Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۸ ،شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۸۹، ۸۶-۸۰

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره الکلی پروپولیس بر قارچ‌های کاندیدا و آسپرژیلوس در شرایط آزمایشگاهی

کامبیز دیبا،[1*] بیتا موسوی[2]
محسن محمودی،[3] جمال‌هاشمی[3]

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی ارومیه
۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی کردستان
۳- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم‌پزشکی تهران

[*] نویسنده مسئول: ارومیه، پردیس نازلو، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ‌شناسی
تلفن: ۲۲۷ -۰۴۴۱۲۷۷۰۹۶۹
email: kambiz37diba@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات متعدد نشان داده‌اند بره موم (پروپولیس) به میزان زیادی خواص ضدباکتریایی، ضد پروتوزوئری، ضدقارچی و ضدویروسی دارد و مطالعات انجام شده نیز موید این است که بره موم اثرات درمانی زیادی بر روی بیماری‌های قارچی ازجمله کاندیدیازیس داشته است. مطالعه حاضر به هدف بررسی فعالیت مهارکنندگی رشد و کشندگی عصاره الکلی بره موم بر روی مخمر کاندیدا آلبیکانس و قارچ آسپرژیلوس انجام گرفت. ***روش بررسی:*** از عصاره الکلی خام پروپولیس، رقت‌های سریال به‌صورت ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۶۴۰ در محیط کشت سابورودبراث تهیه شد. سپس در شرایط آسپتیک به هر لوله حاوی رقت‌های مختلف عصاره یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند افزوده شد. کشت‌های مخمری در دمای ^{o}c ۳۰ و کشت‌های آسپرژیلوسی در دمای ^{o}c ۲۵ به‌مدت ۷۲-۲۴ ساعت دمادهی شدند. ***یافته‌ها:*** در این تحقیق مشاهده شد که بیش از نیمی از سوش‌های مخمری تحت‌تاثیر مهارکنندگی غلظت ۰/۲۵g/dl عصاره و تقریباً به همین تعداد تحت‌تاثیر حداقل کشندگی عصاره قرارگرفتند ولی در غلظت‌های ۰/۰۳۱۲g/dl و ۰/۰۶۲۵ این عصاره هیچگونه اثر مهارکنندگی و کشندگی بر روی ایزوله‌های مخمری مشاهده نگردید. در این بررسی آسپرژیلوس فومیگاتوس حتی در مقابل غلظت ۰/۰۳۱۲g/dl به‌طور نسبی مورد اثر واقع شده است ولی در رابطه با آسپرژیلوس نیجر این تاثیر به‌طور نسبی در غلظت ۰/۱۲۵g/dl مشاهده می‌شود. علاوه بر تاثیر کمی عصاره بر رشدکلنی‌های آسپرژیلوسی تغییراتی در برخی خصوصیات مرفولوژیک کلنی بسته به رقت عصاره مشاهده شد. ***نتیجه‌گیری:*** مشاهده میانگین بالای حداقل میزان بازدارندگی عصاره الکلی بره موم بر رشد ایزوله‌های کاندیدیایی و آسپرژیلوسی می‌تواند موید اثر ضدقارچی این ماده باشد.

کلمات کلیدی: پروپولیس، کاندیدا، آسپرژیلوس، مهارکنندگی.

مقدمه

پروپولیس (Propolis) یک محصول طبیعی مشتق از رزین گیاهی تجمع یافته توسط زنبور عسل می‌باشد. این ماده توسط زنبورها ساخته شده در دیواره داخلی کندوها به‌کار می‌رود و عمل محافظت از موم و زنبورها را به‌عهده دارد. بیش از ۳۰۰ ترکیب مختلف نظیر پلی فنل‌ها، آلدیید فنلیک، مونوترپن‌ها، آمینواسیدها، استروییدها و ترکیبات غیر آلی دیگر در ساختار پروپولیس یافت شده‌اند.[1] میزان این ترکیبات به مکان و زمان جمع‌آوری بر موم و منابع گیاهی مورد استفاده زنبور عسل بستگی دارد. فعالیت بیولوژیک پروپولیس به‌طور عمده به ترکیبات فنولی آن نظیر فلاوونوییدها وابسته است. پروپولیس که از زمان‌های بسیار دور به‌عنوان یک داروی سنتی در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شده است می‌تواند خواص آنتی‌باکتریال، آنتی‌توموری، آنتی‌اکسیدان و آنتی ویروس و خواص ضد التهابی داشته باشد.[2] بره موم در شرایط معمولی ماده‌ای است جامد، خمیری و چسبناک به رنگ قهوه‌ای متمایل به سبز تا قهوه‌ای تیره که به منشا رزین‌های تشکیل دهنده و مدت و شرایط نگهداری آن بستگی دارد. بره موم و عصاره‌های آن در درمان بیماری‌ها از جمله روماتیسم، مرض قند، تومورهای سرطانی، آلرژی، آسم، بیماری‌های قلبی-عروقی، ذات‌الریه، آنفلوانزا، زخم معده و زخم‌های واژینیت مزمن کاربرد دارد. بره موم دارای خواص محرک سیستم ایمنی هومورال

