مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۵، اردیبهشت ۱۳۹۵، صفحه ۶۰-۵۳

مقایسه اثر ضد قارچی عصاره متیلن کلرایدی و متانولی چای سبز و سیاه بر کاندیدا آلبیکنس

منوچهر اشرف پور (PhD)[۱]، علیرضا قربانی پاشاکلایی (DDS)[۲]، علی اصغر سفیدگر (PhD)[۲]، حامد حسین کاظمی (DDS)[۴]، علی اکبر مقدم نیا (PhD)[۱]، سهراب کاظمی (MSc)[۱]، ملیکا مزلقانی (BSc)[۳]، محمود برادران (PhD)[۱*]

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۳- گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۴- گروه تشخیص بیماری های دهان و دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۴/۶/۱۸، اصلاح: ۹۴/۷/۶، پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

خلاصه

سابقه و هدف: کاندیدیازیس شایعترین عفونت قارچی است و اغلب با نیستاتین درمان می شود. با توجه به مشکل مقاومت دارویی و عوارض مربوط به این داروها، مطالعه با هدف بررسی خواص ضد قارچی چای سیاه و سبز بر کاندیدا آلبیکنس انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ابتدا عصاره متانولی و متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه تهیه شد. عصاره متانولی با دوزهای ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم و عصاره متیلن کلراید نیز با غلظت های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم به ازای هر دیسک بکار برده شد و از روش انتشار دیسک و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد برای تعیین خاصیت ضد قارچی عصاره ها علیه کاندیداآلبیکنس استفاده گردید. نتایج ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد مقایسه گردیدند.

یافته‌ها: عصاره متیلن کلرایدی هر دو چای تاثیر ضد قارچ بیشتری نسبت به عصاره متانولی بوجود آورد. حداکثر فعالیت ضد قارچ۲۴ ساعت اول توسط غلظت ۱ میلی گرم بر دیسک عصاره متیلن کلرایدی حاصل شد و در این غلظت با تشکیل هاله عدم رشد۴/۴±۳۰/۵۷ و۲/۷±۳۴/۲۵ میلی متر بترتیب برای عصاره متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه اثر ضد قارچ بیشتری نسبت به نیستاتین (۱/۰۶±۲۰ میلی متر) بوجود آمد ($p<0/01$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که عصاره برگ های چای سبز و سیاه می توانند فعالیت ضد قارچ در مقابل کاندیداآلبیکنس بوجود آورند که این اثر وابسته به غلظت بوده و در ۲۴ ساعت اول بیشتر از ۴۸ ساعت بعد ایجاد می گردد.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، چای سیاه، چای سبز، عصاره متانولی، عصاره متیلن کلرایدی.

مقدمه

کاندیدیازیس مهمترین شکل عفونت های قارچی دهانی است که توسط ۸ گونه از قارچ کاندیدا ایجاد می شود، ولی کاندیدا آلبیکنس شایعترین دلیل آن است(۱). کاندیدا آلبیکانس قارچی است که سبب عفونت های فرصت طلب شدید در انسان می شود. کلونی های این قارچ در سطح غشاهای مخاطی دهان، ناحیه تناسلی و دستگاه گوارش ایجاد شده و بسته به نقص زمینه ای میزبان سبب طیفی از عفونت ها می شود. به دلایل مختلف، در دو دهه اخیر عفونت های کاندیدایی بطور چشمگیری افزایش یافته است(۲). علاوه بر این، آلودگی بیوفیلم‌ها به قارچها یکی از مشکلات رایج بیمارانی است که دارای لوله ها و یا وسایل درمانی کمکی در داخل بدن هستند. کاندیداآلبیکانس شایعترین قارچ مسبب عفونت بیوفیلم ها است و حدود ۴۰٪ از بیماران دارای کاتترهای داخل وریدی دچار آلودگی قارچی می شوند که نرخ مرگ و میر ۴۱٪ را در پی دارد (۳). مطالعات نشان داده اند که قارچ های تولید کننده مایکوتوکسین ها توسط برخی گیاهان مهار می شوند. این گیاهان از طریق تولید متابولیت های ثانویه زیادی نظیر آلکالوئیدها، تانین ها، گلیکوزیدها، ساپونین ها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی دارای اثرات فارماکولوژیک بوده و بعنوان منابع مهم ترکیبات ضد میکروبی و ضد قارچ عمل می کنند(۵و۴). استفاده از ضد قارچ های صناعی بدلیل محدودیت دسترسی و نیز هزینه بالا با بروز مشکلاتی همراه است. علاوه بر این ضد قارچهای صناعی بدلیل آلوده نمودن محیط و نیز سمیت، برای حفاظت از مواد غذایی ذخیره ای قابل استفاده نیستند. بنابر این لازم است جایگزینهایی برای ضد قارچهای صناعی شناسایی و معرفی گردند. در همین راستا مطالعات نشان می‌دهند عصاره‌های گیاهی دارای خواص ضد قارچ و آنتی باکتریال می‌باشند. ضد قارچ های طبیعی علاوه بر اثرات سوء کمتر بر محیط زیست و سلامت انسان، می توانند جایگزین مناسبی برای اشکال مصنوعی داروهای ضد قارچ باشند(۶). بطور بالینی در مقایسه با ترکیبات آنتی باکتریال، داروهای ضد قارچ کمتری در دسترس قرار دارند. در سالهای گذشته نیز

▣ این مقاله حاصل پایان نامه علیرضا قربانی دانشجوی دندانپزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۳۸۴۷ دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد
* مسئول مقاله: دکتر محمود برادران
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی. تلفن: ۵-۳۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱
E-mail: baradaran81@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]

