مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۸۵، صفحات ۲۰۱ تا ۲۰۵

Original Article

بررسی اثر پوست سبز گردو در جلوگیری از رشد قارچ‌های میکروسپوروم کانیس، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، اپیدرموفایتون فلوکوزوم، آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس به روش Broth Dilution

فیروزه سلامت[۱]، سوگل کیوانی[۱]، دکتر مسعود امامی[۲]، دکتر غلامرضا امین[۳]، پروانه عدیمی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاداسلامی، واحد تهران شمال
[۲] استاد، گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد پزشکی تهران
[۳] دانشیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۴] مربی، گروه قارچ شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحدپزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *از آنجایی که اثر پوست سبز گردو بر روی رشد قارچ‌ها تا کنون بطور علمی به اثبات نرسیده و به علت وجود برخی اثرات جانبی نامطلوب داروهای سنتتیک، در این مطالعه اثر پوست سبز گردو در جلوگیری از رشد قارچ‌های مختلف از جمله درماتوفیت‌ها به منظور جایگزین کردن یک داروی گیاهی به جای داروهای شیمیایی بررسی شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، پوست سبز گردو از استان مازندران گردآوری و پس از خشک شدن در سایه، آسیاب شد. از پودر خشک پوسته سبز گردو با حلال متانل و با روش پرکولاسیون عصاره‌گیری شد و عصاره بدست‌آمده با رقت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۳۷، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر فرکشن شده و به روش Broth Dilution طبق پروتکل NCCLS M-27A بر روی سوسپانسیون قارچی اثر داده و MIC آن تعیین شد. سپس جهت تعیین MBC لوله‌های محتوی رقت‌های مختلف عصاره و سوسپانسیون قارچی بر روی محیط PDA کشت داده شدند.*

یافته‌ها: *فرکشن ۱۲۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر رشد اپیدرموفایتون فلوکوزوم و ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، فرکشن ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد میکروسپوروم کانیس و فرکشن ۴۵۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر رشد کاندیدا آلبیکنس را متوقف کرد. آسپرژیلوس نایجر به همه رقت‌ها مقاومت نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *در این مطالعه، عصاره متانلی پوست سبز گردو بر روی چهار گونه از قارچ‌های انتخاب شده اثر بازدارندگی داشته و به میزان ۶۰٪ باعث توقف رشد قارچ‌ها می‌شود.*

واژگان کلیدی: *پوست گردو، قارچ، درماتوفیت، اثر مهار کنندگی.*

مقدمه

گردو از تیره Juglandaceae و نام علمی آن Juglans regia است. این گیاه از قدیم به‌عنوان گیاهی دارویی مورد استفاده قرار گرفته و افراد بومی روستاهای کشور بر این باورند که پوست سبز اطراف گردو خاصیت ضد قارچی دارد (۱، ۲). از آنجایی‌که این فرضیه تاکنون به طور علمی به اثبات نرسیده و هم‌چنین به‌علت شیوع روزافزون بیماری‌های قارچی بویژه در جوانانی که در مناطقی با سطح بهداشت پایین زندگی می‌کنند، در صدد برآمدیم اثر ضد قارچی پوست سبز گردو را بر روی قارچ‌های مختلف بررسی کنیم تا در صورت اثبات این نظریه بتوان از این گیاه جهت درمان ضد قارچ استفاده کرد (۳).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان.شریعتی، بعد از پل صدر، خیابان میرزاپور، کوچه.۳۷، فیروزه سلامت (**email**: firoozeh_salamat@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۲/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۹/۲۰

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-10-12]

انتخاب قارچهای مورد بررسی بر اساس شیوع بیماری‌های قارچی در ایران بود. بر این اساس، کلیه قارچهای مورد آزمایش از بیماران مراجعه کننده به بخش آزمایشگاه قارچشناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران جدا شدند. قارچهای مورد بررسی در دو دسته ساپروفیت و پاتوژن قرار داشتند. از قارچهای ساپروفیت کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر و از قارچهای پاتوژن درماتوفیت‌های شایع ایران شامل اپیدرموفایتون فلوکوزوم، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و میکروسپوروم کانیس (از هر نمونه یک عدد) که عفونت‌های قارچی پوست و ضمائم آن یا کچلی‌ها را ایجاد می‌کنند، انتخاب شدند (۵،۴).

