans and lactobacillus-an in vitro study. International Dental & Medical Journal of Advanced Research. 2018;4(1):1-6.
26. Ferrazzano GF, Scioscia E, Sateriale D, Pastore G, Colicchio R, Pagliuca C, Cantile T, Alcidi B, Coda M, Ingenito A, Scaglione E. In vitro antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. BioMed research international. 2017 Oct 25;1-7.
27. Millo G, Juntavee A, Ratanathongkam A, Nualkaew N, Peerapattana J, Chatchiwiwattana S. Antibacterial inhibitory effects of punica granatum gel on cariogenic bacteria: an in vitro study. International journal of clinical pediatric dentistry. 2017 Apr;10(2):152.
28. Umar D, Dilshad B, Farhan M, Ali A, Baroudi K. The effect of pomegranate mouthrinse on Streptococcus mutans count and salivary pH: An in vivo study. Journal of advanced pharmaceutical technology & research. 2016 Jan;7(1):13.
29. Abdollahzadeh SH, Mashouf RY, Mortazavi H, Moghaddam MH, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of Punica granatum peel extracts against oral pathogens. Journal of Dentistry (Tehran, Iran). 2011;8(1):1.