بدلیل گسترش مشکلات ناشی از درمان های مستلزم سرکوب ایمنی مانند پیوند عضو، کانسر و یا ایدز میزان بروز عفونت های قارچی افزایش یافته است که این امر به همراه مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها و سمیت ناشی از درمان طولانی مدت با داروهای ضد قارچ، مطالعه جهت غربالگری گیاهان سنتی برای شناسایی و معرفی ترکیبات و داروهای ضد قارچ جدید را ضروری می سازد. چای مهمترین گیاه از جنس Camellia می باشد که در سراسر جهان به عنوان دومین نوشیدنی پرمصرف به حساب می آید(۷). مطالعات اخیر اثرات سودمند متعددی از قبیل کاهش کلسترول، کاهش فشار خون، خاصیت آنتی اکسیدانی، اثرات ضد میکروبی و محافظت در برابر بیماری های قلبی عروقی و سرطان را برای چای مطرح کردند (۸). چای حاوی پلی فنلها، کافئین، فلاونول‌ها(کوئرستین، کامفر و روتین)، تیانین و ترکیبات معطر می باشد(۱۰و۹). پلی فنول ها به خصوص کاتچین و فنولیک اسید بیشترین نقش را در سلامت انسان دارند.کاتچین چای به شکلهای epigallocatechin gallate- (EGCG)، epigallocatechin- (EGC)، epicatechin gallate- (ECG)، epicatechin- (EC) یافت می شود (۱۱). ECGC و تیافلاوین چای در غلظت های مختلف خاصیت ضد قارچی در برابر چندین قارچ نشان داده اند. نتایج برخی مطالعات نشان داده اند که خاصیت ضد قارچی کاتچین چای در برابر کاندیدا آلبیکنس بیشتر بصورت وابسته به pH بروز می نماید. علاوه بر این .ECGC باعث افزایش خاصیت ضد قارچی داروی amphoterecin-B می‌شود و مصرف توام ECGC و داروی ضد قارچ fluconazole باعث کاهش مقاومت قارچ کاندیدا آلبیکنس نسبت به fluconazole می شود(۱۲). دو نوع چای سبز و سیاه به دلیل تفاوت در روش فرآوری می توانند حاوی انواع متفاوتی از ترکیبات موثره باشند، لذا مطالعه حاضر با هدف مقایسه اثرات ضد قارچ عصاره‌های متانولی و متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه در مقابل کاندیدا آلبیکانس انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از قارچ کاندیدا آلبیکنس گونه S.Ca-PTCC-265T که از مرکز پژوهشهای علمی–صنعتی ایران تهیه شده است استفاده گردید. چای سبز و چای سیاه در این مطالعه از نوع درجه یک و فاقد هرگونه اسانس و یا افزودنی بوده اند و از مرکز تحقیقات علوم گیاهی هلال احمر سلمان شهر خریداری گردید. برای بدست آوردن عصاره الکلی از روش خیساندن استفاده شد به این صورت که چای سبز و سیاه به صورت جداگانه به مقدار ۲۰gr در ۲۰۰ ml میلی لیتر متانول ۹۷٪ به مدت ۴۸ ساعت غوطه ور شدند. سپس با جدا کردن تفاله ها، محلول بدست آمده از کاغذ صافی عبور داده شدند و در مرحله بعد در زیر هود خشک شد تا عصاره خشک الکلی چای سیاه و سبز بدست آید. از عصاره خشک بدست آمده توسط حلال متانول ۹۷٪ محلول ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس محلول حاصل در دوزهای ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم به ازای هر دیسک جهت بررسی فعالیت ضد قارچی مورد استفاده قرار گرفت. به طور مشابه برای تهیه عصاره متیلن کلراید چای سبز و سیاه ابتدا مقدار ۲۰گرم از نمونه‌ها در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه به آرامی جوشانده شد. سپس پس از سرد شدن از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول بدست آمده از چای سیاه و سبز به صورت جداگانه درون قیف جداکننده با مقدار ۷۰ میلی لیتر متیلن کلراید ترکیب و به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد. در پایان این مرحله دو فاز در محلول تشکیل شد که فاز تحتانی حاوی ترکیبات حل شده در متیلن کلراید بود. سپس با باز کردن شیر قیف جداکننده فاز تحتانی درون ظرف جداگانه ای ریخته شد. در مورد باقیمانده محلول داخل قیف جداکننده نیز دو بار این مراحل تکرار گردید. در ادامه، محلولهای بدست آمده با استفاده از سانتریفیوژ مدل Clements 2000 و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول شفاف بدست آمده برای رسیدن به عصاره خشک متیلن کلرایدی در زیر هود بمدت ۲۴ ساعت خشک گردید (۱۳). عصاره خشک بدست آمده با استفاده از حلال متانول ۹۷٪ با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر حل گردید و برای انجام مطالعه محلول مزبور بترتیب با دوزهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم به ازای هر دیسک بکار برده شد. به منظور مقایسه اثرات ضد قارچی غلظت های مختلف عصاره های متانولی و متیلن کلراید از دوز ۱۰۰ واحد نیستاتین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. بررسی خواص ضد قارچی غلظتهای مختلف عصاره های چای سبز و سیاه بر روی سویه استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکنس از روش انتشار دیسک استفاده گردید (۱۴).