www.SID.ir

Archive of SID

وسلولی، بی‌حسی و بیهوشی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، تقویت بافت پیوندی نرم، ممانعت از فعالیت برخی از هیدرولازها، اکسیدوردوکتازها، کینازها همچنین برای نگهداری مواد غذایی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان به‌کار می‌رود.[۳] مطالعات بی‌شماری بر تاثیر بره موم در پیشگیری و درمان بسیاری از عوارض و بیماری‌های مختلف انجام شده است که از جمله به تاثیرات پروپولیس بر روی سلول‌های سرطانی پروستات،[۴] درمان واژنیت مزمن عودکننده[۵و۶] تقویت ایمنی هومورال و سلولی محرک سیستم ایمنی،[۷] اثر ضد فشارخون،[۸] فعالیت آنتی‌اکسیدانی[۹] اشاره کرد. از طرفی نقش موثر بره موم در درمان‌های پریودنتال و عفونت‌های دهان اثبات گردیده است.[۱۰] همچنین مطالعات اخیر خواص ضد باکتریایی، ضد پروتوزوئری، ضد قارچی و ضد ویروسی بره موم را نشان داده‌اند. تاثیر بازدارندگی رشد پروپولیس حداقل روی ۲۱ گونه باکتریایی، ۹ گونه قارچی و سه گونه پروتوزوئری و طیف وسیعی از ویروس‌ها (مثل هرپس و آنفولانزا) دیده شده است.[۱۱] در مطالعه Kok[۱۲] اثر ضد قارچی عصاره اتانولی این ماده در مقابل درماتوفیت‌های ترایکوفیتون روبروم و ترایکوفیتون منتاگروفیتیس در مقایسه با سایر داروهای ضد قارچی مطالعه شد و پروپولیس به‌عنوان یک ماده دارای فعالیت ضد قارچی موثر معرفی شد. همچنین تاثیر عصاره الکلی بره موم برزیلی در غلظت‌های مختلف، بر روی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا تروپیکالیس با تعیین حداقل غلظت مهارکننده MIC به‌خوبی بررسی شده است.[۱۳] Fernandes مطالعاتی در ارتباط با تاثیر بره موم برروی نمونه‌های قارچی و باکتریایی جدا شده از انسان انجام داد.[۳و۴] همچنین بره موم به‌عنوان یک جایگزین مناسب جهت عفونت‌های مزمن واژینال معرفی شده است.[۶] با توجه به وفور روزافزون بیماری‌های قارچی و مشاهده مشکلاتی در کاربرد داروهای کلاسیک و نیز بروز برخی مقاومت‌های دارویی، ضرورت معرفی داروهای جدید و کم عارضه‌تر احساس می‌گردد و لذا در این زمینه می‌بایست تحقیقات گسترده‌ای انجام شود. از جمله قارچ‌های با اهمیت که اخیراً به‌عنوان عوامل فرصت‌طلب در ایجاد عفونت‌های متعدد انسان شیوع یافته‌اند گونه‌های دو جنس کاندیدا و آسپرژیلوس هستند. از آنجایی‌که در هیچ‌یک از مطالعات انجام شده در ایران فعالیتی در جهت تعیین دقیق اثر مهارکنندگی و کشندگی ماده بره موم به‌دست آمده از کندوهای ایرانی بر روی قارچ‌های مذکور انجام نشده است لذا مطالعه حاضر به بررسی دقیق خواص ضد رشد عصاره الکلی پروپولیس که برخی خواص آن در بالا اشاره شده، می‌پردازد و در این زمینه مقادیر واقعی موثر این ترکیب بر روی مهار رشد و مرگ مخمرهای کاندیدا و کپک‌های جنس آسپرژیلوس ارزیابی شده است.

