دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر
فصلنامه‌ی کاربرد شیمی در محیط زیست

سال نهم، شماره‌ی ۳۵
تابستان ۱۳۹۷، صفحات ۱۹-۱

شناسایی ترکیبات فنلی عصاره برگ گردو (Juglans Regia L.) موجود در اسپری ژوگلون به کمک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا HPLC و اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی و ضد میکروبی آن

حجت اقبال
گروه فیتوشیمی مرکز تحقیقات علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
Email: hojat.eg@gmail.com
امید موذن‌زاده خیاوی
گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
آزاده ابراهیمی
مرکز رشد فناوری فرآورده‌های گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، اردبیل، ایران
ثمین امیرزاده
گروه داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
رعنا نوتاراج آلوجی
گروه زیست‌شناسی سلولی – تکوین گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

برگ گردو حاوی تانن‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها، اسیدهای گیاهی، مواد نفتوکینونی و ژوگلون (5- hydroxy-1,4-naphthoquinone) می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی عوامل تأثیرگذار عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گردو بر روی گونه‌های مختلف کاندیدا و هم‌چنین اثر آنتی‌باکتریال آن بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه در شرایط آزمایشگاهی، به‌منظور استفاده عصاره در اسپری، برای درمان قارچ پوستی بود. به این صورت که با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط مایع (Broth Microdilution)، اثرات ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گردو بر ضد چهار گونه 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 (MIC) و متعاقب آن حداقل غلظت کشندگی (MFC) هر یک از عصاره‌ها برای قارچ‌های مورد نظر به‌طور جداگانه تعیین شد، از طرفی با تهیه کردن عصاره اتانولی برگ گردو و اثرات ضد میکروبی آن به روش چاهک دیفیوژن، تعیین (MIC) و (MBC) با روش رقت لوله‌ای علیه پروپیونی باکتریوم آکنه انجام شد. در این پژوهش، مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری از برگ درخت گردو از طریق بررسی روبش رادیکال‌های آزاد (DPPH) و فعالیت ضد میکروبی، تعیین کمی و کیفی ترکیبات فنولی به روش HPLC در موثرترین روش عصاره‌گیری نیز انجام شد. بر اساس نتایج، عصاره اتانولی برگ گردو اثر ضد قارچی بر علیه گونه‌های کاندیدایی را نشان داد. عصاره آبی برگ گردو تنها از طریق توقف رشد قارچ، اثرات ضد قارچی خود را اعمال نمود. هم‌چنین در پروپیونی، عصاره اتانولی برگ درخت گردو در هر دو روش آگار دیفیوژن و ماکرودایلوشن بر روی باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه دارای اثر مهاری بود. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی دارای اثر ضد میکروبی بر روی باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه بوده، که می‌تواند به‌عنوان فرآورده‌ای آنتی-باکتریال در درمان عفونت‌های خارجی حاصل از این میکروارگانیسم مطرح گردد.

کلید واژه: برگ گردو، ژوگلون، HPLC، عفونت قارچی، گونه‌های کاندیدا، عصاره آبی و اتانولی، آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

فرآورده‌های طبیعی ترکیبات آلی هستند که به‌وسیله‌ی سیستم-های زنده تشکیل می‌شوند. تعیین ساختار، شیمی، سنتز و بیوسنتز آن‌ها از بخش‌های عمده‌ی شیمی آلی محسوب می‌شود. ترکیباتی را که به‌طور طبیعی یافت می‌شوند می‌توان به سه دسته-ی بزرگ تقسیم کرد. نخست، ترکیباتی که در همه‌ی سلول‌ها وجود دارند و نقش مرکزی را در متابولیسم و تکثیر آن سلول‌ها بازی می‌کنند. این ترکیبات شامل نوکلئیک اسیدها و آمینواسیدها و قندها می‌باشند. چنین ترکیباتی را متابولیت‌های اولیه می‌نامند. دوم، مواد پلیمری با وزن مولکولی خیلی بالا مثل سلولز، لیگنین‌ها و پروتئین‌ها می‌باشند که ساختارهای سلولی را تشکیل می‌دهند. سرانجام، ترکیباتی هستند که طیف ویژه‌ی محدودی از گونه‌ها می‌باشند. این ترکیبات متابولیت‌های ثانویه هستند. بیش‌تر متابولیت‌های اولیه اثر بیولوژیکی خود را درون سلول یا ارگانیسمی که تولید کننده‌ی آن‌هاست اعمال می‌کنند. از سوی دیگر، متابولیت‌های ثانویه، به خاطر اثر بیولوژیکی خود بر ارگانیسم‌های دیگر توجه زیادی را جلب نموده‌اند [۵۰]. امروزه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در میوه‌جات و سبزیجات بسیار مورد توجه واقع شده‌اند و نقش مهمی در حفظ سلامت و پیش‌گیری از بیماری‌ها ایفا می‌کنند. فشار مصرف-کنندگان برای اجتناب از استفاده ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی و هم‌چنین افزایش مقاومت بدن به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی منجر به رشد فزآینده به استفاده از این ترکیبات طبیعی در صنعت غذا شده است [۴۱]. در راستای حذف و یا کاهش افزودنی‌های شیمیایی در مواد غذایی تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با مواد طبیعی انجام شده است. در همین زمینه تلاش‌های زیادی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است. برگ و پوسته گردو جزء محصولات جانبی گردو می‌باشند و بنابراین جز منابع ارزان قیمت حاوی آنتی اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند در حالی که تولید مواد سنتزی هزینه بالایی را می‌طلبد. به‌همین منظور محققان مختلفی فعالیت ضد میکروبی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را بررسی کردند. وی و همکاران فعالیت ضد میکروبی پیرولیژنوس اسید حاصل از شاخه‌های درخت گردو را بررسی کرده و گزارش کردند که فنول‌ها و اسیدهای آلی حدود ۶۳/۴۶٪ از کل ترکیبات استخراجی را تشکیل دادند. این محققان بیان کردند که ترکیبات حاصله خاصیت ضد میکروبی دارند. در پژوهشی نفتوکینون‌ها و فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات فنولی اصلی آن‌ها هستند. حضور فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنولی در برگ گردو گزارش شده است [۴۷]. با توجه به مطالب گفته شده، برگ و پوسته گردو به‌دلیل داشتن ترکیبات فنولی و بالطبع خصوصیات ضد میکروبی و هم‌چنین با توجه به این‌که این محصول بومی کشور ماست به‌عنوان یک محصول جدید قابل توجیه می‌باشد و هدف از انجام این پژوهش بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از برگ گردو می‌باشد. ترکیبات فنلی از مواد بارز برگ گردو هستند به‌طوری که در تحقیقات انجام شده بیش از ده ترکیب فنولی همانند: ۳- کافیوییل کوینیک اسید، ۵ -کافیوییل کوینیک اسید، ۳- پی کوماروییل کوینیک اسید، ۴- پی کوماروییل کوینیک اسید، پی کوماریک اسید، کوپذستین ۳ گالاکتوزید، کوپرستین ۳- پنتوزید، کوپرستین ۳ آرابینوزید، کوپرستین ۳ گزیلوزید، کوپرستین ۳رامنوزید از برگ این گیاه شناسایی شده است. در مجموع تا ۷۳ گرم در هر کیلوگرم برگ خشک گردو را ترکیبات فنولی تشکیل داده‌اند و حدود ۶۳ درصد از این ترکیبات فلاونون‌ها هستند. فلاونوییدها نیز همانند آپیگنین، گالانجین، پینوسمبرین، پونسیرتین، جنکوانین، وفورافلاوانون G ،نارینجین، نارینجینین، اپیگالوکاتشین گالات، لوتیولین، ایزوفلاون، فلاونول گلیکوزید، هیدروکسی سینامیک اسید و ۵- هیدروکسی ۱و۴ نفتوکوینون به عنوان عوامل آنتی میکروبیال شناسایی شده‌اند [۵۹-۴۷]. ترکیبات فنولی در بسیاری از گیاهان دیگر نیز وجود دارند و اثر ضد میکروبی آن‌ها بستگی به محل و تعداد گروه‌های هیدروکسیل روی حلقه فنلی

دارد و ادعا شده که ارتباط مستقیمی بین تعداد گروه‌های هیدروکسیل و سمیت آن‌ها روی میکروارگانیسم‌ها وجود دارد [۲۴] و فنل‌های اکسید شده نیز اثر شدیدتری اعمال می‌کنند [۶۳]. فلاون‌ها، فلاونوییدها و فلاونول‌ها نیز ساختمان فنولی داشته، اثر ضد میکروبی دارند. اثر ضد میکروبی آن‌ها احتمالاً ناشی از ترکیب پروتیین‌های خارج سلولی و یا تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و یا ایجاد اختلال در غشای سلول میکروارگانیسم‌ها است [۶۱]. کاتشین یکی از فلاونوییدهای برگ گردوست [۴۸] که در چای سبز نیز موجود می‌باشد و خاصیت ضد میکروبی چای سبز نیز به همین ماده نسبت داده شده است [۶۰]. بعضی از فلاونوییدها از جمله گلسیریزین [۶۵] و چریزین [۱۷] روی HIV نیز موثرند. تانن‌ها نیز گروهی از ترکیبات فنلی هستند که با رسوب ژلاتین محلول اثر قابض دارند. این مواد در قسمت‌های مختلف گیاه ممکن است یافت شوند و در برگ گردو نیز وجود دارند. اثر ضد میکروبی آن‌ها را مربوط به مهار فعالیت آنزیمی و پروتئین‌های ترنسپورتر می‌دانند [۵۵ و ۷۰]. ترکیبات فنلی به‌خصوص فلاونوییدها علاوه بر اثر ضد میکروبی، به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی نیز بسیار مفید هستند. این مواد با بدام انداختن رادیکال‌ای آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو و هم‌چنین مهار ماکروملکول‌های اکسیداسیون خطر بیماری دژنراتیو را کم می‌کنند [۵۱]. در کل، مواد آنتی‌اکسیدان علاوه بر درمان یا پیشگیری از سرطان، در پیشگیری از بعضی از بیماری‌های قلبی و عروقی، کاتاراکت، اختلالات مغزی و سیستم ایمنی، در جلوگیری از پیری زودرس ناشی از عوامل اکسیداتیو نیز موثرند [۹]. به هر حال بعضی از محصولات طبیعی مانند ویتامین A، C، E، فلاونوئید ها، پلی فنول‌ها یا خصوصاً ترکیبات فنولی که ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی را در شرایط واقعی نشان می‌دهند می‌تواند بعد از نفوذ سلول‌ها، توسط ROS اکسیده می‌شوند و بدین‌سان گونه‌های رادیکالی اضافی مانند رادیکال‌های فنوکسیل، هیدروکسیل و سوپراکساید را تولید کنند. حقیقتاً آنتی‌اکسیدان‌ها توسط فعل و انفعال داخلی با ROS به اکسایارها تبدیل می‌شوند که قادر به اکسید کردن لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA هستند. کلاً مواد آنتی‌اکسیدان علاوه بر درمان یا پیشگیری از سرطان، در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی، کاتاراکت، اختلالات مغزی و سیستم ایمنی، در جلوگیری پیری زودرس ناشی از عوامل اکسیداتیو نیز موثرند [۹].