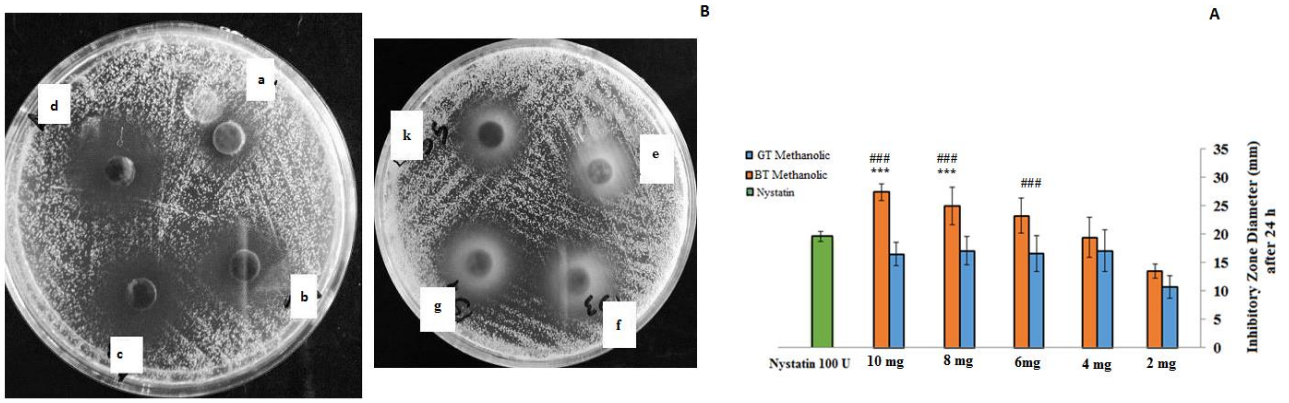
برای این منظور ابتدا دیسک ها روی ظرف در بسته قرار داده شده و بمدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شدند. سپس سوسپانسیونی از کاندیدا آلبیکنس در محیط کشت BHI مایع تهیه گردید که کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند ایجاد نمود. در ادامه با استفاده از یک سواپ استریل از سوسپانسیون مربوطه در تماس با سطح پلیت محتوی محیط کشت سابرودکستروزآگار گسترش داده شده و سپس دیسک ها در داخل پلیت ها قرار داده شد. از دیسک خالی و حلال متانول نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. تمام پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها بعنوان شاخصی از فعالیت ضد قارچی با استفاده از خط کش اندازه گیری گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزارSPSS۲۲ صورت گرفت. از آزمون‌های آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و t برای مقایسه نتایج استفاده شد و $p<۰/۰۵$ مبنای معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

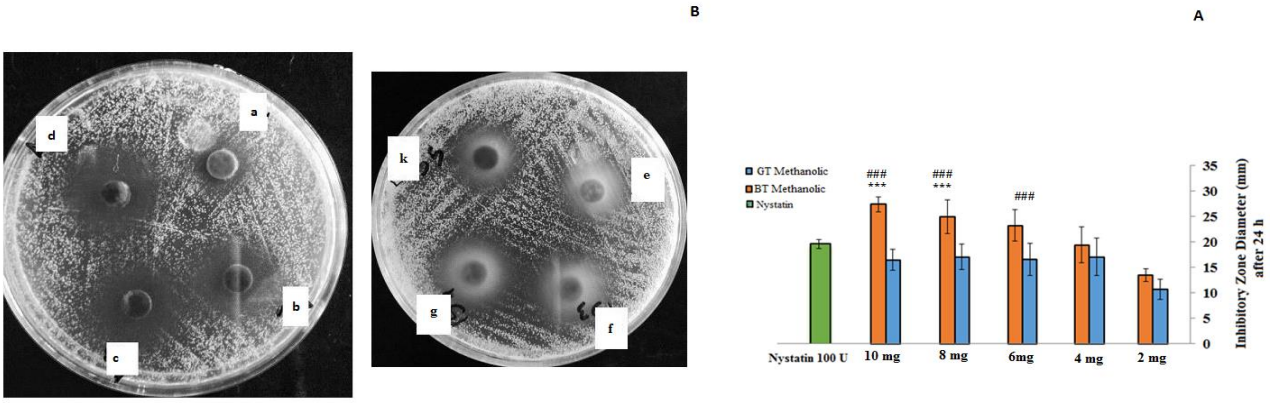
نتایج مطالعه حاضر نشان داده اند که عصاره برگ های چای سبز و سیاه فعالیت ضد قارچ قابل قبولی در مقابل کاندیداآلبیکنس بوجود می آورد. شکل ۱ نمودار (A) و تصویر (B) مربوط به مقایسه تاثیر ضد قارچی غلظت های مختلف عصاره متیلن کلراید چاه سیاه و چای سبز را علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس را در دوز های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم بر دیسک و بر اساس قطر هاله عدم رشد ۲۴ ساعت اول و در روش رقیق سازی مکرر نشان می دهد. عصاره متیلن کلرایدی برگ هر دو چای سبز و سیاه در همه غلظت‌ها تاثیر ضد قارچ قابل مقایسه ای با دوز ۱۰۰ واحدی نیستاتین بر علیه کاندیدا آلبیکنس ایجاد نموده است (شکل ۱). در حداقل دوز دو عصاره (۰/۲ میلی گرم) نیز تاثیر ضد قارچ قابل توجه بوده است ولی در مقایسه با نیستاتین معنی دار نبوده است ($p<۰/۰۵$)، با افزایش غلظت هر دو عصاره، فعالیت ضد قارچ بصورت وابسته به دوز افزایش یافته است که این تاثیر برای دوزهای ۰/۸ و ۱ میلی گرم($p<۰/۰۱$، $p<۰/۰۰۱$)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]

