مقاله اصیل پژوهشی

بررسی اثرات ضدّ قارچی عصاره‌های متانولی و آبی برگ و پوست میوه گردو بر روی گونه‌های کاندیدا

پرهام ارجی[1]، علی ناصری[2]، حسن رخشنده[3]، محمد جواد نجف‌زاده[4]

چکیده

زمینه و هدف: ظهور گونه‌های قارچی مقاوم و نیز عوارض جانبی نسبتاً زیاد داروهای ضدّ قارچی، محققین را به گسترش روش‌های جدید درمانی بر ضدّ قارچها وادار می‌کند. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات ضدّ کاندیدایی عصاره‌های آبی و متانولی پوست میوه و برگ گردو (Juglans regia) بر روی گونه‌های مختلف کاندیدا بود.

روش تحقیق: در این مطالعه، با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط مایع (Broth Microdilution)، اثرات ضدّ قارچی عصاره‌های آبی و متانولی پوست میوه و برگ گردو بر ضدّ چهار گونـه کاندیدائی (کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزئی) مورد آزمایش قرار گرفت. گونه‌های قارچی مورد آزمایش، در مجاورت با غلظت‌های مختلف از این ترکیبات قرار داده شدند و حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد ((Minimum Inhibitory Concentration (MIC) و متعاقب آن حداقل غلظت کشندگی ((Minimum Fungicidal Concentration (MFC) هر یک از عصاره‌ها برای قارچ‌های مورد نظر به‌طور جداگانه تعیین شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست آمده، عصاره متانولی پوست میوه و برگ گردو، فعالیت ضدّ قارچی بر ضدّ گونه‌های کاندیدایی نشان داد. مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) عصاره‌های آبی و متانولی پوست میوه و برگ گردو برای گونه‌های کاندیدایی آزمایش‌شـده به‌ترتیب: در محـدوده 6/25- 50، 3/125- 25، 12/5- 50 و 3/125- 25 میلـی‌گرم در میلـی‌لیتـر به‌دست آمد. حـداقـل غلظت کشندگـــی (MFC) عصاره‌های متانولی پوست میوه و برگ گردو در محـدوده 6/25-25 میلـی‌گرم در میلـی‌لیتـر تعیین شد. عصاره آبی پوست میوه و برگ گردو تنها از طریق توقف رشد قارچ، اثرات ضدّ قارچی خود را اعمال نمود.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی پوست میوه و برگ گردو، دارای قابلیّت ضدّ قارچی بر روی گونه‌های کاندیدا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گردو؛ گونه‌های کاندیدا؛ عصاره آبی و متانولی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1394؛ دوره 22 (2): 115-124.

دریافت: 1393/06/06 **پذیرش: 1394/04/02**

[1] دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران؛

[2] نویسنده مسؤول؛ استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس: مشهد- بیمارستان امام رضا (ع)–آزمایشگاه مرکزی- بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی.

تلفن: 38547255 و 38022244 پست الکترونیکی: Naseria@mums.ac.ir

[3] مرکز تحقیقات فارماکولوژی و گیاهان دارویی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران؛

[4] استادیار،گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

مقدمه

امروزه، بروز بیماری‌های قارچی که در گذشته کمتر دیده می‌شدند، با توجه به وجود شرایط مستعدکننده بسیار زیاد، رو به افزایش است؛ به‌طوری که بیماری‌های مختلفی مانند: کاندیدیازیس، آسپرژیلوزیس، موکورومایکوزیس و ...، از جمله مشکلاتی هستند که بیماران دچار ضعف ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و روند بهبودی این بیماران را با مشکل مواجه می‌سازند (1). گونه‌های کاندیدا، عامل طیف گسترده‌ای از عفونت‌های گوناگونی هستند که از آن جمله می‌توان به عفونت‌های غشای مخاطی، سندرم‌های کاندیدیازیس جلدی و عفونت‌های کاندیدیازیس ارگان‌های حیاتی بدن اشاره نمود (2، 3).

از میان حدود 150گونه کاندیدا، کاندیدا آلبیکنس به‌علت دارابودن فاکتورهای بیماری‌زایی بیشتر، معمول‌ترین پاتوژن انسانی شناخته‌شده می‌باشد که بیش از 60درصد عفونت‌های کاندیدایی را به خود اختصاص می‌دهد. با این همه، بروز عفونت توسط گونه‌های دیگر از جمله: کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزئی نیز رشد فزاینده‌ای یافته است (4).