گیاه‌شناسی گردو

گردو (Juglans Regia L.) متعلق به رده‌ی نهان‌دانگان، زیر رده‌ی دولپه‌ای‌ها، راسته‌ی Amentales خانواده‌ی Juglandaceae و جنس Juglans می‌باشد، میوه آن شفت و دارای ۲۱ گونه می‌باشد که همگی خزان دار و دارای میوه‌ی خوراکی هستند [۷۱و۱۳]. گیاهی درختی است که ارتفاع آن به ۱۵- ۱۲ متر می‌رسد و دارای برگ‌های فراوانی است [۲۹]. این خانواده متشکل از ۷ جنس و ۵۹ گونه می‌باشد. وجود ترکیبات مختلفی در پوست و به‌ویژه برگ گیاه گردو نظیر: تانن‌ها ، ترکیبات نفتاکینونی (به‌ویژه Juglone) و مشتقات اکسیژنه نفتالن، فلاوونوئیدها (به‌ویژه Quercetin)، فنولیک اسیدها، روغن‌ها و اسیدهای چرب، سبب کاربرد گسترده اجزای مختلف این گیاه در طب سنتی شده است، با این حال عمده فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی این گیاه به ترکیبات، فنولیک و پلی فنولیک مشتق از این گیاه نسبت داده شده است. در مطالعات مختلفی، اثر دارویی و ضد میکروبی گیاه گردو (Juglans regia) مورد بررسی قرار گرفته است [۶۷-۵۸]. به‌طور مثال Oliveira و همکاران در مطالعه‌ای ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد 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 [۴۲]. گردو از درختان بسیار مهم و ارزشمند می‌باشد که در بسیاری از

نقاط جهان یافت می‌شود، در ایران این گیاه از ارتفاع ۲۶ متر پایین‌تر از سطح دریا در مازندران، و تا ارتفاع بیش از ۲۵۰۰ متر از سطح دریا در چهارمحال و بختیاری رویش داشته و به‌جز استان‌های ساحلی خلیج فارس و دریای عمان در سایر استان‌های کشور کشت می‌گردد. تمام قسمت‌های گردو از جمله پوست سبز میوه حاوی ترکیب‌های دارویی زیادی بوده و اثر مفیدی بر سلامت انسان دارد [۳]. از بین اعضای خانواده درخت گردو، در ایران تنها گونه‌ی Juglans regia می‌روید که بیش‌تر در نواحی شمالی- غربی و جنوبی کشور گسترش دارد. در کتب طب سنتی با نام عربی آن جوز نام برده می‌شود. درخت آن را به فرانسوی Noyer cimmun و به انگلیسی Walnut tree می‌نامند [۴۶]. ژوگلون ترکیبی نفتوکینونی است که در برگ تازه و پوسته سبز میوه گردو یافت می‌شود [۶۹]. ژوگلون هم‌چنین می‌تواند در برگ‌ها پوست و یا چوب درخت گردو باشد. اما غلظت کم‌تری در ریشه دارد. ژوگلون به‌طور بسیار کمی در آب محلول است و بعد از دو ماه می‌تواند شکسته شده و خاصیت خود را از دست بدهد [۴۸-۵۱]. برخی مطالعات خواص آنتی باکتریال بودن محصولات گردو و به‌طور اختصاصی پوست گردو گزارش گردیده است [۷]. ژوگلون بارزترین ماده موجود در اندام‌های مختلف گیاه گردو می‌باشد. این ماده یک کینون (5–hydroxy-1,4-naphthoquinone) با فرمول شیمیایی $C_{10}H_6O_3$ با وزن مولکولی ۱۷۴/۱۶ می‌باشد که پیش ماده ترکیب آن ۵- هیدروکسی ۱و۴و تری نفتالین گلوکوزید است و به‌صورت پیوند شده در اندام‌های هوایی به‌ویژه برگ‌ها وجود داشته و در اثر آب‌شویی تحت عمل هیدرولیز و اکسیداسیون قرار گرفته به ژوگلون تبدیل می‌شود [۱]. مطالعات وسیعی در مورد اکسیداسیون مواد فنولیک موجود در اندام‌های مختلف گیاه گردو و چگونگی تبدیل مواد شیمیایی ذکر شده انجام شده است [۲۳]. هم‌چنین تحقیقات مشابهی بر روی اندام‌های دیگری گردو مانند پوست سبز گردو برای شناسایی مواد فلاونوییدی ترکیبات کینونی و فنولیکی صورت پذیرفته است [۵۷].

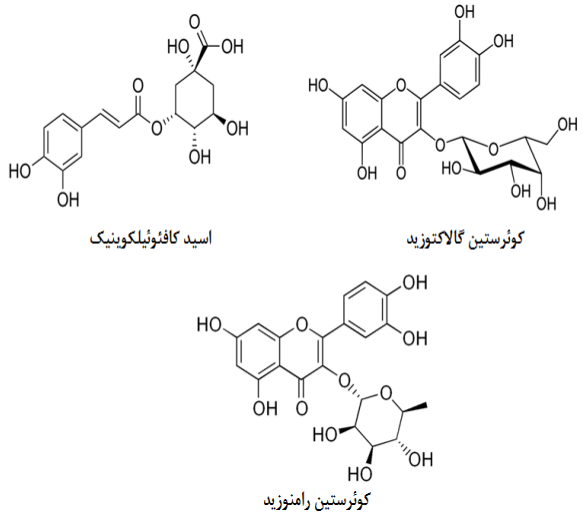
خواص و ارزش دارویی گردو

برگ‌های گیاه J. regia دارای خواص درمان‌گر گوناگونی مانند خاصیت ضد قارچ، ضدکرم انگلی روده، پالاینده و قابض، شل کننده عضلانی، دردهای روماتیسمی، تب، بیماری‌های پوستی، ضد پوسته‌ریزی پوست، تسکین دهنده درد و هیپوگلیسمیک می‌باشند، در طب سنتی برای درمان نارسایی وریدی و بیماری بواسیر کاربرد دارد. هم‌چنین، برگ گردو یک منبع بالقوه از ترکیب‌های محافظ سلامت می‌باشد و به‌طور وسیع در طب سنتی برای درمان نارسایی وریدی و بیماری بواسیر به‌کار می‌رود. هم‌چنین ضد اسهال ضدکرم روده، ضدقارچ، کاهنده قند و فشارخون می‌باشد. در واقع برگ گردو حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیب‌های پلی فنولی می‌باشد [۴۶]. از برگ و پوست میوه درخت گردو در طب سنتی برای اثرات دارویی گوناگون و مفیدی که دارد استفاده می کنند مانند داروی قابض و تجزیه کننده بافت‌های شاخی [۱۱]، ضد اسهال و ضد کرم پهن و تصفیه کننده و مقوی [۶۷]، ضدقارچ [۳۷]، و کاهش دهنده قند خون [۳۹]، از این گیاه اثر ضد ویروس بر علیه ویروس التهاب کیسه مخاط دهان (vesicularis stomatitis)، نیز گزارش کرده‌اند [۲۷]. هم‌چنین [۲۵] در مورد تأثیر تسکین دهندگی ترکیب ژوگلون تحقیقاتی انجام داده اند. در این پژوهش، مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری از برگ درخت گردو از طریق بررسی رویش رادیکال‌های آزاد DPPH و فعالیت ضد میکروبی و تعیین کمی و کیفی ترکیبات فنولی به روش HPLC در موثرترین روش عصاره‌گیری نیز انجام شد. به‌طور سنتی دم‌کرده ۲۰-۱۵ گرم برگ گردو در یک لیتر آب جوش برای کاهش مقدار قند در بیماران دیابتی اثر محسوس داشته و جوشانده آن در استعمال خارجی برای التیام زخم‌ها و شستشوی آن‌ها و بیماری‌های پوستی و اگزما و قارچی