چای سبز و ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم (p<۰/۰۰۱) سیاه در مقایسه با نیستاتین معنی دار بوده است. حداکثر فعالیت ضد قارچی عصاره های متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه نیز در دوز ۱ میلی گرم به ازای هر دیسک بدست آمده است و در این غلظت با هاله عدم رشد۴/۴±۳۰/۵۷ و۲/۷±۳۴/۲۵ میلی متر بترتیب برای عصاره متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه، خاصیت ضد قارچ بیشتری نسبت به نیستاتین (۱/۰۶±۲۰ میلی متر) بوجود آمد. اگر چه در همه غلظتهای مورد مطالعه، چای سیاه تاثیر ضد قارچ بیشتری ایجاد نموده است ولی این تاثیر معنی دار نبوده است و فقط در غلظت ۱ میلی گرم تفاوت معنی داری بدست آمد (p<۰/۰۱). لازم به ذکر است که در نمونه بلانک یا شاهد منفی هیچگونه هاله عدم رشد تشکیل نشده است. بنابراین از مقایسه تاثیر ضد قارچ غلظت های مختلف عصاره ها با نمونه شاهد منفی یا بلانک صرف نظر شده است. شکل ۲ نمودار (A) و تصویر (B) نتایج تاثیر ضد قارچ عصاره متانولی چای سبز و سیاه را در غلظت های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم به ازای هر دیسک و دوز ۱۰۰ واحدی نیستاتین را بر قارچ کاندیدا آلبیکنس را در ۲۴ ساعت نخست نشان می دهد. در همه غلظت ها، هر دو عصاره دارای اثرات ضد قارچ بوده اند. تاثیر ضد قارچ دوزهای مختلف عصاره متانولی چای سبز مشابه نیستاتین ۱۰۰ واحدی بود و تفاوت آماری معنی داری با نیستاتین نشان نداده اند و همانطور که در شکل دیده می شود با افزایش غلظت عصاره متانولی چای سبز میانگین قطر هاله عدم رشد تغییر معنی داری نشان نداد. تقریبا در همه غلظتها، عصاره متانولی چای سیاه نسبت به چای سبز توانست تاثیر ضد قارچ بیشتری بر کاندیدا آلبیکنس بوجود آورد. عصاره متانولی چای سیاه در غلظتهای ۸ و بویژه ۱۰ میلیگرم بر دیسک تاثیر ضد قارچ بهتری بوجود آورد. عصاره متانولی چای سیاه در این غلظتها بترتیب با تشکیل هاله عدم رشد ۲/۰۸±۲۴/۸۷ و ۱/۰۶±۲۷/۳۱ میلیمتر خاصیت ضد قارچ معنی داری نسبت به نیستاتین پدید آورد (p<۰/۰۰۱) (شکل ۲). ولی نتایج حاصله برای غلظت های ۲، ۴ و ۶ میلی گرم نسبت به نیستاتین معنی دار نبود که این امر نیز معرف ایجاد فعالیت ضد قارچ قابل قبول و نیز قابل مقایسه عصاره متانولی چای سیاه می باشد. در مقایسه نتایج مربوط به عصاره متانولی چای سبز و سیاه نیز شکل ۲ نشان می دهد که میانگین قطر هاله عدم رشد این دو عصاره برای غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم معنی دار نبود ولی غلظتهای ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر دیسک عصاره متانولی چای سیاه بترتیب با ایجاد هاله های ممانعت کننده با قطرهای ۳/۱±۲۳/۱۸، ۲/۵۳ ±۲۴/۸۷ و ۲/۰۸±۲۷/۳۱ فعالیت ضد قارچی قابل ملاحظه ای نسبت به عصاره متانولی چای سبز ایجاد نموده است (p<۰/۰۰۱).



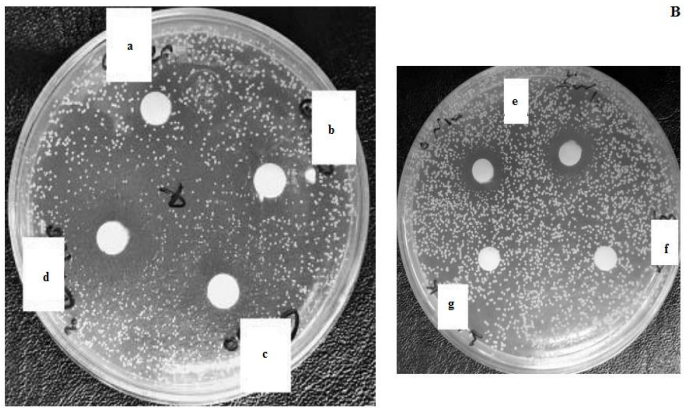
شکل۱. نمودار (A) و تصویر (B) میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از غلظت های مختلف عصاره متیلن کلرایدی برگ چای سبز و سیاه بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس در زمان ۲۴ ساعت از تاثیر دادن عصاره. مقادیر نمودارمیانگین±انحراف معیار هستند. تعداد آزمایش برای هر غلظت ۷ بوده است. دوز ۱۰۰ واحد نیستاتین بعنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.* معنی داری مقایسه عصاره چای و نیستاتین و # نیز وضعیت معنی داری مقایسه عصاره چای سبز و سیاه را نشان می دهد. ** و ## معنی داری در سطح p<۰/۰۱ و * نیز معنی داری در سطح p<۰/۰۰۱ را نشان می دهد. a و c بترتیب دوز۱ میلی گرم بر دیسک چای سیاه و سبز، b دیسک حاوی نیستاتین ۱۰۰ واحدی**