مواد و روشها

دراین پژوهش تجربی، هدف ما بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های متانلی و N- هگزانی تهیه شده از پوسته سبز گردو بر روی ۵ گونه قارچی نام‌برده و تعیین حداقل رقت مهار کننده (MIC) هر عصاره برای هر یک از قارچهای تحت بررسی بود.

پس از خشک کردن پوست سبز گردو در شرایط تاریکی، عصاره‌گیری به‌روش پرکولاسیون و با حلال‌های متانل و N- هگزان انجام گرفت. سپس عصاره‌های بدست آمده در رقت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۳۷، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر فرکشن شدند (۲). جهت تهیه سوسپانسیون قارچی، قارچها در لوله‌های اسلنت حاوی محیط SDA کشت داده شده و سپس برای درماتوفیت‌ها کشت چهار روزه، آسپرژیلوس نایجر کشت هفت روزه و کاندیدا آلبیکنس کشت یک روزه آن استفاده شد (۵). سطح محیط کشت با آب مقطر استریل شسته شده و سوسپانسیون آبی قارچها در Transmission ۷۰-۶۵ با دستگاه اسپکتروفوتومتر جهت انجام مراحل بعدی آزمایش تنظیم شد (۶،۷).

به منظور بررسی اثر عصاره پوست سبز گردو بر روی قارچهای مورد نظر، از روش Broth Dilution و طبق پروتکل M-38 A، NCCLS استفاده شد (۷). بدین صورت که قارچهای درماتوفیت و آسپرژیلوس نایجر به محیط مایع غنی‌کننده RPMI 1640 و کاندیدا آلبیکنس به محیط SD Broth تلقیح و سپس رقت‌های مختلف از عصاره متانلی پوست سبز گردو به مقدار ۰/۱میلی‌لیتر به سوسپانسیون قارچی اضافه شدند (۸،۹). Transmission تمام لوله ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر پس از تلقیح عصاره و پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۵°c خوانده و تغییرات Transmission قبل و بعد از انکوباسیون مقایسه شد (۵).

پس از تعیین MIC، جهت حصول اطمینان از جوابهای بدست آمده و تعیین MBC (حداقل رقت باکتری‌کش) احتمالی از لوله های مورد بررسی درمحیط کشت غنی PDA کشت داده شدند و نتایج پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۵°c مورد بررسی قرار گرفت (۹). جهت تفسیر نتایج و مقایسه اثر ضدقارچی عصاره متانلی پوسته سبز گردو از کلوتریمازول به‌عنوان شاهد عدم رشد استفاده شد (۳).

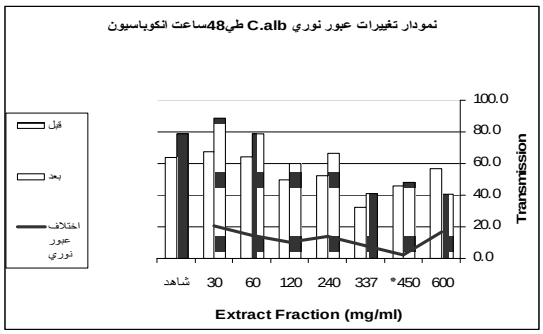
یافته‌ها

با بررسی تغییرات Transmission قبل و بعد از انکوباسیون، لوله ها به سه دسته تقسیم شدند. لوله‌هایی که در آنها افزایش Transmission مشاهده شد و عصاره موجود در آن مانع رشد قارچ شد، لوله‌هایی که Transmission در آنها تغییر محسوسی نداشته و رشد قارچ مهار شده و لوله‌هایی که Transmission در آنها کاهش یافته یعنی رشد قارچ باعث افزایش کدورت شده است.