روش بررسی

این مطالعه در مدت شش ماه در فاصله پاییز ۱۳۸۶ تا بهار ۱۳۸۷ در مرکز تحقیقات بهداشتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. مطالعه از نوع تجربی بوده به لحاظ مختصر بودن مراحل کار و نمونه‌ها به‌عنوان Short communication مطرح می‌گردد. مراحل کار به‌ترتیب ذیل توضیح داده شده است.

الف- تهیه عصاره: ماده اولیه خام بره موم یا پروپولیس به‌میزان ۵۰۰ گرم از شرکت دارویی معطر اصفهان خریداری گردید و برای عصاره‌گیری به‌همان مرکز سفارش داده شد که حدود ۱۰ گرم عصاره خام الکلی به‌روش سوکسله فراهم گردید. برای تهیه عصاره نمونه‌های پروپولیس خرد و ۱۰ گرم از آن به دقت توزین شده در یک بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس حجم نمونه به‌وسیله اتانول ۹۶٪ به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و مخلوط به‌خوبی هموژن شد، این عمل روزی دو بار به‌مدت سه روز تکرار گردید، سپس این مخلوط در مکانی گرم و تاریک به‌مدت ۲-۱ هفته نگهداری و پس از این مدت مخلوط صاف گردید و ماده صاف شده به‌مدت یک روز در دمای 4^{oc}-۱ در یخچال قرار گرفت و سپس محلول فیلتر شد و عصاره به‌دست آمده در شیشه در پیچ‌دار و تیره نگهداری گردید. الکل باقی‌مانده در سوسپانسیون به‌دست آمده به‌وسیله دستگاه سوکسله به‌طور کامل جدا شد و عصاره الکلی خالص به‌دست آمد.

ب- استرین‌های مورد مطالعه: استرین‌های مورد مطالعه مطابق اهداف پژوهش از گونه‌های کاندیدا و آسپرژیلوس انتخاب شدند. این ارگانیزم‌ها از نمونه‌های بالینی ارجاعی به بخش قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی تهیه گردیدند. از گونه‌های آسپرژیلوس مورد آزمایش، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* به‌عنوان شایع‌ترین گونه‌های جداسازی شده از نمونه‌های بیماران بررسی شدند و گونه *کاندیدا آلبیکانس* عمده‌ترین گونه مخمری در عفونت‌های انسانی مورد آزمایش قرار گرفت. سویه‌های کاندیدایی از نمونه‌های واژن، پوست، ناخن و خلط

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دست آمد که به‌ترتیب در چهار گروه ده‌تایی بر اساس منبع بررسی شدند. تشخیص گونه‌های مورد بررسی از طریق اختصاصات کشت و مورفولوژی میکروسکوپی و برخی خواص بیوشیمیایی صورت گرفت. به‌علاوه، دو استرین استاندارد شامل:

Candida albicans ATCC10261 و *Aspergillus fumigatus*-TIMM2920 از بانک جهانی استرین‌های استاندارد ژاپن JCM خریداری شدند و مورد استفاده قرار گرفتند.

ج- تهیه سوسپانسیون‌های قارچی: جهت به‌دست آوردن سوسپانسیون‌های یکنواخت یا همگن از غلظت‌های قارچی یک معیار کدورت سنجی به‌نام استاندارد مک فارلند با درجه ۰/۵ به‌کار گرفته شد که ترکیبی حاوی باریوم کلراید و اسیدسولفوریک می‌باشد. سوسپانسیون‌های تهیه شده با کدورت معادل استاندارد مک فارلند ۰/۵ رقیق شده برای گونه‌های کاندیدا تقریباً حاوی 10^5 سلول و برای آسپرژیلوس‌ها حدود 10^3 سلول تخمین زده شد.