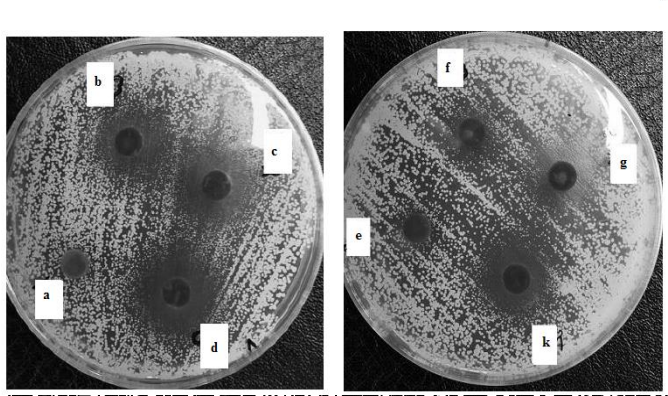
شکل۲. نمودار (A) و تصویر (B) میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از غلظت های مختلف عصاره متانولی برگ چای سبز و سیاه بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس در زمان ۲۴ ساعت از تاثیر دادن عصاره. مقادیر میانگین±انحراف معیار هستند. دوز ۱۰۰ واحد نیستاتین بعنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. * معنی داری مقایسه عصاره چای و نیستاتین و # نیز وضعیت معنی داری مقایسه عصاره چای سبز و سیاه را نشان می دهد. * و ### معنی داری در سطح p<0.001 را نشان می دهد.a، b،c و d دیسک حاوی غلظت های بترتیب ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم عصاره متانولی چای سیاه و e، f، g و k دیسک حاوی غلظت های بترتیب ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم عصاره متانولی چای سبز را نشان می دهند.**

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]

نتایج بدست آمده از تعیین اثرات ضد قارچی ۴۸ ساعت بعد، عصاره متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه در غلظتهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم بر دیسک در مقابل کاندیدا آلبیکنس در شکل ۳ نشان داده شده است. میانگین قطر ناحیه مهار حاصل از دوز ۱۰۰ واحدی نیستاتین بعنوان کنترل مثبت در زمان ۴۸ ساعت بعد ۰/۸۳±۱۴/۱۲ میلی متر بوده است. قطر ناحیه مهار غلظت ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم عصاره متیلن کلرایدی هر دو نوع چای ناچیز ولی در دوزهای ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم عصاره هر دو نوع چای توانستند تاثیر ضد قارچ زیادی بوجود آورند. در این غلظت ها تفاوت معنی داری میان خاصیت ضد قارچ عصاره متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه با نیستاتین ۱۰۰ واحدی وجود نداشت ($p>0/05$). از نظر مقایسه ویژگی ضد قارچ عصاره متیلن کلرایدی چای سبز و سیاه در زمان ۴۸ ساعت بعد از تاثیر دادن عصاره نیز در سه غلظت ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم بر دیسک میانگین قطر هاله عدم رشد تشکیل شده برای دو عصاره مشابه بوده و تفاوت آماری معنی داری نشان نداده اند (شکل ۳). شکل ۴ نمودار (A) و تصویر (B) نشانگر نتایج حاصل از تاثیر عصاره متانولی چای سبز و سیاه در غلظتهای ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر دیسک در برابر قارچ کاندیدا آلبیکنس در زمان ۴۸ ساعت بعد می باشد. عصاره متانولی هر دو نوع چای سبز و سیاه در غلظت ۲ میلی گرم با ایجاد هاله عدم رشد ناچیز (نزدیک صفر میلی متر) فاقد خاصیت ضد قارچی بود ولیکن در سایر دوزها اثرات ضد قارچی قابل ملاحظه ای بوجود آورده اند. خاصیت ضد قارچ عصاره متانولی چای سیاه وابستگی به غلظت نشان می دهد. میانگین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره متانولی چای سیاه در غلظت ۴ میلی گرم معادل ۱/۸±۱۲/۱ میلی متر بود که با افزایش غلظت عصاره به ۱۰ میلی گرم به ۲/۵±۱۹/۲۵ میلی متررسید که در مقایسه با دوز ۴ میلی گرم ($p<0/001$) و همچنین نیستاتین ۱۰۰ واحدی ($p<0/001$) معنی دار بوده است. اگر چه عصاره متانولی چای سبز در چهار غلظت ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم توانست خاصیت ضد قارچ قابل ملاحظه ای پدید آورد ولی با افزایش غلظت عصاره تفاوت آماری معنی داری در فعالیت ضد قارچ عصاره حاصل نشده است. در همه غلظتها عصاره متانولی چای سبز کمتر از نیستاتین ۱۰۰ واحدی خاصیت ضد قارچ ایجاد نموده است. از نظر مقایسه ویژگی ضد قارچ عصاره متانولی چای سبز و سیاه در زمان ۴۸ ساعت نیز شکل ۴ نشان می دهد که هر چند غلظت ۴ میلی گرم دو عصاره با ایجاد هاله ممانعت از رشد مشابه، فعالیت ضد قارچ یکسانی ایجاد نموده اند ولی در دوز های ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم تاثیر ضد قارچ عصاره متانولی چای سیاه بیشتر از چای سبز بوده است. قطر متوسط ناحیه مهار حاصل از عصاره متانولی چای سیاه در سه غلظت ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بترتیب ۱/۹±۱۴/۲۵، ۲/۰۷±۱۷/۴۲ و ۲/۵±۱۹/۲۵ میلی متر بوده است که در مقایسه با غلظتهای مشابهی از عصاره متانولی چای سبز با میانگین هاله بترتیب ۱/۰۶±۹/۸۵ ($p<0/001$)، ۰/۷±۱۰/۲۵ ($p<0/001$) و ۲/۱±۱۱/۴۲ ($p<0/001$) تفاوت معنی داری نشان داده است.