کاندیدا گلابراتا، به عوامل ضدّ قارچی آزولی به‌ویژه فلوکونازول مقاوم است؛ بنابراین متأسفانه عفونت‌های ناشی از این قارچ، همراه با میزان بالای مرگ و میر در بیماران دچار نقص ایمنی می‌باشد. یک مشکل عمده در ارتباط با عفونت‌های ناشی از کاندیدا گلابراتا، کنترل عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم می‌باشد. ریشه‌کنی و درمان کامل عفونت‌های علامت‌دار در بیشتر موارد مشکل است.

عوامل ضدّ قارچی آزولی که به‌طور موفقیت‌آمیزی برای درمان عفونت‌های ناشی از کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده قرار می‌گیرند، در مورد عفونت‌های ناشی از کاندیدا گلابراتا چندان رضایت‌بخش نیستند (5). مطالعات نشان داده‌اند که میزان مرگ و میر ناشی از عفونت با کاندیدا تروپیکالیس بیشتر از عفونت ناشی از کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که مقاومت به فلوکونازول در بین ایزوله‌های کاندیدا تروپیکالیس افزایش یافته است که این امر باعث پیچیده‌تر شدن عفونت ناشی از این ارگانیسم می‌گردد (6، 7).

با ظهور ویروس HIV و بیماری ایدز و متعاقب آن استفاده وسیع از فلوکونازول برای پیشگیری از بروز عفونت‌های قارچی در این بیماران، افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از کاندیدا کروزئی نیز نسبت به این دارو مشاهده شده است (8). صرف‌نظر از مقاومت این قارچ نسبت به داروی فلوکونازول، امروزه مواردی از کاهش حساسیت این قارچ نسبت به داروهای آمفوتریسین B و فلوسیتوزین نیز گزارش شده است (9).

عوارض جانبی بسیار زیاد داروهای ضدّ قارچی شیمیایی که در پاره‌ای از مواقع بسیار خطرناک می‌باشند، باعث شده است که پزشکان تا آنجایی که امکان دارد، از این داروها کمتر استفاده کنند (10). وجود چنین مسائلی باعث شده است که محققین و دانشمندان درصدد یافتن ترکیباتی باشند که اثرات بسیار خوب و عوارض جانبی کمتری داشته باشند. به‌همین منظور، تا به امروز مطالعات مختلفی بر روی اثرات دارویی گیاهان و استفاده از آنها به‌عنوان داروی جایگزین صورت گرفته است که گیاه گردو هم از این قضیه مستثنی نبوده است.

گیاه گردو با نام علمی *Juglans regia*، از راسته *Juglandales* و از خانواده *Juglandaceae* است. این خانواده متشکل از 7جنس و 59گونه می‌باشد. وجود ترکیبات مختلفی در پوست و به‌ویژه برگ گیاه گردو نظیر: تانن‌ها، ترکیبات نفتاکینونی (به‌ویژه Juglone) و مشتقات اکسیژنه نفتالن، فلاوونوئیدها (به‌ویژه Quercetin)، فنولیک‌اسیدها، روغن‌ها و اسیدهای چرب، سبب کاربرد گسترده اجزای مختلف این گیاه در طب سنتی شده است؛ با این حال عمده فعالیت ضدّ میکروبی و ضدّ قارچی این گیاه، به ترکیبات فنولیک و پلی‌فنولیک مشتق از این گیاه نسبت داده شده است.

در مطالعات مختلفی، اثر دارویی و ضدّ میکروبی گیاه گردو (Juglans regia) مورد بررسی قرار گرفته است (11-13). به‌طور مثال Oliveira و همکاران در مطالعه‌ای ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدّ میکروبی پوست گردو را در پرتغال مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آنها، باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی و قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و کریپتوکوکوس نئوفرمنس، حساسیت بیشتری نسبت به عصاره آبی پوست گردو نشان دادند (14). هدف از مطالعه حاضر نیز ارزیابی اثرات ضدّ کاندیدایی پوست میوه و برگ گیاه گردو (Juglans regia) در مقایسه با داروهای فلوکـونازول، کلوتریمازول و نیستاتین بر روی چهار گونـه کاندیدایی (کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزئی) به‌منظور دستیابی به ترکیب ضدّ قارچی جدید با عوارض جانبی کمتر بود.

روش تحقیق

این مطالعه، به‌منظور تعیین حساسیت سوش‌های استاندارد کاندیدا نسبت به عصاره‌های آبی و الکلی برگ و پوست میوه گردو و مقایسه با داروهای ضدّ قارچی رایج، به‌روش میکرودایلوشن در آزمایشگاه قارچ‌شناسی بیمارستان قائم دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام گرفت.