مفید است [۱۸]. آکنه ولگاریس بیماری است که به درجات مختلف در سنین نوجوانی و بلوغ دیده می‌شود. در آمریکا، سالانه حدود ۲ میلیون نفر به آکنه شدید نیازمند به درمان مبتلا می‌شوند [۳۳]. در حال حاضر، بروز بیماری‌های قارچی که در گذشته کم‌تر دیده می‌شدند، با توجه به وجود شرایط مستعد کننده 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 [۳۶]. 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 [۶-۴۳]. عوارض جانبی بسیار زیاد داروهای ضد 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 [۴۴]. 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 به عنوان داروی جایگزین صورت گرفته است که گیاه گردو هم از این قضیه مستثنی نبوده است. با توجه به اشارات متعدد مبنی بر اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی بومی ایران [۲]، از جمله گردو بر روی استافیلوکوکوس اوریوس و سودوموناس آیروژینوزا و باسیلوس سریوس [۴۷] و هم‌چنین اثرات Citrus Natsudaidai, Citrus Obovoides و گیاهان دارویی منطقه‌ای Jeju کره، بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه [۳۰] و با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در اثر مصرف داروهای ضد میکروبی جهت پیشگیری و درمان عفونت‌ها و هم‌چنین عوارض جانبی و اثرات سو و متفاوت آن‌ها، بررسی و تحقیق بر روی گیاهان دارویی به‌منظور کشف منابع جدید دارویی بر علیه عفونت‌های باکتریایی مورد نیاز می‌باشد. لذا استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات شیمیایی آن‌ها می‌تواند فواید بالقوه‌ای در حل این مشکلات داشته باشد. در سال‌های اخیر بر جایگزین نمودن مواد طبیعی در کنترل و درمان عفونت‌ها و بیماری‌های مختلف به‌جای داروهای شیمیایی صناعی دارای اثرات جانبی نامطلوب تاکید می‌گردد [۳۸]. قسمت‌های مختلف گردو از جمله پوست سبز روی میوه گردو، پوست درخت، مغز و برگ گردو در داروسازی مورد استفاده هستند و تا حدودی اثر ضد میکروبی نیز از خود نشان داده‌اند [۲۰]. ولی برگ گردو به‌دلیل فراوانی، در دسترس بودن و امکان تهیه ارزان آن بدون این‌که به درخت آسیب برساند، اگر موثر باشد، می‌تواند جانشین مناسبی برای داروهای سنتتیک و غیرسنتتیک باشد.

بررسی فیتوشیمیایی برگ گیاه Juglans Regia

اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها دو گروه عمدهٔ ترکیب‌های فنلی موجود در برگ گردو هستند [۸]. مهم‌ترین اسیدهای فنلی برگ گردو، اسید کافئوئیلکوینیک و اسید کوماروئیلکوینیک هستند. مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در برگ گردو، ژوگلون، کوئرستین گالاکتوزید، مشتق‌های کوئرستین پنتوزید، کوئرستین آرابینوزید، کوئرستین گزیلوزید، کوئرستین رامنوزید و مشتق‌های کامپفرول پنتوزید هستند. کاتشین نیز یکی از فلاونوییدهای برگ گردوست [۲۳-۲۱]. مهم‌ترین ترکیب شیمیایی گردو ژوگلون است که از لحاظ ساختمانی ۵- هیدروکسی و ۱و ۴- نفتوکینون است که تنها در بخش‌های سبز و تازه گردو یافت شده و در برگ‌های خشک، اثر آن از بین می‌رود [۵۷]. شکل ۱ ساختار شیمیایی برخی از ترکیبات موجود در برگ گردو [۴۵] را نشان می‌دهد.



شکل ۱: ساختار شیمیایی برخی از ترکیبات موجود در برگ گردو

عفونت‌های قارچی سطحی جزو عفونت‌های شایع پوست هستند که در اشکال مختلف، پوست و مخاط را گرفتار می‌کنند. مهم‌ترین و فراوان‌ترین عفونت‌های قارچی جلدی که پوست و ضمائم آن را در بر می‌گیرد درماتوفیت‌ها هستند. از نظر بالینی درماتوفیت‌ها را براساس موضع گرفتاری نامگذاری می‌کنند که شامل کچلی سر و مو، پا، کشاله ران، تنه، ریش، دست و ناخن است [۴]. عوامل قارچ‌های سطحی به لایه سلول-های شاخی گرایش داشته و از آن تغذیه می‌کنند. این لایه شامل طبقه شاخی نرم پوست بدن و یا سلول‌های شاخی سخت مو و ناخن هستند. با توجه به گرایش متفاوت هرکدام از عوامل قارچی سطحی به سلول‌های شاخی نرم یا سخت، اشکال مختلف عفونت‌های قارچی پوست ناخن و مو بروز می‌نماید [۴]. با توجه به شناسائی الگوی توزیع و تعیین نوع عامل عفونت قارچی توسط بررسی آزمایشگاهی و همچنین شناسایی انواع درماتوفیت‌ها و نیز بررسی عوامل زمینه‌ای مساعد کننده با بررسی نتایج حاصله می‌توان با استفاده از روش تهیه اسپری حاوی عصاره برگ گردو ابتلا و انتشار آن را محدود کرد.

مواد و روش‌ها

- روش برداشت نمونه برگ گردو

برگ‌های تازه گیاه گردو در شهریور ماه سال ۱۳۹۵ در منطقه اندزق از شهرستان مشکین‌شهر واقع در شمال‌غربی ایران جمع آوری شد. برداشت نمونه‌ها در یک فاصله زمانی بسیار کوتاه در ساعات ۱۲ الی ۱۵ در اوج تابش خورشید به دلیل وجود بیش‌ترین ماده موثره انجام شد. اندام مورد نظر که شامل برگ بود از گیاه جدا گردید و در پاکت‌های مخصوص قرار داده و به محل خشک شدن انتقال پیدا کرد. خشک کردن برگ بلافاصله به روش خشک کردن در سایه و در دمای ۲۰ الی ۲۸ درجه سلسیوس اتاق انجام گرفت و سپس در جای خشک و خنک نگهداری شد، و موقع استحصال ماده موثره با خرد کن (CG۱۰۰) خرد، و تا زمان انجام سایر آزمایش‌ها در بطری‌های شیشه‌ای درب بسته نگهداری شد (Zohouri et al., 2014).

- عصاره آبی

عصاره‌گیری به روش خیساندن (ماسراسیون) انجام شد. قبل از عصاره‌گیری عمل حذف چربی به وسیله اتردوپترول صورت گرفت. برای تهیه عصاره آبی، ۱۰۰ گرم پودر برگ گیاه را داخل ارلن ۱۰۰۰ سی‌سی ریخته و به اندازه ۲ برابر حجمی که پودر گیاه در ارلن اشغال کرده بود، آب مقطر به آن افزوده شد. عمل خیساندن به مدت ۷۲ ساعت (۳ روز) انجام گرفت و در طی این مدت هر چند ساعت یک بار به خوبی تکان داده شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، عصاره ابتدا توسط پارچه و پنبه و سپس توسط قیف بوخنر صاف شد [۷۲].

- عصاره هیدروالکلی

عصاره هیدروالکلی (اتانول ۷۰٪) نیز به روش خیساندن (-ماسراسیون) به مدت ۷۲ ساعت و در دمای اتاق در دو نوبت تهیه شد.

- استاندارد مواد شیمیایی

ترکیب نفتوکینونی ژوگلون (hydroxy-1,4-5-naphthoquinone) استاندارد مورد استفاده، محصول شرکت (Acros) و با درصد خلوص ۹۷٪ بود. حلال‌های کلروفرم متانول

اتانول دارای درجه خلوص AR و حلال‌های مورد استفاده در کروماوگرافی HPLC شامل استونیتریل و اسید فسفریک با درجه خلوص HPLC محصول شرکت Merck بود.

- شرایط دستگاه HPLC

HPLC یا کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی، تکنیک مناسبی برای جداسازی و اندازه‌گیری محصولات طبیعی، مواد دارویی و بیوشیمیایی می‌باشد. یکی از روش‌های دقیق جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی استفاده از HPLC می‌باشد. دستگاه مورد استفاده از شرکت Knuer مدل Well Chrom 2000 با پمپ مدل Maxi-star K-1000 و دتکتور مدل Spectrophotometer K-2500 که در ۳۲۰nm برای شناسایی فنولیک اسید و در ۳۵۰nm جهت فلاونوییدها تنظیم گردید و ستون مورد استفاده Erospher 100 C 18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴ میلی‌متر و فاز متحرک متانول، آب و اسید استیک (۵:۶۵:۳۰) با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه، و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرو میلی‌لیتر به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید.

- روش استخراج ژوگلون از برگ تازه گردو

مقدار ۱۰ گرم از نمونه تازه برگ گردو را با ۵۰ میلی‌لیتر حلال استون به‌وسیله دستگاه سوکسله چربی‌زدایی کرده و بعد استخراج توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم به روش خیساندن و تکانه انجام شد. حلال محلول تهیه شده را به‌وسیله دستگاه تقطیر در خلا، جدا کرده، سپس ماده جامد به‌دست آمده به‌وسیله ۵۰ میلی‌لیتر متانول به حجم رسانده شد. از محلول به‌دست آمده جهت اندازه‌گیری ترکیب شیمیایی ژوگلون و هم‌چنین تخلیص آن استفاده شد [۱۲].

- رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد

برای بررسی و اندازه‌گیری میزان ژوگلون منحنی استاندارد مورد نیاز بود. برای تهیه این منحنی استاندارد از ترکیب استاندارد سنتزی (5- hydroxy-1,4-naphthoquinone) غلظت‌های متفاوتی برای تزریق آماده شد. سه نمونه با غلظت‌های (۵ µlit، ۱۰ µlit، ۱۵ µlit) از محلول استاندارد ساخته شده برای به‌دست آوردن منحنی کالیبراسیون به دستگاه تزریق شد. با استفاده از سطح زیر پیک ماده مجهول و انطباق آن با منحنی کالیبراسیون غلظت ماده مجهول به‌دست آمد.

- روش اندازه‌گیری دستگاهی

برای تعیین میزان مقدار ترکیب ماده موثر ژوگلون (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) در نمونه برگ گردو ابتدا مقدار ۵ µlit از محلول مجهول استخراج شده به دستگاه تزریق شد. پس از ارزیابی زمان‌های ماندگاری و مطابقت پیک‌های به‌دست آمده با پیک استاندارد دستگاه کالیبره شد.