شکل۳. نمودار (A) و تصویر (B) میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از غلظت های مختلف عصاره متیلن کلرایدی برگ چای سبز و سیاه بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس در زمان ۴۸ ساعت از تاثیر دادن عصاره. مقادیر مینگین±انحراف معیار هستند. تعداد آزمایش برای هر غلظت ۷ بوده است. دوز ۱۰۰ واحد نیستاتین بعنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.a ۰/۴ میلی گرم چای سیاه، b=۰/۴ میلی گرم چای سبز، c= ۱ میلی گرم چای سیاه، d= ۱ میلی گرم چای سبز، e= نیستاتین ۱۰۰ واحدی، f=دیسک حاوی حلال، g=دیسک خالی



شکل ۴. نمودار (A) و تصویر (B) میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از غلظت های مختلف عصاره متانولی چای سبز و سیاه بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس در زمان ۴۸ ساعت بعد تاثیر دادن عصاره هستند. تعداد آزمایش برای هر غلظت ۷ بوده است. * معنی داری مقایسه عصاره چای و نیستاتین و # وضعیت معنی داری مقایسه عصاره چای سبز و سیاه را نشان می دهد. * و ### معنی داری در سطح $p<0.001$ را نشان می دهد. a ، b، c و d بترتیب دیسکهای حاوی ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم عصاره متانولی چای سیاه، e، f، g و k بترتیب دیسک های حاوی ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم عصاره متانولی چای سبز**

بحث و نتیجه گیری

عصاره های متیلن کلرایدی و متانولی چای سبز و سیاه تقریبا در همه غلظتها در ۲۴ ساعت نخست توانست تاثیر ضد قارچی قابل قبولی در مقایسه با نیستاتین

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]

بوجود آورد که این نتایج معرف اهمیت این نوشیدنی در پیشگیری و احتمالا درمان آلودگی های قارچی می باشد ولی بطور کلی با مقایسه یافته های دو نوع عصاره می توان نتیجه گیری نمود که عصاره متیلن کلرایدی هر دو نوع چای علیرغم اینکه در غلظتی معادل ۱۰ ٪ غلظت عصاره متانولی مورد استفاده قرار گرفت، موثرتر بوده است و حداکثر اثرات ضد قارچی عصاره متیلن کلرایدی چای سیاه نیز با غلظت ۱ میلی گرم به ازای هر دیسک آن حاصل شده است که این یافته به اهمیت تاثیر غلظت عصاره در ایجاد اثرات ضد قارچی آن دلالت می نماید. بر مبنای نتایج بدست آمده می توان چنین استدلال نمود که برگ هر دو نوع چای سبز و سیاه دارای مواد موثره ای است که قادرند از رشد کاندیدا آلبیکنس جلوگیری نمایند ولی احتمالا مقدار مواد موثره چای سبز و سیاه به روش پردازش و فرآوری برگ چای بستگی دارد، به علاوه نوع حلالی که برای عصاره گیری مورد استفاده قرار می گیرد نیز در استخراج مواد موثره حائز اهمیت زیادی است. در این راستا یافته ها نشان می دهند که کیفیت عصاره های طبیعی و اثربخشی آنها نه تنها به مدت ذخیره سازی و نگهداری آنها بلکه به محیط و نوع حلال مورد استفاده نیز بستگی دارد (۱۶).

بر اساس نتایج بدست آمده بنظر میرسد که حلال متیلن کلراید در استخراج مواد موثره ضد قارچ چای کارایی بهتری نشان می دهد. مطابق مطالعات غربالگری فیتوشیمیایی طیفی از ترکیبات شامل آلکالوئیدها، ساپونین ها، تانین ها، کاتچین و پلی فنول ها در برگ چای وجود دارند(۱۷) که برای تمامی این ترکیبات، خواص ضد میکروبی مطرح شده است. علاوه بر این کاتچین اپی گالو کاتچین گالیت (EGCG) موجود در چای نیز می تواند فعالیت ضد میکروبی بوجود آورد (۱۸). یافته های مطالعه ما نیز ایجاد اثرات ضد قارچ چای سبز و سیاه را تایید می نماید. علاوه بر مواد موثره ذکر شده، هر دو نوع چای سبز و سیاه حاوی مقادیر بالایی از کاتچین ها (catchins) و همچنین تیفلاوین‌ها (theaflavins) می باشد که این ترکیبات نیز اثرات بیواکتیو تجمعی و هم افزا بوجود می آورند(۱۹). ممکن است متیلن کلراید بتواند مقادیر بیشتر و نیز احتمالا انواع بیشتری از مواد موثره برگ چای را خارج نماید و از این طریق بواسطه تاثیر جمعی این مواد فعالیت ضد قارچی قویتری حاصل شده است. عصاره متانولی چای سبز در همه غلظت ها دارای خاصیت مهارکنندگی مشابهی بر کاندیدا آلبیکنس بوده است در حالیکه عصاره متیلن کلرایدی چای سبز ویژگی ضد قارچ وابسته به غلظت نشان داد. ممکن است بتوان نتیجه گرفت که با حلال متیلن کلراید احتمالا بدلیل تفاوت در قطبیت، مقدار و انواع بیشتری از مواد ضد قارچ از برگ چای سبز بیرون کشیده می شود. از نظر مقایسه اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی عصاره های چای سبز و چای سیاه نتایج ضد و نقیضی تاکنون گزارش شده اند. برخی مطالعات بر تاثیر ضد قارچ بیشتر چای سبز تاکید می نمایند ولی در مقابل برخی دیگر از مطالعات فعالیت ضد میکروبی بیشتری برای چای سیاه گزارش نموده اند. یافته های یک مطالعه نشان می دهد که محلول آبی چای سبز در مقایسه با چای سیاه تاثیر مهاری بیشتری بر استافیلوکوک طلایی مقاوم به متی سیلین بوجود آورد (۲۰) ولی در مقابل مطالعات دیگر نشان داده اند که عصاره چای سیاه نسبت به چای سبز تاثیر ضد میکروبی بیشتری بر باکتریهای روده ای انسان ایجاد می نماید(۲۱). در مطالعه ای دیگر نیز چای سیاه به عنوان یک عامل مفید و موثر جهت مقابله با باکتریهای روده ای پاتوژن مانند سالمونلا تیفی و ویبریون کلره معرفی شده است(۲۲). بطور مشابه در مطالعه ما نیز یافته ها نشان می دهند که چای سیاه نسبت به چای سبز تاثیر مهاری بیشتری بر رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس ایجاد می نماید که شاید بتوان این تاثیر مهاری بیشتر چای سیاه را به وجود مقادیر بیشتری از کافئین در آن نسبت داد. مقدار کافئین چای سیاه دو تا سه برابر چای سبز گزارش شده است. کافئین جزء مهمی از چای سیاه و سبز است که می تواند با ایجاد اثرات مهاری و ضد میکروبی چای مرتبط باشد (۲۳و۱۰). مشخص شده است که کافئین اثرات خود را از طریق مهار آنزیم های مورد نیاز سنتز DNA بوجود می‌آورد (۲۴). اینکه در مطالعه ما چای سیاه توانست بعنوان ضد قارچ قویتری عمل نماید شاید به این دلیل باشد که مواد موثره ای که در عصاره چای سبز وجود دارند به لحاظ شیمیایی ناپایدار هستند. بنابراین ممکن است در شرایط آزمایشگاه بخشی از فعالیت ضد قارچی این چای از بین رفته باشد. چای سبز حاوی کاتچین و پلی فنول های زیادی است که قادرند اثرات ضد میکروبی پدید آورند ولی این ترکیبات شدیدا نسبت به اکسیداسیون آسیب پذیر هستند(۲۵). البته چای سبز در طی روند فرآوری تخمیر نمی شوند که این امر می تواند به حفظ آنزیم های آن کمک نماید در حالیکه چای سیاه قبل از خشک شدن دستخوش روند تخمیر می شوند که می تواند برخی از ترکیبات فعال چای سیاه را تخریب نماید(۲۶و۲۰). بنابراین انتظار می رود که چای سیاه بخش بیشتری از مواد فعال خود را در طی فرآوری از دست بدهد و در نتیجه در مقایسه با چای سبز خاصیت ضد قارچ کمتری بروز دهد. اینکه در مطالعه حاضر چای سبز خاصیت ضد قارچ کمتری نشان داد شاید بدلیل حلالیت کمتر آن بهنگام تهیه محلول برای بدست اوردن غلظتهای مختلف آن باشد چرا که در حلال مطالعه نیز این اشکال در حل نمودن عصاره چای سبز بخوبی مشهود بود.