در این مطالعه، از روش استاندارد Broth Microdilution برای بررسی MIC داروهای نیستاتین، کلوتریمازول و فلوکونازول و عصاره‌های آبی و الکلی پوست میوه و برگ گیاه گردو استفاده گردید. مواد مورد مطالعه شامل برگ و پوست میوه گردو بود که در فصل تابستان از شهرستان بردسکن خراسان رضوی جمع‌آوری شدند و پس از تأیید هویّت، در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، در درجه حرارت اتاق و در شرایط سایه خشک شدند؛ سپس پودر شده و پودر به‌دست‌آمده، با روش خیساندن (Maceration) با دو حلال آبی و متانولی عصاره‌گیری شد و در نهایت توسط دستگاه روتاری (Rotary evaporator) در دمای 40درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش 70دور در دقیقه، عصاره حاصل تغلیظ شد که به‌مدت 24ساعت در دمای 37درجه انکوباتور شد و به‌صورت خشک تا زمان انجام تحقیقات در فریزر نگهداری گردید.

گونه‌های کاندیدایی مورد آزمایش شامل: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزئی تهیه‌شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بودند.

هر یک از گونه‌های کاندیدایی، در محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شده و به‌مدت 24ساعت در دمای 37درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. از کلنی‌های تازه و منفرد کاندیدایی رشدیافته در زیر هود و کنار شعله، توسط آنس استریل برداشت شد و در آب مقطر استریل سوسپانسیون گردید؛ سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر برای به‌دست آوردن تعداد 5×10^6 سلول مخمری در هر میلی‌لیتر، میزان عبور نوری (Transmittance) سوسپانسیون مخمری در طول موج 530نانومتر محاسبه گردید. میزان عبور نوری 61 تا 78 درصد نشان‌دهنده تعداد تقریبی 10^6 سلول مخمری می‌باشد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده رقیق‌سازی شد تا رقّتی معادل 10^5 سلول مخمری به‌دست آید. سپس رقّت سریال از عصاره‌های آبی و الکلی پوست میوه و برگ گردو و نیز داروهای فلوکونازول، کلوتریمازول و نیستاتین با استفاده از روش Broth Microdilution و محیط سابورو دکستروز براث در میکروپلیت‌های 96خانه‌ای تهیه شد. رقت‌های به‌دست آمده از عصاره‌های مورد نظر 50-0/02441 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در مورد داروها برای فلوکونازول 0/128-$6/25\times10^{-5}$، برای نیستاتین 2-$9/567\times10^{-4}$ و برای کلوتریمازول $3/9\times10^{-6}$- 0/008 بود. پس از تهیه رقت سریال و افزودن 100 میکرولیتر از سوسپانسیون فوق، میزان MIC هر یک از عصاره‌های گیاهی و داروها پس از 48ساعت

انکوباسیون میکروپلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، به‌صورت چشمی (Visual) مورد بررسی قرار گرفت و MIC آنها تعیین گردید. بر روی هر گونه کاندیدایی، آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند. به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC)، از هر یک از رقّت‌های عصاره‌های گیاهی و داروهای ضدّ قارچی که در آزمایش MIC، رشد در آنها صورت نگرفته بود، در محیط سابورو دکستروز آگار کشت سفره‌ای داده شد و بعد از طی زمان انکوباسیون در دمای 37درجهٔ سانتی‌گراد، کشت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی که در کشت مجدد هیچ رشدی در آن دیده نشد، به‌عنوان MFC برای هر یک از عصاره‌های مورد آزمایش و داروهای ضدّ قارچی ثبت گردید.

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (ویرایش 15) و با کمک آزمون‌های T-test زوج‌شده و ANOVA در سطح معنی‌داری کمتر از 0/05 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

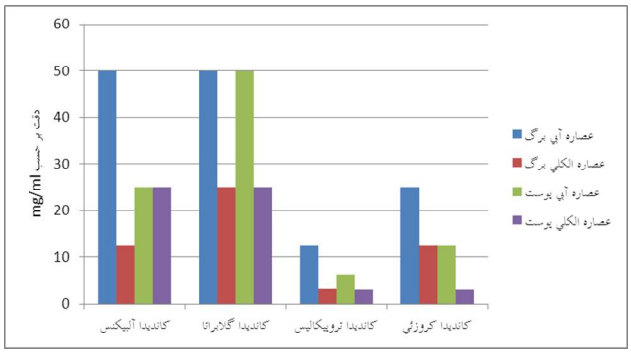
مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) فلوکونازول، کلوتریمازول، نیستاتین و عصاره‌های آبی و الکلی پوست میوه و برگ گردو در محیط کشت مایع برای گونه‌های کاندیدایی آزمایش‌شده، به‌ترتیب: در محدوده 0/032-0/001 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، 5×10^{-4} -$3/9\times10^{-6}$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و 1-$3/9\times10^{-3}$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، 50-6/25 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، 25-3/125 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، 50-12/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و 25-3/125 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمدند.