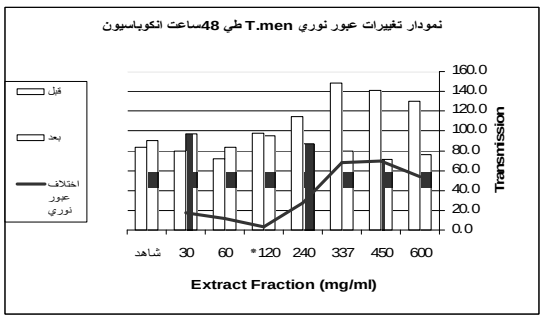
کاندیدا آلبیکنس در رقت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰و ۲۴۰ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر رشد کرد (شکل ۱). نمودار ۱ تغییرات کدورت لوله‌های حاوی مخمر کاندیدا آلبیکنس با MIC در رقت ۴۵۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر را نشان می‌دهد و MBC آن در رقت ۳۳۷ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر تعیین شد. MBC این قارچ نیز در رقت ۴۵۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر به‌دست آمد. قارچهای ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم در رقت‌های ۳۰ و۶۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر رشد کردند (شکل۲ و ۳). در نتیجه MBC در ۱۲۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر تعیین شد. نمودار ۲ و۳ به ترتیب تغییرات کدورت لوله‌های محتوی قارچهای ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم را نشان می‌دهد. MBC این دو قارچ در رقت ۴۵۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر بود. میکروسپوروم کانیس در رقت ۳۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر رشد کرد و MBC آن در رقت ۶۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر تعیین شد. MIC میکروسپوروم کانیس نیز در رقت ۱۲۰ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر بدست آمد (نمودار ۴). عصاره متانلی پوست سبز گردو باعث توقف رشد قارچهای اپیدرموفایتون فلوکوزوم، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، میکروسپوروم کانیس و کاندیدا آلبیکنس می‌شود (نمودارهای ۴-۱). درمورد آسپرژیلوس نایجر تنها مهار رشد و کند شدن مرحله اسپورزایی مشاهده شد (نمودار ۵).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-10-12]

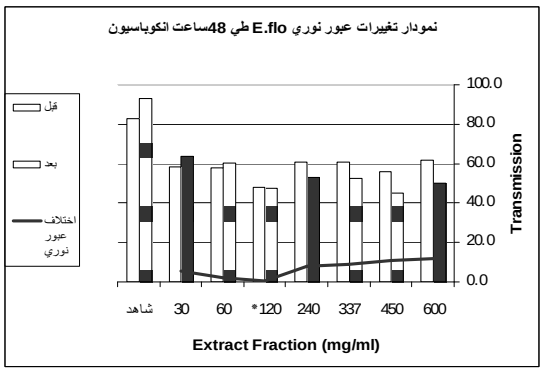
نمودار۱-تغییرات عبور نوری کاندیدا آلبیکانس(C.alb) طی ۴۸ ساعت انکوباسیون



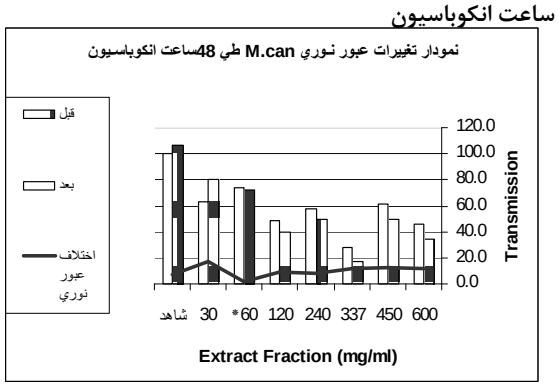
نمودار۲- تغییرات عبور نوری ترایکوفایتون منتاگروفایتیس



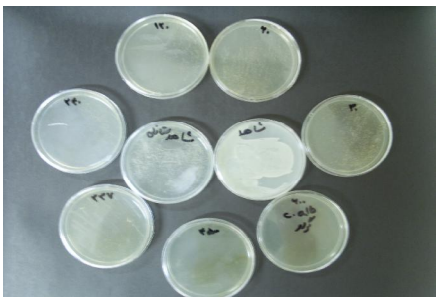
نمودار۳- تغییرات عبور نوری اپیدرموفایتون فلوکوزوم (E.flo) طی ۴۸ ساعت انکوباسیون



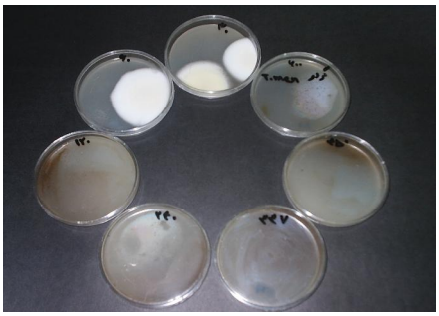
نمودار ۴- تغییرات عبور نوری میکروسپوروم کانیس (M.can) طی ۴۸ ساعت انکوباسیون