مقایسه یافته های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تاثیر دو نوع عصاره چای سبز و سیاه نیز نشان می دهند که اثرات ضد قارچ حاصله برای هر دو نوع عصاره هر دو نوع چای با گذشت زمان کاهش می یابد که این امر ممکن است معرف ناپایداری و یا کوتاه اثر بودن ترکیبات موثره آنها بوده باشد. احتمالا بدلیل ناپایداری شیمیایی ترکیبات در طی زمان و یا در شرایط ازمایشگاه بخشی از اثرات فارماکولوژیک ضد قارچ آن نیز از بین رفته است. البته این موضوع ممکن است با نیمه عمر کوتاه ترکیبات مزبور نیز مرتبط باشد. از طرفی در انسان بویژه افرادی که برای دریافت خدمات دندانپزشکی مراجعه می کنند آلودگی به قارچ کاندیدا آلبیکنس رایج است که این امر می تواند مشکلات متعددی را برای افراد مبتلا بوجود آورد. لذا علاوه بر رعایت تمهیدات و اصول بهداشتی مربوط به جلوگیری از آلودگی در حین پروتکل های دندانپزشکی می توان با استفاده از شیوه های موثرتر استخراج مواد ضد قارچ طبیعی و نیز با استفاده از حلالهای مناسب محلولهای ضد قارچ مناسبی تهیه نمود که به پیشگیری و کنترل و نیز احتمالا درمان کاندیدیازیس کمک نمایند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل و کلیه همکارانی که در انجام پروژه مزبور ما را یاری کرده اند، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]

The Comparison of Antifungal Effects of Methylene Chloride and Methanol Extracts of Green and Black Tea on Candida Albicans

M. Ashrafpour (PhD)[1], A.R. Ghorbani (DDS)[2], A.A. Sefidgar(PhD)[3], H.H. Kazemi (DDS)[4], A.A. Moghadamnia(PhD)[1], S. Kazemi (MSc)[1], M. Mazleghani (BSc)[3], M. Baradaran (PhD)[*1]

1. Cellular and Molecular Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran
2. Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran
3. Department of Mycology and Parasitology, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran
4. Department of Oral Diagnosis, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(5); May 2016; PP: 53-60.
Received: Sep 9th 2016, Revised: Sep 28th 2016, Accepted: Mar 2th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Background: Candidiasis is the most common fungal infection. Nystatin is often used to treating of candidiasis that creates the problem of drug resistance and side effects. Study was performed to determine the antifungal properties of black and green tea extracts against Candida albicans.

METHODS: To do this basic study, at first methylene chloride and methanolic extracts of green and black tea were prepared. Disk diffusion method and measuring the diameter of inhibition zone was used to determine anti-fungal extracts against Candida albicans. The methanolic extract at doses of 2, 4, 6, 8 and 10 mg and methylene chloride extracts with concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mg per disk were used and the results compared in 24 and 48 hours.

FINDINGS: Methylene chloride extracts of both type of tea create antifungal activity more than methanol extracts. The maximum antifungal activity 24 hours by a concentration of 1 mg hard methylene chloride extract was obtained and in this concentration with formation of zone inhibition 30.57±4.4 and 34.25±2.7 mm, respectively, for the methylene chloride extract of green tea and black more antifungal effect compared to Nystatin (20±1.06 mm) was established ($p<0.01$).