حداقل غلظت کشندگی (MFC) فلوکونازول، کلوتریمازول، نیستاتین و عصاره‌های الکلی پوست میوه و برگ گردو به‌ترتیب: در محدوده 0/032-0/001 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، 1×10^{-3}-$3/9\times10^{-6}$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و 1-$3/9\times10^{-3}$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، 25-6/25 میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

عصاره‌های آبی پوست میوه و برگ گردو، تنها از طریق توقف رشد قارچ اثرات ضدّ قارچی خود را اعمال می‌کنند. (جدول 1)(نمودار 1). بر اساس نتایج حاصل عصاره‌های متانولی پوست میوه و برگ گردو نسبت به عصاره‌های آبی تأثیر بیشتری بر روی گونه‌های کاندیدایی داشتند؛ به‌طوری‌که عصاره‌های آبی فقط قادر به مهار رشد قارچ‌ها بودند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0/05$).

جدول 1- نتایج MIC و MFC عصاره‌های گیاهی و داروها به‌روش رقیق‌سازی در محیط مایع بر روی گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

ترکیب	گونه کاندیدایی							
	کاندیدا آلبیکنس		کاندیدا گلابراتا		کاندیدا تروپیکالیس		کاندیدا کروزئی	
	MIC (mg)	MFC (mg)	MIC (mg)	MFC (mg)	MIC (mg)	MFC (mg)	MIC (mg)	MFC (mg)
عصاره آبی برگ گردو	50	-	50	-	12/5	-	25	-
عصاره الکلی برگ گردو	12/5	12/5	25	25	3/125	6/25	12/5	25
عصاره آبی پوست گردو	25	-	50	-	6/25	-	12/5	-
عصاره الکلی پوست گردو	25	25	25	25	3/125	6/25	3/125	6/25
داروی نیستاتین	$7/81\times10^{-3}$	$7/81\times10^{-3}$	1	1	$1/25\times10^{-1}$	$1/25\times10^{-1}$	$3/9\times10^{-3}$	$3/9\times10^{-3}$
داروی فلوکونازول	10^{-3}	10^{-3}	$3/2\times10^{-2}$	$3/2\times10^{-2}$	$1/6\times10^{-2}$	$1/6\times10^{-2}$	2×10^{-3}	2×10^{-3}
داروی کلوتریمازول	$3/9\times10^{-6}$	$3/9\times10^{-6}$	10^{-3}	5×10^{-4}	$1/25\times10^{-4}$	$1/25\times10^{-4}$	$3/9\times10^{-6}$	$3/9\times10^{-6}$



نمودار 1- MIC عصاره‌های آبی و الکلی برگ و پوست میوه گردو بر روی گونه‌های کاندیدا

نتایج نشان می‌دهند که حساس‌ترین گونه کاندیدایی نسبت به عصاره‌های آبی برگ و پوست گردو و الکلی برگ گردو، کاندیدا تروپیکالیس می‌باشد. در عصاره الکلی پوست گردو، دو گونه کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزئی حساس‌تر از دو گونه دیگر بوده‌اند. کاندیدا گلابراتا مقاوم‌ترین گونه و کاندیدا کروزئی حساس‌ترین گونه نسبت به داروی نیستاتین بودند. کاندیدا آلبیکنس نسبت به سایر گونه‌ها به فلوکونازول حساس‌تر بود؛ در حالی که کاندیدا گلابراتا مقاومت بیشتری از سایرین نسبت به این دارو نشان داد. همچنین کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزئی نسبت به دو گونه دیگر حساسیت بیشتری به کلوتریمازول داشتند؛ در حالی که کاندیدا گلابراتا مقاوم‌ترین گونه نسبت به این دارو بود.