سپس نمونه استاندارد سنتزی و محلول مجهول میکس شد و (۵ µlit) بار دیگر به دستگاه تزریق گردید. برای تفسیر پیک‌ها و به‌دست آوردن مقدار ماده موثر ژوگلون، در نمونه محلول مجهول استخراج شده، از منحنی کالیبراسیون رسم شده استفاده شد.

- روش خالص‌سازی

برای جداسازی و تخلیص ترکیب شیمیایی ژوگلون از نمونه محلولی مجهول استخراج شده مورد نظر از برگ گردو، که وجود این ترکیب نفتوکینونی در آن محرز شد از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC به روش Preparative استفاده گردید.

روش کار بدین گونه بود که پس از چندین بار تزریق در حدود ۱۰۰ µlit از نمونه مجهول و زمان بازداری مشخص شده برای وجود پیک برای ترکیب شیمیایی ژوگلون (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) محلول خروجی از دستگاه Preparative جمع‌آوری و پس از طی مرحله خالص‌سازی و خشک کردن حلال توسط دستگاه تقطیر در خلاء نمونه جمع‌آوری شد.

- شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فنلی

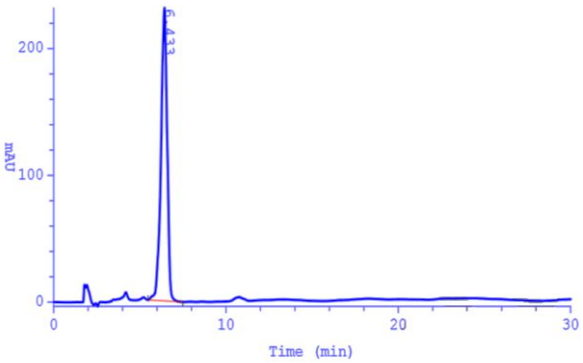
در مرحله نخست آزمایش، با بررسی منابع به‌منظور استخراج ترکیبات پلی‌فنلی از روش آمارال و همکاران استفاده شد [۸] و از محلول به‌دست آمده جهت شناسایی ترکیبات فنولی در دستگاه HPLC استفاده گردید.

- اندازه‌گیری مقدار فنول کل

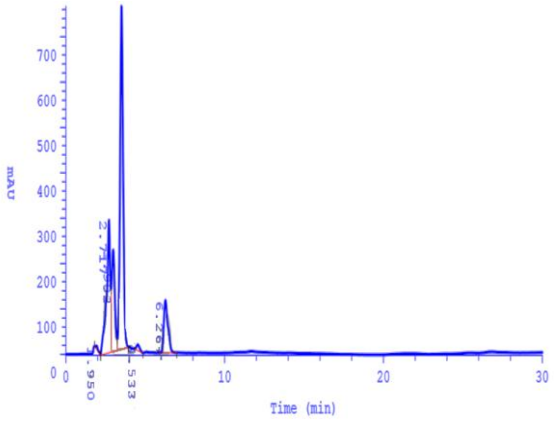
محتوی فنول کل با استفاده از معرف فولین - سیوکالتیو توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل (UNICO UV2100) اندازه‌گیری شد. به نیم میلی‌لیتر از عصاره‌ها (مقدار ۰/۰۰۵ گرم پودر نمونه در ۱ میلی‌لیتر متانول)، ۲ میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین سیوکالتیو ۱۰٪ و پس از ۵ دقیقه، ۲ لیتر از محلول ۵٪ کربنات سدیم به آن اضافه شد.

جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد [۶۸]. گالیک اسید به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به‌کار رفت و میزان فنول کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش گردید.

آزمایشات ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد. (شکل‌های ۳ و ۲ و جدول ۱) میزان و محتوای ژوگلون در طیف استاندارد و در برگ گردو را نشان می‌دهد.



شکل ۲: کروماتوگرام طیف استاندارد ترکیب ژوگلون با غلظت ۰/۰۶۴mg/ml



شکل ۳: کروماتوگرام طیف نمونه برگ گردو

جدول ۱- اندازه‌گیری محتوای ژوگلون با استفاده از دستگاه HPLC

Compound	Juglone (mg/100g)
	22.82±0.24
	5.44±0.15
	15.21±0.43
	12.55±0.81
	5.42±0.61
Mean	12.289
Range	17.406
Standard Deviation	7.308

- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲-۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH (سیگما -آلدریچ) ترکیبی است بنفش رنگ که به‌دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن به‌راحتی به‌صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی‌رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد (Thaipong et al. 2006, Kamkar et al. 2009). غلظت‌های

مختلف از عصاره‌ها به همراه ۱ میلی‌لیتر از DPPH ۰/۱ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر متانول تهیه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با DPPH در مقابل بلانک قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%IP = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

%IP: درصد مهار رادیکال‌های آزاد (درصد بازداری آنتی‌اکسیدان در برابر رادیکال‌های آزاد).

A_{blank}: جذب شاهد (که حاوی ۱ میلی‌لیتر از متانول در ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH می‌باشد).

A_{Sample}: جذب نمونه (که حاوی حجم‌های مختلفی از عصاره گیاهی (آنتی‌اکسیدان)، متانول و محلول DPPH می‌باشد).

در این تست از بوتیلات هیدروکسی تولوئن، BHT، (یک آنتی‌اکسیدان سنتزی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و کلیه آزمایشات سه بار تکرار شدند و میانگین آن‌ها گزارش شد. برای محاسبه مقدار IC_{50} ابتدا منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری (%IP) بر حسب غلظت (µg/ml) رسم شد و معادله خط نمودار به‌دست آمده و با جایگزین کردن عدد ۵۰ در محور y مقدار IC_{50} از محور x محاسبه شد. غلظتی از عصاره‌ها که ۵۰ درصد مهار رادیکالی را منجر شد در جدول شماره ۱ و در مقایسه با بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) آورده شده است. محدوده پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH نشان داد که عصاره متانولی صمغ با مقدار ۲/۳ ± ۱۱۰/۰۴۳ دارای بیش‌ترین قدرت مهارکنندگی است. به‌منظور ارزیابی مقدار متابولیت‌های ثانویه که مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، محتوای فنلی کل برگ گردو با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مورد سنجش قرار گرفت. در جدول ۲، مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از برگ گردو و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مشاهده می‌شود. غلظت تمام عصاره‌ها برای کلیه آزمایشات ۱mg/ml به‌کار رفت. قدرت مهار رادیکال‌های آزاد توسط آزمایش DPPH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده در جدول ۳ نشان می‌دهند که عصاره متانولی برگ با مقدار ۰/۱۵± ۶/۰۲ میلی گرم گالیک اسید بر گرم نمونه، بیشترین مقدار فنول را به خود اختصاص داده است.

جدول ۲- غلظتی از عصاره‌ها در مقایسه با بوتیلات هیدروکسی‌تولوئن (BHT)

Sample	DPPH assay IC_{50} (µg/ml)
BHT	12.98±0.05
Methanol extract	110.04±2.3
Aqueous extract	26.48±3.9

جدول ۳- میزان فنول در غلظتی از عصاره‌ها

Sample	Phenol Content (mg Galic acid/g DW)
Methanol extract	4.10±0.19
Aqueous extract	6.02±0.15

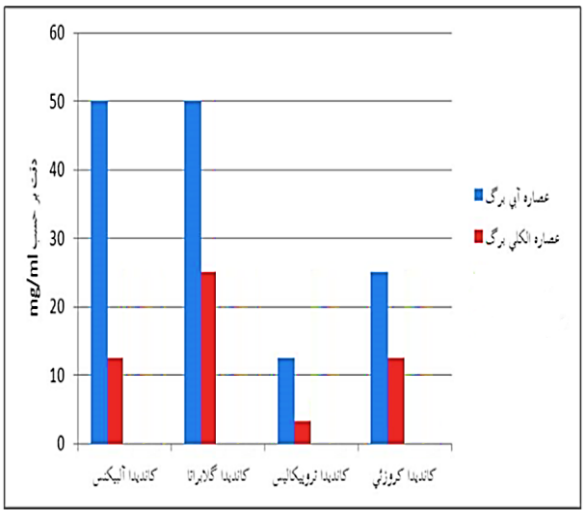
- فعالیت ضد قارچی

به‌منظور تعیین حساسیت سوش‌های استاندارد کاندیدا نسبت به عصاره‌های آبی و الکلی برگ گردو و مقایسه با داروهای ضد قارچی رایج، به روش میکرو دایلوشن در آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اهر انجام گرفت. در این مطالعه، از روش استاندارد Broth Microdilution برای بررسی MIC داروهای کلوتریمازول و فلوکونازول و عصاره‌های آبی و الکلی برگ گیاه گردو استفاده گردید. مواد مورد مطالعه شامل برگ گردو پس از جمع‌آوری، در درجه حرارت اتاق و در شرایط سایه خشک شدند، سپس پودر شده و با روش خیساندن (Maceration) با دو حلال آبی و متانولی عصاره‌گیری شد. در نهایت توسط دستگاه روتاری (Rotary evaporator) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه، عصاره حاصل تغلیظ شد که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباتور شد و به صورت خشک تا زمان انجام تحقیقات در فریزر نگهداری گردید. گونه‌های کاندیدایی مورد آزمایش

شامل: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزئی تهیه شده از مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بودند. هر یک از گونه‌های کاندیدایی، در محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند. از کلنی‌های تازه و منفرد کاندیدایی رشد یافته 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 به دست آوردن تعداد ۵×۱۰^{۶} سلول مخمری در هر میلی‌لیتر، میزان عبور نوری (Transmittance) سوسپانسیون مخمری در طول موج ۵۳۰ نانو متر محاسبه گردید. میزان عبور نوری ۶۱ تا ۷۸ درصد نشان دهنده تعداد تقریبی $۱۰^{۶}$ سلول مخمری می‌باشد. سوسپانسیون به‌دست آمده رقیق‌سازی شد تا رقّتی معادل $۱۰^{۵}$ سلول مخمری به‌دست آید.