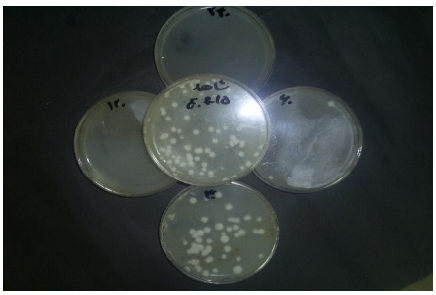
شکل ۱- نحوه رشد کاندیدا آلبیکانس در رقت های مختلف (عدم رشد در ۴۵۰ و۶۰۰ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده میشود)



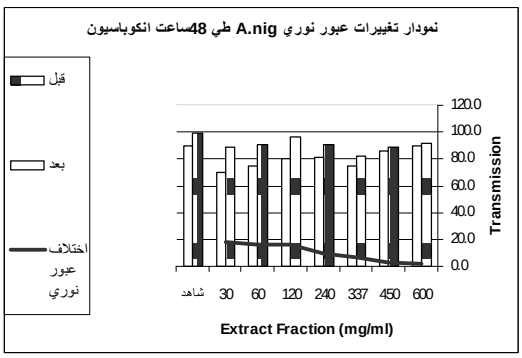
شکل ۲- نحوه رشد ترایکوفایتون منتاگروفایتیس در رقتهای مختلف (رشد در ۳۰ و۶۰ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده میشود.)



شکل ۳- نحوه رشد اپیدرموفایتون فلوکوزوم در قت های مختلف (رشد در ۳۰ و۶۰ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده میشود)



نمودار ۵ – تغییرات عبور نوری آسپرژیلوس نایجر (A.nig) طی ۴۸ ساعت انکوباسیون



[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-10-12]

بحث

از آنجایی‌که در اثر رشد قارچ، Transmission لوله‌ها به علت افزایش کدورت کاهش می‌یابد، در نتیجه با مقایسه Transmission نمونه اولیه و نمونه حاصل از انکوباسیون ۴۸ ساعته می‌توان رشد قارچ در لوله‌ها را نشان داد. کاهش Transmission به این معنی است که قارچها رشد کرده و عصاره اثر مهاری روی رشد نداشته است. در صورت عدم تغییر و ثابت ماندن Transmission، عصاره رشد قارچ را مهار کرده و اگر Transmission افزایش یابد عصاره در آن غلظت خاص قارچ را از بین برده است.

MIC کمترین غلظت ماده ضد قارچی است که از رشد میکروارگانیسم به‌صورتی که با چشم نتوان دید، ممانعت می‌کند. در این مطالعه رشد نمونه‌ها جهت تعیین MIC با رشد شاهد کنترل مقایسه شد. لوله‌ای که ۵۰٪ کدورت لوله شاهد را داشته باشد، لوله MIC است (۵). بدین ترتیب رقت‌ها به ۵ دسته طبقه‌بندی می‌شوند (۵):

۱.توقف رشد.

۲.رشد ضعیف یا ۲۵٪ از رشد شاهد کنترل.

۳.رشد متوسط یا ۵۰٪ از رشد شاهد کنترل.

۴.کاهش رشد به مقدار کم یا ۷۵٪ از رشد شاهد کنترل.

۵.عدم توقف در رشد.

Ali –Shtayeh و همکاران در ۱۹۹۹ در فلسطین، عصاره آبی گیاه گردو را از لحاظ داشتن خاصیت ضد قارچی و تعیین MIC بر روی ۹ سویه درماتوفیت میکروسپوروم کانیس، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و ترایکوفایتون ویولاسئوم بررسی کردند. در این مطالعه، عصاره Juglans regia رشد میکروسپوروم کانیس و ترایکوفایتون ویولاسئوم را بطور کامل متوقف کرد (۹). این نتایج با نتایج حاصل از آزمایش‌های فوق که بر روی ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و میکروسپوروم کانیس با عصاره متانلی پوسته سبز گردو انجام شد، مطابقت دارد. با توجه به اینکه ما از عصاره متانلی به جای عصاره آبی استفاده کردیم و MIC بدست آمده طی آزمایشهای ما برای هر دو قارچ ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و میکروسپوروم کانیس ۱۲۰mg/ml بود ، می توان نتیجه گرفت که احتمالاً ترکیبات ضد قارچی موجود در پوست سبز و برگ گردو در عصاره آبی بیشتر از عصاره متانلی می باشد. هم‌چنین این تغییر در عدد MIC می تواند به علت شرایط آب و هوایی متفاوت، شرایط متفاوت رشد گیاه، بومی بودن گردو و سوش‌های مختلف قارچی باشد.