بحث

مقایسه داده‌های به‌دست آمده از عصاره‌های الکلی و آبی با یکدیگر نشان دادند که عصاره‌های الکلی برگ و پوست میوه گردو در مقایسه با عصاره‌های آبی آنها، دارای اثرات ضدّ قارچی بهتری می‌باشند و میزان MIC آنها نیز از میزان MIC عصاره‌های آبی به‌نسبت پایین‌تر است. این موضوع نشان می‌دهد که مواد مؤثّره‌ای که دارای اثرات ضدّ قارچی می‌باشند، در الکل حلال‌تر از آب می‌باشند؛ بنابراین با تراکم بیشترِ مواد مؤثّر در عصاره الکلی، طبیعتاً اثر ضدّ قارچی بهتری از این عصاره‌ها مشاهده می‌شود.

در مطالعه Yigit و همکاران در سال 2009 ، اثرات ضدّ میکروبی عصاره آبی و متانولی برگ و پوست سبز گردو بر ضدّ باکتری‌ها و قارچ‌های مختلف، با استفاده از روش دیسک‌دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفت. این محققین از چهار گونه باکتری گرم منفی، دو گونه باکتری گرم مثبت و نیز قارچ‌های ژئوتریکوم کاندیدوم و هفت گونه مخمری استفاده نمودند.

بر اساس نتایج این مطالعه، میزان MIC عصاره متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو در سه گونه کاندیدایی شامل: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس، با یکدیگر برابر بود و معادل 1/25میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. همچنین میزان MIC عصاره آبی برگ و پوست سبز میوه درخت گردو نیز برای این سه گونه کاندیدایی برابر بود و این عصاره‌ها در رقّت 2/5میلی‌گرم در میلی‌لیتر، باعث مهار رشد قارچ‌های مورد بررسی شدند (15).

Noumi و همکاران در سال 2010 فعالیت ضدّ قارچی عصاره‌های متانولی، اتیل‌استاتی و استونی پوست گردو را بر ضدّ گونه‌های کاندیدایی در اسپانیا مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، هر سه عصاره، فعالیت ضدّ کاندیدایی نشان دادند؛ اما حساس‌ترین گونه، کاندیدا آلبیکنس بود. کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس فعالیّت ضعیف‌تری نسبت به سایر گونه‌های کاندیدایی نشان دادند. همچنین عصاره استونی، فعالیت ضدّ کاندیدایی ضعیف‌تری نسبت به دو عصاره دیگر داشت و عصاره اتیل‌استاتی بیشترین فعالیت را بر ضدّ کاندیدا آلبیکنس نشان داد. بر اساس نتایج حاصل، میزان MIC عصاره فوق در مورد گونه‌های آلبیکنس 3/125میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میزان MFC آن 12/5-6/25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (16).

در مطالعه Raaman و همکاران نیز در سال 2011، اثرات ضدّ میکروبی عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی پوست گردو بر ضدّ باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و

کاندیدا آلبیکنس مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره‌های مورد استفاده، فعالیت بیشتری بر ضدّ باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه اشرشیاکلی و پسودوموناآئروژینوزا نشان دادند؛ در حالی که تأثیر آنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت کمتر بود. عصاره هگزانی، فعالیت ضدّ باکتریایی بهتر و عصاره متانولی فعالیت ضدّ قارچی بهتری از خود نشان دادند (17).

در مطالعه حاضر همانند مطالعات انجام‌شده توسط سایر محققین، اثر ضدّ قارچی و به‌ویژه اثر ضدّ کاندیدایی عصاره‌های آبی و الکلی برگ و پوست گردو به اثبات رسید. اما مقایسه نتایج حاصل با دیگر مطالعات، در گزارش میزان MIC در مواردی همچون مطالعه Noumi مشابه و در برخی موارد تفاوت‌هایی نشان داد. به‌عنوان مثال، مقایسه نتایج به‌دست‌آمده برای گونه‌های کاندیدایی در این مطالعه با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه Yigit و همکاران، اختلافاتی را در نتایج MIC نشان می‌دهد. این محققین در بررسی خود میزان MIC عصاره‌های آبی و الکلی برگ و پوست گردو را برای سه گونه مخمر مورد نظر، کمتر گزارش نمودند. در صورتی که در مطالعه حاضر، میزان MIC عصاره‌های آبی برگ و پوست گردو به‌ترتیب: بین 12/5 تا 50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و 6/25 تا 50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نیز میزان MIC عصاره‌های الکلی برگ و پوست گردو بین 3/125 تا 25 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.

اختلاف در نتایج گزارش‌شده می‌تواند به عوامل مختلفی بستگی داشته باشد؛ به‌عنوان مثال، روش عصاره‌گیری از جمله زمان عصاره‌گیری که در مطالعه فوق طولانی‌تر بوده است، به‌نظر می‌رسد از جمله عواملی باشد که در تفاوت موجود بین نتایج این پژوهش با نتایج سایر مطالعات تأثیرگذار باشد (17، 18).