سپس رقّت سریال از عصاره‌های آبی و الکلی برگ گردو و نیز داروهای فلوکونازول و کلوتریمازول با استفاده از روش Broth Microdilution و محیط سابورو دکستروز براث در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تهیه شد. رقت‌های به‌دست آمده از عصاره‌های مورد نظر ۷۰-۰/۰۲۴۴۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در مورد داروها برای فلوکونازول ۰/۱۲۸-$۱۰^{-۱}\times$ ۵-۷/۸۱ و برای کلوتریمازول $۱۰^{-۴}\times$ ۵/۳ - ۰/۰۰۸ بود.

پس از تهیه رقت سریال و افزودن ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون فوق، میزان MIC هر یک از عصاره‌های گیاهی و داروها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، 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 غلظت‌کشندگی (MFC)، از هر یک از رقّت‌های عصاره‌های گیاهی و داروهای ضد 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 دمای۳۷ درجهٔ 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 ضد قارچی ثبت گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۵) و با کمک آزمون‌های T - test زوج شده و ANOVA در سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.



نمودار ۱: MIC عصاره‌های آبی و الکلی برگ گردو بر روی گونه‌های کاندیدا

جدول ۴- نتایج MIC و MFC عصاره‌های گیاهی و داروها به روش رقیق‌سازی در محیط مایع بر روی گونه‌های کاندیدایی

گونه‌های کاندیدایی							
	کاندیدا آلبیکنس		کاندیدا گلابراتا		کاندیدا تروپیکالیس		کاندیدا کروزئی	
ترکیب	MIC(mg)	MFC(mg)	MIC(mg)	MFC(mg)	MIC(mg)	MFC(mg)	MIC(mg)	MFC(mg)
عصاره آبی برگ گردو	۷۰	–	۷۰	–	۱۶/۲۵	–	۳۰	–
عصاره الکلی برگ گردو	۱۶/۲۵	۱۶/۲۵	۳۰	۳۰	۱۶/۲۵	۷/۸۱	۱۶/۲۵	۳۰
داروی فلوکونازول	$۱۰^{-۲}$	$۱۰^{-۲}$	۵×۱۰^{-۱}	۵×۱۰^{-۱}	۳×۱۰^{-۱}	۳×۱۰^{-۱}	$۲/۵\times۱۰^{-۲}$	$۲/۵\times۱۰^{-۲}$
داروی کلوتریمازول	$۵/۳\times۱۰^{-۴}$	$۵/۳\times۱۰^{-۴}$	۷×۱۰^{-۳}	$۱۰^{-۲}$	$۳/۲۵\times۱۰^{-۳}$	$۳/۲۵\times۱۰^{-۳}$	$۵/۳\times۱۰^{-۴}$	$۵/۳\times۱۰^{-۴}$

- فعالیت ضد میکروبی

آزمایش به‌صورت تجربی در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اهر انجام شد. جهت انجام، از سویه استاندارد باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه (ATCC۱۱۸۲۷) تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران استفاده شد. برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری بر روی محیط تیوگلیکولات براث و آگار خونی در شرایط بی‌هوازی، سوسپانسیونی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند در نرمال سالین تهیه شد. در این شرایط تعداد باکتری‌ها حدود ۱/۵×۱۰۸ در میلی‌لیتر بود. از این سوسپانسون در مراحل بعدی آزمایش‌ها استفاده گردید [۱۰].

- عصاره اتانولی گیاه

برای تهیه عصاره اتانولی،۱۰۰ گرم از پودر خشک شده برگ گردو با ۵۰۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد، مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس عصاره به‌دست آمده، توسط کاغذ صافی فیلتر شده، وارد دستگاه روتاری (برای حذف حلال) گردید. عصاره الکی به‌دست آمده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور خشک شد. پس از آن مقدار ۱ گرم از عصاره هیدروالکلی خشک حاصله را به ۵۰ سی‌سی از حلال دی متیل سولفاکساید (DMSO) اضافه نموده، به‌وسیله سرنگ میلی‌پور با فیلترهای به قطر ۰/۲۲ میکرون فیلتره گردید [۲].

- بررسی حساسیت میکروبی

برای تعیین حساسیت ضد میکروبی، از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰میکروگرم) به‌عنوان کنترل مثبت و از حلال خالص دی متیل سولفاکساید (DMSO) به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. برای اطمینان از تاثیر عصاره اتانولی بر روی باکتری مورد نظر، ابتدا باکتری با غلظت‌های متفاوت عصاره، تحت تاثیر قرار گرفت. برای این منظور چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی متر در محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد که پس از کشت باکتری از سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط، عصاره گیاهی با غلظت‌های ۱۲۵،۱۰۰،۷۵،۵۰،۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی تحت انکوباسیون قرار گرفته و نتایج بر اساس اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی، ثبت شد (کلیه آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردید) [۱۰].

- تعیین غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC)

آزمایش‌ها در دو مرحله طراحی و از روش اصلاح شده ماکرودایلوشن توصیه شده توسط (National Committee

NCCLS for Clinical Laboratory Standard) استفاده گردید [۱۶]. بدین ترتیب که سوسپانسیونی با غلظت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند از باکتری در محیط تیوگلیکولات براث تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت تاثیر رقت‌های متوالی در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تحت شرایط بی هوازی قرار گرفت. و بعد از ۲۴ ساعت با مشاهده کدورت و یا عدم ایجاد کدورت در لوله‌ها، مقدار MIC تعیین شد. MIC عبارت است از حداقل غلظتی از عصاره که مانع از رشد باکتری شده و کدورت حاصل از رشد دیده نشود. برای تعیین MBC، از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت دیده نشد بر روی محیط کشت Blood agar در شرایط بی‌هوازی کشت مجدد داده شد و با روش رقت‌های متوالی عمل شمارش کلنی صورت گرفت. اولین لوله‌ای که مقدار کاهش رشد تعداد باکتری‌های آن نسبت به زمان صفر لوله شاهد، بیشتر از یک هزارم بود، به‌عنوان MBC انتخاب شد. گاهی اوقات غلظت MBC برابر با مقدار MIC است (در این روش نیز کلیه آزمایش-ها ۳ بار تکرار گردید) [۱۰]. نتایج این آزمایش در جدول ۵ مشاهده می‌شود.

جدول ۵- میانگین قطر عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره اتانولی برگ گردو بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه

غلظت عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	هاله‌ی عدم رشد (میلی‌متر)
۲۵	۸+۱/۳
۵۰	۱۲+۱/۳
۷۵	۱۴+۰/۶۶
۱۰۰	۱۸+۰/۶۶
۱۲۵	۲۰+۱/۱
۱۵۰	۲۵+۱/۷

این تحقیق از نوع مقطعی و توصیفی- تحلیلی بود. به‌منظور انجام این تحقیق از ورزشکاران (رشته کشتی شهرستان مشکین‌شهر) که به آزمایشگاه معرفی شده بودند از محل مورد نظر (پوست انگشتان پا) نمونه‌برداری انجام شد. به‌هنگام پذیرش بیماران حداقل سه روز از آخرین استحمام آن‌ها گذشته بود و هم‌چنین حداقل ده روز قبل از پذیرش، از داروهای ضد قارچی خوراکی و موضعی استفاده نکرده بودند. آزمایش‌های انجام شده بر روی نمونه‌ها شامل: بررسی مستقیم نمونه‌ها با پتاس ٪۱۰ و بررسی میکروسکوپی کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های قارچ‌شناسی (Subero Dextrose Agar, S)(Subero ،Subero Dextrose) Agar Chloramphenicol, SC).Agar ،Dextrose (chloramphenical Cyclohexamid, SCC کشت اسلاید (slid culture) جهت تشخیص نوع درماتوفیت، تست‌های افتراقی جهت شناسایی کاندیداها و درماتوفیت‌ها. کچلی پا اغلب در جمعیتی که کفش بسته بخصوص پوتین می‌پوشند و تعریق زیاد پا اتفاق می‌افتد، گرمی و رطوبت فراهم شده بوسیله کفش، فاکتورهای کلیدی در ایجاد و باقی ماندن کچلی پا بودند. در یک بررسی که برای تعیین شیوع اونیکومایکوزیس در کشور بریتانیا انجام شد شیوع درماتوفیت ناخن ٪۲/۸ در مردان و٪۲/۶ در زنان بود. این نتایج نشان می‌دهد که در بریتانیا نزدیک به ۱/۲ میلیون نفر مبتلا به عفونت قارچی هستند [۵۳].