د- تهیه رقت‌های سریال از عصاره خام الکلی بره موم:

۱- روش سریال رقت در لوله: رقت‌های فرضی مورد نظر برای در برگرفتن محدوده‌ای از مقادیر مختلف اجزای قارچی به‌صورت ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۶۴۰ انتخاب شدند. برای تهیه غلظت‌های مذکور، تعداد پنج لوله متوسط استریل درپوش‌دار حاوی یک میلی‌لیتر کشت مایع سابورود براث برای هر تست تهیه گردید. سپس رقت اولیه ۱/۱۰ با توزین ۱۰ گرم از عصاره غلیظ بره موم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ایجاد گردید (یک گرم در دسی‌لیتر). از رقت اولیه، یک میلی‌لیتر به اولین لوله سریال هر تست اضافه شد که در این صورت غلظت بره موم در اولین لوله ۱/۲۰ یا ۰/۵g/dl می‌باشد. بدین‌ترتیب با انتقال یک میلی‌لیتر از هر لوله سریال به لوله بعدی و دور ریختن یک میلی‌لیتر از لوله آخر، رقت‌های سریال کاهنده مورد نظر در لوله فراهم گردید.

۲- روش رقت سریال در آگار: در این روش پس از جوشاندن محیط کشت سابورود گلوکز آگار ۴٪ درارلن و استریل کردن آن دراتوکلاو قبل از سرد کردن و انجماد به‌میزان ۹ میلی‌لیتر به پلیت‌های هشت سانتی‌متری انتقال‌یافته سپس از رقت ۱/۱۰ تهیه شده یک میلی‌لیتر به پلیت اول و ۰/۵ میلی‌لیتر به پلیت بعدی و به‌همین ترتیب نصف مقادیر قبلی به تیتر بعدی اضافه شده در نهایت مقادیر کسر شده از ۱۰ میلی‌لیتر حجم پلیت با محیط کشت جبران گردید و بدین‌ترتیب رقت‌های سریال آگار دیلوشن به‌صورت ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۶۴۰ تهیه شدند.

ه- مجاورسازی سوسپانسیون‌های قارچی تهیه شده با رقت‌های عصاره:

ه- ۱) روش سریال رقت در لوله: در شرایط آسپتیک به هر لوله حاوی رقت‌های مختلف عصاره یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی با کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵ افزوده شد. همچنین کنترل‌های مثبت و منفی به‌ترتیب با افزودن یک میلی‌لیتر از عصاره با رقت ۱/۲ ساخته شدند. روش سریال رقت در لوله برای مخمرها به‌کار برده شد.

ه- ۲) روش سریال رقت در آگار: این روش تنها برای آسپرژیلوس‌ها استفاده شد، بدین‌ترتیب که به‌میزان یک لوپ از سوسپانسیون اسپوری (۰/۲٪ آگار و ۰/۰۵٪ توئین ۲۰) به هر پلیت در پنج نقطه جدا از هم تلقیح گردید، تنها در پلیت کنترل منفی هیچ تلقیحی صورت نگرفت و پلیت حاوی کنترل مثبت فاقد رقت عصاره بود. سپس کشت‌های مخمری در دمای 30^{oc} و کشت‌های آسپرژیلوسی در دمای 25^{oc} به‌مدت ۷۲-۲۴ساعت اینکوبه شدند.

ه- ۳) تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی: پس از انکوباسیون ۲۴ساعته لوله‌ها از نظر ایجاد کدورت رشد مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین چشمی کدورت با مقایسه کدورت مک فارلند ۰/۵ انجام گرفت. بدین ترتیب که کدورت تست بیش از کدورت مک فارلند به‌عنوان رشد ارگانیزم و در نتیجه عدم تاثیر عصاره پروپولیس در نظر گرفته شد. در مقابل عدم کدورت در لوله نشان‌دهنده عدم رشد قارچ و تاثیر مثبت مهارکنندگی عصاره در رقت مورد نظر بود.