از دیگر مواردی که ممکن است در اختلاف نتایج مؤثر باشد، می‌توان به نوع سوش قارچی مورد مطالعه و اختلافات ژنتیکی احتمالی آنها با یکدیگر اشاره کرد. سوش‌های مختلف ممکن است دچار جهش‌های ژنتیکی شده و یا در سطح ژن، اختلافاتی با هم داشته باشند که این اختلافات در سطح ژن می‌تواند باعث بروز فنوتیپ‌های مختلف در آنها شود؛ بنابراین نوع سوش قارچی مورد استفاده در پژوهش‌های مختلف می‌تواند یکی از عوامل تأثیرگذار در اختلاف نتایج باشد (19).

علاوه بر این، شرایط محیط انجام آزمایش، مواد و ترکیباتی که برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار می‌گیرند، رعایت یا عدم رعایت شرایط بهینه آزمایش و در نهایت خطاهایی که در حین انجام کار توسط محقق رخ می‌دهد، می‌تواند در اختلاف نتایج مؤثّر باشد (20).

همچنین عواملی همچون ترکیبات خاک گیاه، شرایط آب و هوایی و جغرافیایی، شرایط کشت گیاه و روش آن، سن گیاه، اندام‌های گیاه، مرحله‌ی رویشی گیاه و زمان جمع‌آوری اجزای آن نیز می‌توانند در اختلاف نتایج گزارش‌شده در مطالعات مختلف، تأثیرگذار باشند (21-24).

بر اساس نتایج حاصل، میزان MIC داروی فلوکونازول، کلوتریمازول و نیستاتین به‌روش میکرودایلوشن برای قارچ‌های مورد نظر در محدوده‌ای به‌دست آمد که با MIC گزارش‌شده برای این داروها در مطالعات دیگر محققین مطابقت دارد که می‌تواند دلیلی بر صحّت روش انجام آزمایش در پژوهش حاضر باشد (25) .

زمانی که نتایج MIC عصاره‌های آبی برگ و پوست میوه گردو با هم مقایسه می‌گردد، مشاهده می‌شود که عصاره آبی پوست میوه گردو، اثرات ضدّ کاندیدایی به نسبت بهتری از عصاره آبی برگ گردو دارد. این موضوع می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد؛ احتمال دارد موادّی که دارای اثرات ضدّ قارچی هستند، در پوست میوه گردو بیشتر از برگ گردو باشند. همچنین در پوست میوه گردو، ترکیبات ضدّ قارچی وجود دارند که در آب محلول‌تر بوده و باعث می‌شوند که عصاره آبی پوست میوه گردو در مقایسه با عصاره آبی برگ آن، فعالیت ضدّ کاندیدایی بهتر و مؤثّرتری داشته باشد.

امروزه یکی از مشکلات اساسی در زمینه درمان

عفونت‌های کاندیدایی، بحث مقاومت دارویی گونه‌های کاندیدایی به‌ویژه گونه‌های گلابراتا و کروزئی نسبت به داروهای ضدّ قارچی مورد استفاده در درمان ضایعات ناشی این گونه‌ها می‌باشد (9). همان‌طور که در جداول 1 و 2 مشخص شده است، کاندیدا گلابراتا در مقایسه با سایر گونه‌های کاندیدایی نسبت به داروهای مورد استفاده در این تحقیق مقاوم‌تر می‌باشد. نتایج جداول 1 و 2 نشان می‌دهند که این قارچ نسبت به داروهای نیستاتین و فلوکونازول نیز مقاوم می‌باشد. با اثبات اثرات ضدّ قارچی عصاره‌های مورد استفاده و دستیابی به مواد مؤثّره آن در تحقیقات آینده، این امیدواری ایجاد شده است که بتوان به راهکاری برای درمان عفونت‌های کاندیدایی ناشی از این گونه و سایر گونه‌های مقاوم به درمان دست یافت.

نتایج MFC برای عصاره‌های آبی و الکلی نشان داد که عصاره‌های آبی تنها با توقف رشد قارچ، اثر ضدّ قارچی خود را اعمال نموده‌اند؛ در حالی که عصاره‌های الکلی به‌خصوص در مورد گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا، دارای مقدار MFC برابر با MIC بودند. این موضوع بیانگر آن است که این عصاره‌ها با کشتن قارچ در رقّت‌های مؤثّره، اثر ضدّ قارچی خود را اعمال می‌نمایند.