CONCLUSION: The results have shown that green and black tea leaf extract can create antifungal activity effects against Candida albicans as dose -dependent manner and is more effective in the first 24 hours than the 48 hours.

KEY WORDS: *Candida Albicans, Black tea, Green tea, Methanolic extract, methylene chloride extract*.

Please cite this article as follows:

Ashrafpour M, Ghorbani AR, Sefidgar AA, Kazemi HH, Moghadamnia AA, Kazemi S, Mazleghani M, Baradaran M. The Comparison of Antifungal Effects of Methylene Chloride and Methanol Extracts of Green and Black Tea on Candida Albicans. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(5):53-60.

* **Corresponding author: M. Baradaran (PhD)**
Address: Department of Physiology and Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran
Tel: +98 11 32229591
E-mail: baradaran81@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]

References

1.Giannini PJ, Shetty KV. Diagnosis and management of oral candidiasis. Otolaryngol clin North Am. 2011;44(1):231-40.

2.Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-Garcia F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, et al. Candida albicans: genetics, dimorphism and pathogenicity. Internat microbiol : OffJ Spanish Soci Microbiol. 1998;1(2):95-106.

3.Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in Candida albicans biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect imm. 2003;71(8):4333-40.

4.Avasthi S, Gautam AK, Bhadauria R.Antifungal activity of plant products against Aspergillus niger: A potential application in the control of a spoilage fungus. Biol Forum Inter J.2010;2(1)53-5.

5.Sen A, Batra A. Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: Melia azedarach L. Int J Curr Pharm Res. 2012;4(2):67-73.

6. Bonzi S, Somda I, Zida E, Sérémé P. In vitro Antifungal Activity of Various Local Plant Extracts in the Control of Phoma sorghina (Sacc.) Boerema et al. and Colletotrichum graminicola (Ces.) Wilson, as Sorghum Seed Mold Pathogen in Burkina Faso. Tropicultura. 2012;30(2):103-6.

7. Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. Asian Pacific J Trop Biomed. 2011;1(2):204-15.

8. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. Trend Food Sci Technol. 2000;11(4):152-60.

9. Jenabian N, Moghadamnia AA, Karami E, Mir A PB. The effect of camellia sinensis (green tea) mouthwash on plaque-induced gingivitis: a single-blinded randomized controlled clinical trial. Daru. 2012:20(1):39.

10. Yam T, Shah S, Hamilton-Miller J. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (Camellia sinensis), and of tea components. FEMS microbiology letters. 1997;152(1):169-74.

11.Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. Nutrit rev. 2000;58(1):1-10.

12. Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against Candida albicans. J Antimicrob Chemoth. 2004;53(2):225-9.

13. Kim SH, Lee LS, Bae SM, Han SJ, Lee BR, Ahn WS. Antimicrobial and antifungal effects of a green tea extract against vaginal pathogens. J Women's Med. 2008;1(1):27-28.

14. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Plant med. 1998;64(8):711-3.

15. Yuan JM, Gao YT, Yang CS, Yu MC. Urinary biomarkers of tea polyphenols and risk of colorectal cancer in the shanghai cohort study. Inter JCancer. 2007;120(6):1344-50.

16. Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MaJ, Lema JM. Antioxidant activity of extracts from Gevuina avellana and Rosa rubiginosa defatted seeds. Food Res Inter. 2001;34(2):103-9.

17. Mbata T, Debiao L, Saikia A. Antibacterial activity of the crude extract of Chinese green tea (Camellia sinensis) on Listeria monocytogenes. African J Biotechnol. 2008;7(10):1571-3.

18. Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Epigallocatechin gallate, a potential immunomodulatory agent of tea components, diminishes cigarette smoke condensate-induced suppression of anti-Legionella pneumophila activity and cytokine responses of alveolar macrophages. Clin diagnos labor immunol. 2002;9(4):864-71.

19. Pan M-H, Lai C-S, Wang H, Lo C-Y, Ho C-T, Li S. Black tea in chemo-prevention of cancer and other human diseases. Food Sci Hum Well. 2013;2(1):12-21.

20.Bakkir L. YrtammrK. In vitro and in vivo study of green and black tea antimicrobial activity on methicillin resistant staphylococus aureus. BasJVetRes. 2011;10(2):1-12.

21. Michalczyk M, Zawislak A. The effect of tea infusions on the proliferation of selected bacteria important for the human intestinal tract. Acta Sci Pol. 2008;7(1):59-65.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]

22. Mandal S, Pal NK, Saha K. nhibitory and killing activities of black tea (Camellia sinensis) extract against Salmonella enterica serovar Typhi and Vibrio cholerae O1 biotype El Tor serotype Ogawa isolates. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(2):115-21.
23. Esimone C, Okoye F, Nworu C, Agubata C. In vitro interaction between caffeine and some penicillin antibiotics against Staphylococcus aureus. Trop J Pharm Res. 2008;7(2):969-74.
24. Zelensky AN, Sanchez H, Ristic D, Vidic I, van Rossum-Fikkert SE, Essers J, et al. Caffeine suppresses homologous recombination through interference with RAD51-mediated joint molecule formation. Nucl Acid Res. 2013;41(13):6475-89.
25. Archana S, Abraham J. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. J App Pharma Sci. 2011;1(8):149-52.
26. Matsubara S, Shibata H, Ishikawa F, Yokokura T, Takahashi M, Sugimura T, et al. Suppression of Helicobacter pylori-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. Biochem Biophys Res Commun. 2003;310(3):715-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.5.8.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.5.53]