بحث و یافته‌ها

ترکیبات فنلی از مواد بارز برگ گردو هستند به‌طوری‌که در تحقیقات انجام شده بیش از ده ترکیب فنلی همانند: ۳- کافیوییل کوییینیک اسید، ۵- کافیوییل کوییینیک اسید، ۳- پی کوماروییل کوییینیک اسید، ۴- پی کوماروییل کوییینیک اسید، پی کوماریک اسید، کویرسیتن ۳ گالاکتوزید، کویرستین ۳ پنتوزید، کویرستین ۳ آرابینوزید، کویرستین ۳ گزیلوزید، کویرستین ۳ رامنوزید از برگ این گیاه شناسایی شده است. در مجموع تا ۷۳ گرم در هر کیلوگرم برگ خشک گردو را ترکیبات فنولی تشکیل داده‌اند و حدود ۶۳ درصد از این ترکیبات فلاونون‌ها هستند. فلاونوییدها نیز همانند آپیگنین، گالانجین، پینوسمبرین، پونسیرتین، جنکوانین، سوفورافلاوانون G، نارینجین، نارینجینین، اپیگالوکاتشین گالات، لوتیولین، ایزوفلاون، فلاونول گلیکوزید، هیدروکسی سینامیک اسید و

۵- هیدروکسی ۱و۴ نفتوکوینون به‌عنوان عوامل آنتی‌میکروبیال شناسایی شده‌اند [۴۶]. فلاون‌ها، فلاونوییدها و فلاونول‌ها نیز ساختمان فنولی داشته، اثر ضد میکروبی دارند. اثر ضد میکروبی آن‌ها احتمالاً ناشی از ترکیب پروتئین‌های خارج سلولی و یا تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و یا ایجاد اختلال در غشای سلول میکروارگانیسم‌هاست [۲۵]. در سال ۱۹۹۸ میزان ترکیب ژوگلون را در برگ گردو برای اولین بار با استفاده از دستگاه HPLC تعیین کرد و در طی مراحل کار متوجه شدند که نگهداری ترکیب ژوگلون در محلول متانول قابل دوام نیست. اما برگ خشک را می‌توان در ۴ درجه سانتی‌گراد در محل خنک و تاریک نگهداری کرد، که با نتایج به‌دست آمده تحقیق انجام شده مطابقت دارد. در تحقیق حاضر علاوه بر استخراج و شناسایی ترکیب نفتوکینونی ژوگلون $C_{10}H_6O_3$ به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع HPLC خالص‌سازی آن نیز به‌وسیله روش HPLC preparative و تایید خالص‌سازی به‌وسیله دستگاه‌های مختلف آنالیز شیمیایی شد. با توجه به طیف‌های به‌دست آمده از آنالیز ماده استاندارد به‌وسیله دستگاه‌های آنالیز شیمیایی مختلف و مقایسه آن با طیف‌های ماده استخراجی ترکیب (۵-hydroxy-1,4-naphthoquinone) با درصد خلوص کم‌تری نسبت به ماده استاندارد سنتزی شناسایی و تایید گردید. با بررسی مقالات قبلی، از این تحقیق نتیجه گرفته می‌شود که خالص‌سازی ژوگلون به‌وسیله این روش منحصر به‌فرد می‌باشد. برگ درخت گردو به‌دلیل فراوانی، در دسترس بودن و امکان تهیه‌ی ارزان آن بدون این‌که به درخت آسیب برساند، اگر موثر باشد می‌تواند جانشین مناسبی برای داروهای سنتتیک و غیر-سنتتیک باشد. در این تحقیق اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی برگ این گیاه بر روی باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه بر رشد باکتری اثر مهاری را دارد. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی برگ درخت گردو دارای اثر ضد میکروبی بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه بوده، می‌تواند به‌عنوان فرآورده‌ای آنتی باکتریال در درمان عفونت‌های خارجی حاصل از این میکروارگانیسم مطرح گردد [۲]. در این تحقیق نیز که به روش‌های چاهک دیفیوژن و رقت‌های لوله‌ای انجام گرفت، اثر ضد باکتریایی برگ گردو نشان داده شد و میزان MIC و MBC نیز تعیین گردید (جدول۳ میزان MIC و MBC عصاره اتانولی گیاه به ترتیب معادل ۱۶/۲۵ و ۷/۸۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌دست آمد. در مطالعات دیگری اثرات ضد میکروبی عصاره برگ درخت گردو بر روی باکتری‌های گرم مثبت نظیر باسیلوس سریوس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اریوس و باکتری‌های گرم منفی از جمله اشرشیاکلی، پزودوموناس آیروژینوزا، کلبسیلا پنومونیا صورت گرفته، اثرات ضد باکتریایی آن به اثبات رسیده است [۴۶-۴۷]. هم‌چنین در مطالعه‌ای توسط مهربانیان و همکاران اثرات ضد میکروبی عصاره آبی، متانولی و کلروفرمی سه گیاه از جمله گردو بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس مایکوییدس و بعضی قارچ ها نظیر آسپرژیلوس نیجر، پنیسیلیوم و ژیوتریکوم کاندیدوم بررسی شده و اثرات ضد میکروبی آن‌ها به‌صورت میکروبی سیدال گزارش گردیده است [۳۵]، که نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نیز با مطالعات مذکور همخوانی دارد. در مطالعه دیگری توسط نریمان و همکاران، فعالیت ضد باکتریایی شش گیاه بومی ایرنی از جمله گردو بر علیه هلیکوباکترپیلوری بر روی نمونه‌های کلینیکی، با استفاده از تست حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن به اثبات رسیده است [۳۸]. در جدول ۴ میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره اتانولی برگ درخت گردو بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه مشخص است. با توجه به نتایج و جدول ۵، عصاره اتانولی گیاه بر رشد باکتری در غلظت ۱۸۰ میلی‌گرم بیش‌ترین اثر مهاری با میانگین هاله عدم رشد دارای انحراف معیار ۱/۳ ±۳۸ میلی‌متر را داشت. در روش DPPH با افزایش غلظت عصاره‌ها، مهار رادیکال‌ها با قدرت بیش‌تری صورت گرفت. در این تحقیق میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوی فنل کل عصاره مختلف

برگ گیاه گردو مورد سنجش قرار گرفت. غلظت تمام عصاره-ها برای کلیه آزمایشات mg/ml ۱ به‌کار رفت. قدرت مهار رادیکال‌های آزاد توسط آزمایش DPPH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در جدول ۳ گزارش شده است، نشان می‌دهند که عصاره متانولی برگ با مقدار ۰/۱۵±۶/۰۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم نمونه، بیش‌ترین مقدار فنول را به خود اختصاص داده است. در واقع ژنوتیب، شرایط رشد مانند قابلیت دستیابی به آب، کیفیت نور و دما، روی سنتز و ذخیره ترکیبات فنولی در بخش‌های مختلف یک گیاه تاثیر می‌گذارد و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۵۴]. تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی واریته‌های مختلف می-تواند به تفاوت ژنوتیپ‌ها و موقعیت برداشت نسبت داد که بر تجمع و ذخیره ترکیبات فنولی توسط تفاوت در مقدار سنتز و یا نوع فنول‌های اسیدی تاثیر می‌گذارد [۳۲]. در آزمایش فعالیت ضد میکروبی با مقایسه داده‌های به‌دست آمده از عصاره‌های الکلی و آبی با یکدیگر نشان دادند که عصاره‌های الکلی برگ گردو در مقایسه با عصاره آبی آن‌ها دارای اثرات ضد قارچی بهتری می‌باشند و میزان MIC آن‌ها نیز از میزان MIC عصاره-های آبی به نسبت پایین‌تر است. این موضوع نشان می‌دهد که مواد مؤثّره‌ای که دارای اثرات ضد قارچی می‌باشند، در الکل حلال‌تر از آب می‌باشند، بنابراین با تراکم بیش‌تر مواد موثر در عصاره الکلی، طبیعتاً اثر ضد قارچی، بهتری از این عصاره‌ها مشاهده می‌شود. در مطالعه Raaman و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱، اثرات ضد میکروبی عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی پوست گردو بر ضد باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و کاندیدا آلبیکنس مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره‌های مورد استفاده، فعالیت بیش‌تری بر ضد باکتری‌های گرم منفی به ویژه اشرشیاکلی و پسودومونا آیروژینوزا نشان دادند، در حالی‌که تاثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت کم‌تر بود. عصاره هگزانی، فعالیت ضد باکتریایی بهتر و عصاره متانولی فعالیت ضد قارچی بهتری از خود نشان دادند [۵۲]. تحقیق حاضر همانند مطالعات انجام شده توسط سایر محققین، اثر ضد قارچی و به ویژه اثر ضدکاندیدایی عصاره‌های آبی و الکلی برگ 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 به‌دست آمده برای گونه‌های کاندیدایی در این مطالعه با نتایج به‌دست آمده در مطالعه Yigit و همکاران، اختلافاتی را در نتایج MIC نشان می‌دهد. این محققین در بررسی خود میزان MIC عصاره‌های آبی و الکلی برگ گردو را برای دو گونه مخمر مورد نظر، کم‌تر گزارش نمودند. در صورتی‌که در مطالعه حاضر، میزان MIC عصاره‌های آبی برگ گردو بین ۱۶/۲۵ تا ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نیز میزان MIC عصاره‌های الکلی برگ گردو بین ۶/۲۵ تا ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. اختلاف در نتایج گزارش شده می‌تواند به عوامل مختلفی بستگی داشته باشد، به‌عنوان مثال، روش عصاره‌گیری از جمله زمان عصاره‌گیری که در مطالعه فوق طولانی‌تر بوده است، به-نظر می‌رسد از جمله عواملی باشد که در تفاوت موجود بین نتایج این پژوهش با نتایج سایر مطالعات تأثیرگذار باشد [۵۲-۶۲]. 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 می تواند 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 [۲۲]. بر اساس نتایج حاصل، میزان MIC داروی فلوکونازول، کلوتریمازول به روش‌میکرودایلوشن برای قارچ‌های مورد نظر در محدوده‌ای به دست آمد که با MIC گزارش شده برای این داروها در مطالعات دیگر محققین مطابقت دارد که می‌تواند دلیلی بر صحت روش انجام آزمایش در پژوهش حاضر باشد [۲۶]. امروزه یکی از