آنچه به‌نظر می‌رسد این است که مواد مؤثّره‌ای که دارای فعالیت ضدّ قارچی هستند، در دو نوع عصاره آبی و الکلی یکسان نمی‌باشند. با توجه به نتایج حاصل، امکان وجود بعضی ترکیبات ضدّ قارچی مشترک بین آنها که هم توانایی حل‌شدن در آب و هم محلول در الکل باشند، کاهش می‌یابد. با انجام مطالعات کامل‌تر می‌توان مواد و ترکیبات موثّره را از این عصاره‌ها جدا نمود و به بررسی اثرات ضدّ قارچی هر یک از آنها پرداخت.

براساس نتایج به‌دست آمده، میزان MIC عصاره‌های الکلی از عصاره‌های آبی بهتر بوده و فعالیت ضدّ قارچی بهتری در مقایسه با عصاره‌های آبی نشان داده‌اند. از طرفی عصاره‌های الکلی دارای اثرات قارچ‌کشی می‌باشند؛ در حالی که عصاره‌های آبی، اثرات متوقف‌کنندگی رشد قارچ را دارند؛ بنابراین احتمالاً عصاره‌های الکلی می‌توانند در مقاصد درمانی مؤثّرتر باشند. زیرا اثر قارچ‌کشی، در درمان بهتر و سریع‌تر عفونت قارچی، نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. به‌عنوان مثال یکی از مشکلات استفاده از داروی گریزئوفولوین- دارویی که در درمان عفونت‌های درماتوفیتی به‌کار می‌رود- عدم اثر قارچ‌کشی آن است که درمان با این دارو را طولانی‌مدت می‌نماید.

نتیجه‌گیری

اثبات فعالیت ضدّ قارچی عصاره پوست و برگ گردو بر روی قارچ‌های مورد نظر، این امیدواری را ایجاد نمود تا بتوان این گیاه یا ترکیبات آن را به‌عنوان یک داروی ضدّ قارچی مناسب با عوارض جانبی احتمالی کمتر مدّ نظر قرار داشت و با انجام تحقیقات بیشتر به‌عنوان جایگزینی برای داروهای ضدّ قارچی با عوارض قابل توجه مورد استفاده قرار داد. انجام تحقیقات بیشتر روی طیف وسیع‌تـری از قارچ‌ها و متعاقب آن تحقیق در نمونه‌های بالینی و بیماران مبتلا به عفونت‌های قارچی، از جمله موارد اصلی برای نیل به این هدف خواهد بود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد با کد 901074 و پایان‌نامه دانشجویی مقطع دکتری حرفه‌ای داروسازی می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه این معاونت و پرسنل محترم بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی بیمارستان قائم (عج) به‌ویژه آقایان مسعود مرجانی و محمدعلی قنبری و همچنین آقای محسن جعفری، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

1- Merz WG, Hay RJ. Microbiology and microbial infection, Medical Mycology. 10th ed. Edward Arnold: Topley & Wilson; 2005.

2- Aldana-Valenzuela C, Morales-Marquec M, Castellanos-MartinezJ, Deanda-Gómez M. Congenital candidiasis: a rare and unpredictable disease. J Perinatol. 2005; 25(10): 680-2.

3- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis. Clin Infect Dis. 2009; 48(5): 503-35.

4- Olson JA, Adler-Moore JP, Smith PJ, Proffitt RT. Treatment of Candida glabrata infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(12): 4895-902.

5- Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. albicans. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(1): 80-96.

6- Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA; FIMUA–ECMM candidaemia study group. The European Confederation of Medical Mycology ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans Candida isolates from blood. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(4): 679-82.

7- Yang YL, Ho YA, Cheng HH, Ho M, Lo HJ. Susceptibilities of Candida species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in Candida tropicalis. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004; 25(1): 60-4.

8- Samaranayake YH, Samaranayake LP. Candida krusei: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. J Med Microbiol. 1994; 41(5): 295-310.

9- Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year Analysis of Susceptibilities of Candida and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. J Clin Microbiology.2005; 43(12): 5848-59.

10- Emami A, Ahi A. [Medicinal botany]. Tehran: Iran University of Medical Sciences press; 2008.

11- Wichtl M, Bisset NG. Herbal Drugs and phytopharmaceuticals. 3th ed. Stuttgart, Germany: Medpharm GmbH; 1994.

12- Buttery RG, Flath RA, Mon TR, Ling LC. Identification of germacrene D in walnut and fig leaf volatiles. J Agric Food Chem. 1986; 34(5): 820-2.