شهلا شادزی و دکتر فریبرز معطر در سال ۱۳۶۹ در ایران عصاره هیدروکربنی پوست و برگ گردو را با غلظت‌های مختلف بر روی برخی از قارچهای ساپروفیت، مخمرها و درماتوفیت‌ها در کنار شاهد اثر دادند. آنها نشان دادند که در مورد درماتوفیت‌ها، حداقل غلظت بازدارنده عصاره هیدروالکلی پوست گردو ۲۰٪ و برگ گردو ۲۲/۵٪ می‌باشد. هم‌چنین تاثیر حداقل غلظت بازدارنده بر مخمرها ۸۷/۵-۵۵٪ و در مورد نوکاردیا برازلینسیس ۱۲/۵-۷/۵٪ است (۱۰). آنها نشان دادند که عصاره بر روی کلیه درماتوفیت‌ها و قارچهای بررسی شده، اثر قاطع ضد قارچی دارد ولی اثر آن بر قارچهای ساپروفیت چشمگیر نیست، به‌طوری‌که برخی از قارچهای ساپروفیت در غلظت‌های بالای عصاره نیز رشد نمودند. بر طبق نتایج آنها، حساس‌ترین درماتوفیت‌ها نسبت به عصاره‌ها، ترایکوفایتون شون‌لاینی، ترایکوفایتون ویولاسئوم، ترایکوفایتون وروکوزوم و ترایکوفایتون تونسورانس بودند (۱۰) .

با توجه به این که ما در این بررسی از عصاره متانلی بجای هیدروالکلی استفاده کردیم و به‌علاوه قارچهای مورد آزمایش در بررسی ما با آنها متفاوت می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره متانلی پوست سبز گردو نیز اثر ضد قارچی مشابهی با عصاره هیدروکربنی آن دارد. هم‌چنین می‌توان گفت که این اثر ضد قارچی بر روی ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفایتون فلوکوزوم و کاندیدا آلبیکنس تقریباً مشابه با اثر ضد قارچی بر روی ترایکوفایتون شون لاینی، ترایکوفایتون ویولاسئوم، ترایکوفایتون وروکوزوم، ترایکوفایتون تونسورانس و تریکوسپورون بژلی می‌باشد. همچنین درمورد قارچ ساپروفیت نیز همانند مطالعه ذکر شده فعالیت ضد قارچی موثری مشاهده نشد.

بطور کلی با مقایسه اثرات عصاره پوست سبز گردو بر روی قارچهای مختلف مشخص شد که اثر عصاره بر روی توقف رشد درماتوفیت‌ها بسیار بیشتر از سایر قارچها است. البته لزوم انجام آزمایش‌های بیشتر بر روی قارچهای دیگر به‌ویژه سوش‌های دیگری از درماتوفیت‌های مذکور جهت حصول اطمینان به اثر ضد قارچی پوست سبز گردو وجود دارد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این بررسی ما توانستیم اثر ضد قارچی پوست سبز گردو را که تا کنون کاربرد سنتی داشته، بطور علمی به اثبات برسانیم. البته جهت کاربرد بالینی این گیاه نیاز به کارآزمایی بر روی بیماران است.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-10-12]

REFERENCES

۱. .زرگری ع. گیاهان دارویی. جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ چهارم، سال ۱۳۷۹.

۲. روستاییان م. عصاره های گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول، سال ۱۳۸۱.

3. Pujol I, Capilla J, Fernández-Torres B, Ortoneda M, Guarro J. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. J Clin Microbiol 2002;40(7):2618-21.

4. Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasan I, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. J Clin Microbiol 2000;38(1):341-44.

5. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. J Clin Microbiol 2000;38(9):3359-61.

6. Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, Woestenborghs F, Baert L, Massart DL, et al. Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. J Antimicrob Chemother 2001;48(2):163-77.

7. Fernández-Torres B, Carrillo AJ, Martín E, Del Palacio A, Moore MK, Valverde A, et al. In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(9):2524-28.

8. Ghannoum MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Rinaldi MG, Lee-Yang W, et al. Intra- and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. J Clin Microbiol 2004;42(7):2977-79.

9. Ali-Shtayeh MS, AbuGhedib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. Mycoses.1999;42(11):665-72.

۱۰. شادزی ش، معطر ف. اثرات ضدقارچی گردو. مجله دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۷۰؛ سال سوم، شماره ۲، صفحات ۱۲۱ تا ۱۲۵.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-10-12]