مشکلات اساسی در زمینه درمان عفونت‌های کاندیدایی، بحث مقاومت دارویی گونه‌های کاندیدایی به‌ویژه گونه‌های گلابراتا و کروزئی نسبت به داروهای ضد قارچی مورد استفاده در درمان ضایعات ناشی این گونه‌ها می‌باشد [۴۹]. همان‌طور که در جدول ۴ نشان می‌دهند که این قارچ نسبت به داروی فلوکونازول نیز مقاوم می‌باشد. با اثبات اثرات ضد قارچی عصاره‌های مورد استفاده و دستیابی به مواد مؤثره 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 ضد قارچی خود را اعمال نموده‌اند، در حالی‌که 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 مؤثره، اثر ضد قارچی خود را اعمال می‌نمایند. آن‌چه به‌نظر می‌رسد این است که مواد مؤثره‌ای که دارای فعالیت ضد قارچی هستند، در دو نوع عصاره آبی و الکلی یکسان نمی‌باشند. با توجه به نتایج حاصل، امکان وجود بعضی ترکیبات ضد قارچی مشترک بین آن‌ها که هم توانایی حل شدن در آب و هم محلول در الکل باشند، کاهش می‌یابد. براساس نتایج به‌دست آمده، میزان MIC عصاره‌های الکلی از عصاره‌های آبی بهتر بوده و فعالیت ضد قارچی بهتری در مقایسه با عصاره‌های آبی نشان داده‌اند. از طرفی عصاره‌های الکلی دارای اثرات قارچ‌کشی می‌باشند، در حالی که عصاره‌های آبی، اثرات متوقف کنندگی 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 تعیین کننده‌ای 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 طولانی مدت می‌نماید. مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) فلوکونازول، کلوتریمازول و عصاره‌های آبی و الکلی برگ گردو در محیط کشت مایع برای گونه‌های کاندیدایی آزمایش شده، به‌ترتیب: در محدوده ۰/۰۳۲-۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، $۵/۳\times ۱۰^{-۴}$ _ ۷×۱۰^{-۳} میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۷۰- ۷/۸۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۳۰-۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمدند. حداقل غلظت کشندگی (MFC) فلوکونازول، کلوتریمازول، و عصاره‌های الکلی برگ گردو به‌ترتیب: در محدوده ۰/۰۳۲-۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر $۵/۳\times ۱۰^{-۴}$_ $۱۰^{-۲}$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۳۰-۷/۸۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد. عصاره‌های آبی برگ گردو، تنها از طریق توقف رشد قارچ اثرات ضد قارچی خود را اعمال می‌کنند (جدول۴)(نمودار ۱). بر اساس نتایج حاصل عصاره‌های متانولی برگ گردو نسبت به عصاره‌های آبی تأثیر بیش‌تری بر روی گونه‌های کاندیدایی داشتند، به‌طوری که عصاره‌های آبی فقط قادر به مهار رشد قارچ‌ها بودند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0/05$). در مطالعه دیگری اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی برگ درخت گردو بر روی باکتری‌های گرم مثبت نظیر باسیلوس سریوس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اریوس و باکتری‌های گرم منفی از جمله اشریشیاکلی، پزودوموناس آیروژینوزا، کلبسیلا پنومونیا صورت گرفته اثرات ضد باکتریایی آن به اثبات رسیده است [۴۶-۴۲]. هم‌چنین در مطالعه‌ای توسط مهربانیان و همکاران اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی آبی، متانولی و کلروفرمی سه گیاه از جمله گردو بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سریوس، باسیلوس مایکوییدس و بعضی قارچ‌ها نظیر آسپرژیلوس نیجر، پنی سیلیوم اکسپانسوم و ژیوتریکوم کاندیدوم بررسی شده و اثرات ضد میکروبی آن‌ها به‌صورت میکروبی سیدال گزارش گردیده است [۳۵]. در مطالعه Yigitو همکاران در سال ۲۰۰۹، اثرات ضدمیکروبی عصاره آبی و متانولی برگ و پوست سبز گردو بر ضد باکتری‌ها و قارچ‌های

مختلف، با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفت. این محققین از چهار باکتری گرم منفی، دو گونه باکتری گرم مثبت و نیز قارچ‌های ژئوتریکوم کاندیدوم و هفت گونه مخمری استفاده نمودند. Noumi و همکاران در سال ۲۰۱۰ فعالیت ضد قارچی عصاره‌های متانولی، اتیل استاتی و استونی پوست گردو را بر ضدگونه‌های کاندیدایی در اسپانیا مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، هر سه عصاره، فعالیت ضدکاندیدایی نشان دادند، اما حساس‌ترین گونه، کاندیدا آلبیکنس بود. کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس فعالیت ضعیف‌تری نسبت به سایر گونه‌های کاندیدایی نشان دادند. هم‌چنین عصاره استونی، فعالیت ضد کاندیدایی ضعیف‌تری نسبت به دو عصاره دیگر داشت و عصاره اتیل استاتی‌بیش‌ترین فعالیت را بر ضد کاندیدا آلبیکنس نشان داد. بررسی عصارهٔ استونی و آبی برگ گردو نشان می‌دهد که برگ گردو حاوی الاژیتانین است که دارای خواص ضد سرطانی و ضدالتهابی است [۲۹-۲۱].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، درماتوفیت‌ها شایع‌ترین عفونت قارچی پوست می‌باشند و از نظر موضع ابتلا کشالهٔ ران و پاها شایع‌ترین محل ابتلا هستند. استحمام مکرر، رطوبت و استفاده طولانی و مداوم از کفش‌های ورزشی زمینه‌ساز بیماری هستند. بیماری از طریق مکان‌های ورزشی، استخرهای عمومی، حمام‌های عمومی و استفاده از کفش یا دم‌پایی افراد آلوده قابل انتقال است. نتایج این تحقیق نشان داد که برگ درخت گردو از ویژگی‌های ضد باکتریایی قابل توجهی در شرایط invitro برخوردار است و این یافته‌ها می‌تواند زمینه تحقیقات بیش‌تری را در آینده برای شناسایی، تعیین مقدار و تخلیص ترکیبات موثره آن در شرایط in vivo فراهم و به‌عنوان یک ماده ضد باکتریایی در قالب اسپری برای درمان بیماری قارچ در پای انگشتان ورزشکاران مورد استفاده قرار گیرد. عصاره اتانولی برگ درخت گردو بر رشد باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه دارای اثر مهاری بود. میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در غلظت‌های مختلف توسط عصاره اتانولی برگ درخت گردو بر رشد باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه ارایه شده است. نتایج حاصل از این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره برگ گردو را به‌خوبی اثبات می‌کند. از آن‌جا که درخت گردو بومی کشور ایران است و برگ و پوسته سبز گردو از محصولات جانبی می‌باشند بنابراین می‌توان از این منابع ارزان قیمت در جهت تولید نگهدارنده‌های طبیعی از جمله اسپری تهیه شده بهره برد. اثبات فعالیت ضد قارچی عصاره برگ گردو بر روی قارچ‌های مورد نظر، این امیدواری را ایجاد نمود تا بتوان این گیاه یا ترکیبات آن را به‌عنوان یک داروی ضد قارچی مناسب با عوارض جانبی احتمالی کم‌تر مدنظر قرار داشت و با انجام تحقیقات بیش‌تر به‌عنوان جایگزینی برای داروهای ضد قارچی با عوارض قابل توجه مورد استفاده قرار داد. که در این راستا اسپری حاوی عصاره برگ گردو برای مقابله با بیماری‌های قارچی به خصوص قشر ورزشکار جامعه را مورد بررسی قرار دادیم. حساس‌ترین گونه کاندیدایی نسبت به عصاره‌های آبی و الکلی برگ گردو، کاندیدا تروپیکالیس بود. کاندیدا آلبیکنس نسبت به سایر گونه‌ها به فلوکونازول حساس‌تر بود، در حالی‌که 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 حالی‌که کاندیدا گلابراتا مقاوم‌ترین گونه نسبت به این دارو بود.

پیشنهاد

با توجه به درمان طولانی مدت بیماری قارچ پا در انگشتان ورزشکاران و بیماری جوش جوانی، باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه به عنوان مهم‌ترین عامل باکتریایی در ایجاد آن و احتمال مقاومت دارویی، می‌توان عصاره برگ گردو را به‌عنوان یک ماده ضد باکتریایی برای درمان بیماری‌های ذکر شده پیشنهاد نمود.

انجام تحقیقات بیش‌تر روی طیف وسیع‌تری 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.

سپاس گذاری

از مسئول محترم امور پژوهشی و بخش تحقیق و توسعه شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز به‌دلیل تامین هزینه و امکانات این طرح و هم‌چنین از کارکنان مرکز رشد فناوری فرآورده‌های گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی استان اردبیل به‌دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

[۱] زرگری. ع، ۱۳۶۹.، گیاهان دارویی. جلد چهارم. انتشارات دانشگاه تهران.

[۲] شرافتی چالشتری، رضا.، شرافتی چالشتری، فرهاد.، زمان‌زاد، بهنام، ۱۳۸۸.، مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (آنتی بیوتاپینگ) استافیلوکوک‌های جداشده از آب‌میوه‌ها (سیب و پرتقال) با الگوی سویه-های استافیلوکوک مجزا شده از نمونه‌های بالینی، شهرکرد، ۱۳۸۶، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره ۱۰ ، شماره۲، صفحات ۵۸-۵۲.

[۳] طباطبایی، م.، دهلوی، ا. و افراسیاب احمدی، ع. ر.، ۱۳۷۱، گردو، هیکوری و پکان.، انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران، صفحه ۴۳۲.

[4] Ajello, L., 1974, Natural history of the dermatophytes and related fungi. Mycopathol Mycol Appl. 1974 Aug 30; 53(1):93-110. Review.

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

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

[7] Alkhawajah, A.M., 1997, Studies on the antimicrobial activity of Juglans regia. American Journal of Chinese Medicibe 25, 175-180.

[8] Amaral, J. S., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valentao, P., Percira, J.A., Ferreres, F., 2004, Phenolic profile in the quality control of walnut (Juglans regia L.) leaves. Food Chemistry . 88(1) ,373 379.

[9] Ames, BN., Shigenaga, MK., Hagen, TM., 2003,Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. PNAS.