13- Thakur A. Juglone: A therapeutic phytochemical from Juglans regia L. J Med Plant Res. 2011; 5(22): 5324-30.

14- Oliveira A, Sousa A, Ferreira I, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut(juglans regia l.) green huks. Food Chem Toxicol. 2008; 46(7): 2326-31.

15- Yigit D, Yigit N, Aktas E, Ozgen U. Antimicrobial activity of walnut (Juglans regia l.). Türk Mikrobiyal Cem Derg. 2009; 39(1-2): 7-11. [Turkish]

16- Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of Salvadora persica and Juglans regia L.extracts against oral Candida strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010; 29(1): 81-8.

17- Raaman N, Mathiyazhagan K, Jegadeesh R, Divakar S, Vennila S, Balasubramanian K. Antimicrobial activities of different organic extracts on nul shells of Juglans regia (walnut). Herbal Tech Industry. May 2011; 8: 20-22

18- United Nations Industrial Development Organization, Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste, Italy: Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies; 2008.

19- Falahati M, Fateh R, Sharifynia S, Kanani A, Memar A, Hashem Dabbaghiyan F. Anticandidal effects of shallot extracts against chronic candidiasis agents. Razi Journal Of Medical Sciences. 2012; 19(100):22-28. [Persian]

20- Cichewicz RH, Thorpe PA. The antimicrobial properties of chile peppers (Capsicum species) and their uses in Mayan medicine. Ethnopharmacol J. 1996; 52(2): 61-70.

21- Aiyegoro OA, Okoh AI. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of Helichrysum pedunculatum. Int J Mol Sci. 2009; 10(11): 4990-5001.

22- Shahraki MR, Miri Moghadam E, Palan MJ. The survey of Teucrium Polium toxicity effect on liver and serum lipoproteins in normoglycemic male rats. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2006; 8(3): 227-32. [Persian]

23- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 1991; 30(12): 3875-83.

24- Ellabib MS, ElJariny IA. In vitro activity of 6 antifungal agents on candida species isolated as causative agents from vaginal and other clinical specimens. Saudi Med J. 2001; 22(10): 860-3.

25- Hazen K, Baron E, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Sousa A, Palacio AD, Bedout C, Gibbs DL. Comparison of the Susceptibilities of Candida spp. to Fluconazole andVoriconazole in a 4-year Global Evaluation Using Disk iffusion. J Clin Microbiol. 2003; 41(12): 5623-32.

Abstract *Original Article*

Investigation of antifungal activity of methanol and aqueous extracts of walnut *(Juglans regia)* leaves and peel against candida species

Parham Arji[1], Ali Naseri[2], Hassan Rakhshandeh[3], Mohammad Javad Najafzadeh[4]

Background and Aim: The occurrence of fungal species resistant to antifungal drugs and also their numerous side-effects have persuaded researchers to work on new therapeutic methods. The aim of the present study was to assess anticandidal activities of aqueous and methanol. extracts of walnut fruit, peel, and leaves on different Candida species.

Materials and Methods: In the current study, antifungal effects of aqueous and methanolic extracts of fruit peel and leaves of walnut (Juglans regia) against four Candida species (Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis and Candida krusei) were examined using broth microdilution method. The tested fungal species were associated with different concentrations of the plant extracts , and then, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of these extracts were obtained for tested Candida species.

Results: Both aqueous and methanol extracts of fruit peel .and leaves of walnut showed antifungal effects against candida species. The MIC_S of fluconazole, clotimazole, nystatin and aqueous and methanol extracts of fruit peel and leaves of walnut for different Candida species were 6.25-50, 3.125-25, 12.5-50 and 3.125-25 mg/ml, respectively.

MFCs of methanol extracts of fruit peel and leaves of walnut were 6.25-25 mg/ml. The aqueous extracts of fruit peel and leaves of walnut were without fungicidal effects only through inhibiting fungal growth.

Conclusion: It was found that methanol extracts of walnut leaves and peels contain compounds with thrapeutic potential against candida species and it looks promising that some effective antifungal agents with minimal side effects from walnut leaves and pills extract can be obtained in the future.

Key Words: Candida; walnut (Juglans regia); Aqueous and methanol extracts

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2015; 22 (2): 115-124.

Received: August 28, 2014 Accepted: June 23, 2015

[1] *Doctor of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran;*
[2] *Corresponding Author; Assistant professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran Naseria@mums.ac.ir*
[3] *Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, department of Pharmacology, faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran;*
[4] *Assistant professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*