[10] Baron, EJ., Finegold, SM., 1990, Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Baily, Scott`s, eds. diagnostic microbiology. New York: Mosby; 4.

[11] Beauquesne, B.L., Pinkas, M., Torck, M. and trotin, F., 1990, Plantes Medicinales des Regions Temerees, 2nd ed. Paris, Maloine, p.58.

[12] Bocco, A., Cuveliner, M. E., Richard, H. & Berset, C., 1998, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. J. Agric. Food chem., 2123-2129.

[13] Brown, D., 1995, Encyclopedia of Herbs and Their Uses. London: Dorling Kindersley.

[14] Bruneton, J., 1993, Pharmacogosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec.& Doc.- Lavoisier, Paris. p. 348.

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

[16] Clinical and laboratory standard institute. performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. USA: NCCLS press; 2005.

[17] Critchfield, JW., Butera, ST., Folks, TM., 1996, Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. AIDS Res Hum Retroviruses; 12: 39.

[18] Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005, Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 26, 343-356.

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

[20] Emami, A., Shams-Ardekani, MR., Nekoei-naeini, N., 2002, [Translation] Valnet J. Phytotherapy, treatment of disease by plants. Tehran: Rahe-Kamal press.

[21] Erdemoglu, N., Kupeli, E., Yesilada, E., 2003, Ant i inf lamma tory and antinociceptive assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 89(1) : 123 129.

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

[23] Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T., 2003, Antioxidative polyphenols from walnuts (Juglans regia L.). Phytochemistry 63, 795 801.

[24] Geissman, TA., 1962, Flavonoid compounds, tannins ,lignins and related compounds. In: Florkin M ,Stotz EH, eds. Pyrrole pigments, isoprenoidcompounds and phenolic plant constituents. NewYork: Elsevier press; 265.

[25] Girzu, M., Carnat, A., Privat, A.M., Fialip, J., Carnat, A.P. and Lamaison, J.L., 1998, Sedative effect of Walnut leaf extract and Juglone, An isolated constituent, Pharmaceutical biology, vol. 36, No. 4, pp. 281-286.

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

[27] Husson, G.P., Vilagines, R., Delaveau, P., 1986, Recherch des properietes antivirals de quelques extraits d, origine naturelle. Ann. Pharm. Fr. 44: 41-48.

[28] Irheidar, H., 1995, Knowledge of Plants. Tehran: Amir Kabir Press; p. 317-319.

[29] Kaur, K., Michael, H., Arora, S., Harkonen, P.L., Kumar, S.,2003, Studies on correlation of antimutagenic and antiproliferative activities of Juglans regia L. Journal of Enviromental Pathology, Toxicology and Oncology. 22(1): 59 67.

[30] Kim, SS., Kim, JY., Lee, HN., 2008, Hyun GC.Antibacterial and anti-inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acne-inducing bacteria. J Gen Appl Microbiol; 54: 101-6.

[31] Kim, SS., Baik, JS., Oh, TH., Yoon, WJ., Lee, LH., Hyun, CG., 2008, Biological activity of Korean Citrus obovoides and Citrus

[51] Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., 2000, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 3396-3402.
[52] Raaman, N., Mathiyazhagan, K., Jegadeesh, R., Divakar, S., Vennila, S., Balasubramanian, K., 2011, Antimicrobial activities of different organic extracts on nul shells of Juglans regia (walnut). Herbal Tech Industry; 8: 20-22
[53] Roberts, DT., 1992, Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey. Br J Dermatol; 126 Suppl 39:23-7.
[54] Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F. and Geronimo, I.M., 2009,Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (Ipomoea batatas) varieties. Food Chemistry, 113: 4, 1133-1138.
[55] Scalbert, A., 1991, Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 1991; 30: 3875-83.
[56] Silva, BM., Andrade, PB., Valentªo, P., Ferreres, F., Seabra, RM., Ferreira, MA., 2004, Quince (Cydonia oblonga Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. J Agric Food Chem; 52: 4705-12.
[57] Solar, A., Colaric, M., Usenik, V., Stampar, F., 2006, Seasonal variation of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shorts of common walnut (Juglans regia L.). Plant Science 170, 543-461.
[58] Thakur, A., 2011, Juglone: A therapeutic phytochemical from Juglans regia L. J Med Plant Res; 5(22): 5324-30.
[59] Tim Cushnie, TP., Lamb, AJ., 2005, Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob; 26: 343-56.
[60] Toda, M., Okubo, S., Ohnishi, R., Shimamura, T., 1989, Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. Jpn J Bacteriol; 45: 561-66
[61] Tsuchiya, HM., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M., 1996, Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Ethnopharmacol: 50: 27-34.
[62] United Nations Industrial Development Organization, Handa SS., Khanuja, SPS., Longo, G., Rakesh, DD., 2008, Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste, Italy: Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.
[63] Urs NVRR, Dunleavy JM. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (Xanthomonas phaseoli var .sojensis, soybeans). Phytopathology. 1975; 65 :90-686.
[64] Van Hellemont, J., 1986, Compendium de phytotherapie. Association PharmaceutiqueBelge, Bruxelles, 214 216.
[65] Watanbe, H., Miyaji, C., Makino, M., Abo, T., 1996, Therapeutic effects of glycyrrhizin in mice infected with LP-BM5 murine retrovirus and mechanisms involved in the prevention of disease progression. Biotherapy; 9: 209-20.
[66] Wei, Q., Ma, X., and Dong, J., 2010, Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 87: 1, 24-28.
[67] Wichtl, M., Bisset, NG., 1994, Herbal Drugs and phytopharmaceuticals. 3th ed. Stuttgart, Germany: Medpharm GmbH.
[68] , 2007, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32. selected herbs. Food Chemistry 105:940-949.
[69] Wichtl, M., Anton, R., 1999. Plantes thérapeutiques. Tec.& Doc., Paris (pp. 291 293).
[70] Ya, C., Gaffney, SH., Lilley, TH., Haslam, E., 1988, Carbohydrate-polyphenol complexation. In: Hemingway RW, natsudaidai essential oils against Acnes- inducing bacteria. Biosci Biotechnol Biochem; 72: 2507-13.
[32] Lachman, J., Orsk, M., Hejtmnkov, A, and Kovrov, E, 2010., Evaluation of antioxidan activity and total phenolics of selected Czech honeys. LWT-Food Science Technology, 43: 1, 52-58.
[33] Margolis, DJ., Bowe, WP., Hoffstad, O., Berlin, JA.,2005, Antibiotic treatment of acne may be associated with upper respiratory tract infections. Arch Dermatol; 141: 1132-36
[34] Mason, TL., Wasserman, BP., 1987, Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. Phytochemistry; 26: 2197-202.
[35] Mehrbanian, S., Majid, A., Majid, I., 2000, Anti microbial effects of three plants (rubia tinctorum, cartamus tinctorius and juglans regia) on some air borne micro organisms. Aerobiologia; 16: 455-8.
[36] Merz, WG., Hay, RJ., 2005, Microbiology and microbial infection, Medical Mycology. 10th ed. Edward Arnold: Topley & Wilson.
[37] Nahrstedt, A., Vetter, U., Hammerschmidt, F.J., 1981, Composition of the steam distillation product from leaves of Juglons rigia. Planta Med. 42: 313-332.
[38] Nariman, F., Eftekhar, F., Habibi, Z., Falsafi, T., 2004, Anti-helcobacter pylori activities of six Iranian plants. Helicobacter; 9: 146-51.
[39] Neef, H., Declercq, P., Laekeman, G., 1995, Hypoglycaemic activity of selected European plants. Phytother Res., 9: 45 48.
[40] Noumi, E., Snoussi, M., Hajlaoui, H., Valentin, E., Bakhrouf, A., 2010, Antifungal properties of Salvadora persica and Juglans regia L.extracts against oral Candida strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 29(1): 81-8.
[41] Olivera, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., and Pereira, J.A., 2007, Hazel (Corylus avellana) leaves as source of antimicrobial and antioxidant compounds. Food Chemistry, 105, 1018-1025
[42] Oliveira, A., Sousa, A., Ferreira, I., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, JA., 2008, Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (juglans regia l.) green huks. Food Chem Toxicol; 46(7): 2326-31.
[43] Pappas, PG., Kauffman, CA., Andes, D., Benjamin, DK., Calandra, TF., Edwards, JE., 2009, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis. Clin Infect Dis; 48(5): 503-35.
[44] Emami, A., Ahi, A., 2008, [Medicinal botany]. Tehran: Iran University of Medical Sciences press.
[45] Pereira, JA., Oliveira, I., Sousa, A., 2007, et al. Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds ,antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chem oxicol; 2287-4595.
[46] Pereira, J., 2007, Walnut (Juglans regia L.) Leaves: phenolic compounds, AntibacterialActivity and Antioxidant Potential of Different Cultivars.
[47] Pereira, JA., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, Ic., Bento, A., Estevinho, L., 2008, Bioactive properties and chemical composition of six walnut (juglans regia L) cultivars. Food Chem Toxicol. 2008; 46: 2103-11.
[48] Pereira, JA., Oliveira, I., Sousa, A., 2007, et al. Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chem Toxicol;45: 2287-95.
[49] Pfaller, MA., Diekema, DJ., Rinaldi, MG., Barnes, R., Hu, B., Veselov, AV., 2005, 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; 43(12): 5848-59.
[50] Phillipson, J.D., 2007, Phytochemistry and pharmacognosy, Phytochemistry, Vol. 68, pp. 2960 2972.

Karchesy JJ, eds. Chemistry and significance of condensed tannins. New York:N.Y. Plenum Press.

[71] Yeung-Him-Che., 1985, Handbook of Chinese Herbs and Formulas. Los Angeles: Institute of Chinese Medicine; p. 2-33.

[72] Zohuri, A., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, S.A., Shahidi, F., 2014, Comparision ps efficiency and natural compounds from red beet by maceration and ultrasonic extraction methods. JFST, 52(13): 50-56.