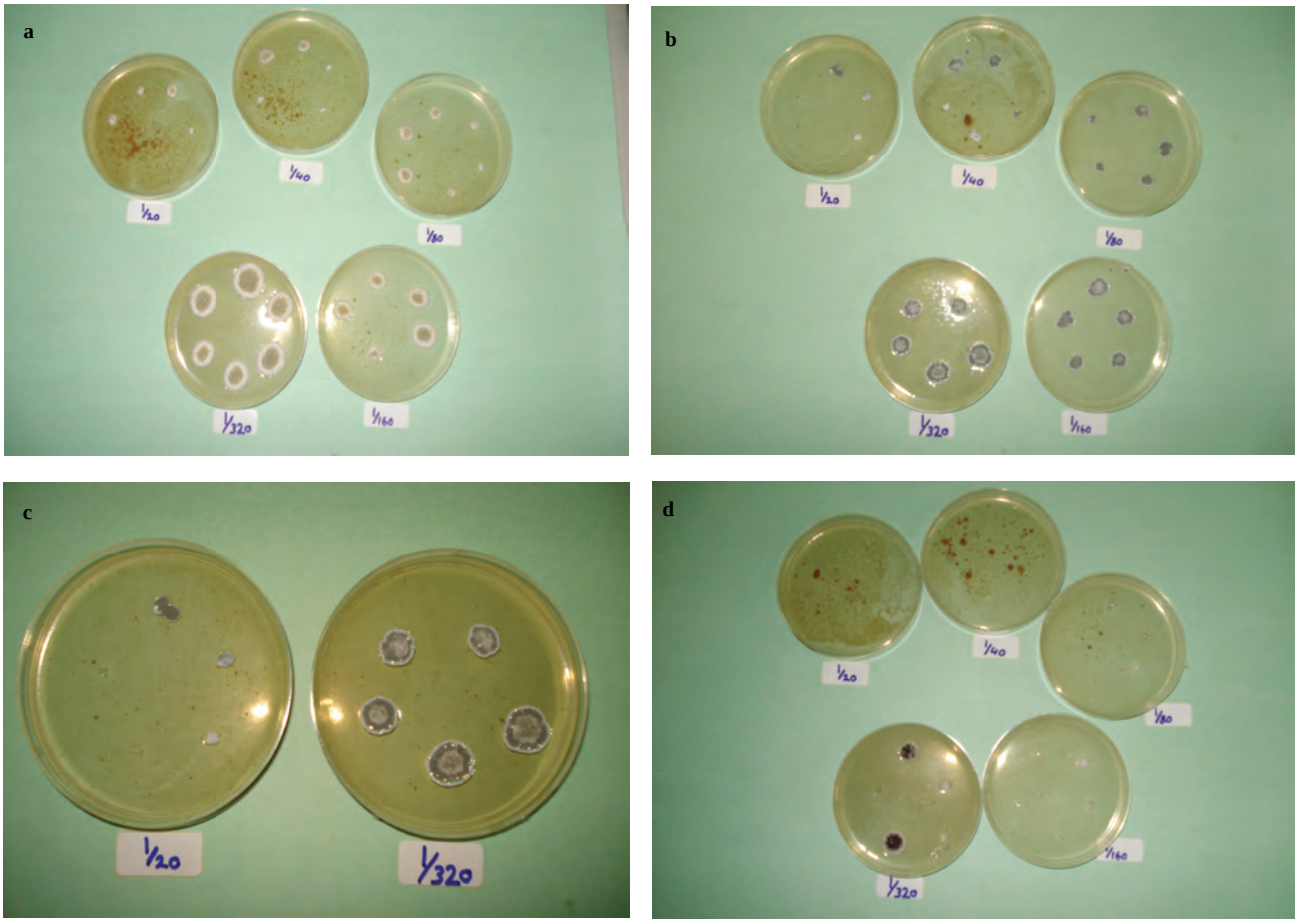
د) تعیین حداقل غلظت کشنده Minimum fungicidal concentration: پس از تعیین MIC حداقل غلظت مهارکننده یا حداقل رقت لوله فاقد کدورت رشد، یک لوپ از محتوای لوله‌های رقت به پلیت‌های حاوی کشت جامد انتقال یافته پس از ۷۲-۲۴ساعت رشد مخمرها یا عدم رشد آن بررسی شد و محیط کشت حاوی حداقل غلظت عصاره که فاقد رشد کلنی می‌باشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی MFC تعیین گردید. در نهایت داده‌های مربوط به حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده برای سویه‌های یک گونه مورد مطالعه مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفته، میانگین مقادیر تعیین شده به‌صورت MIC و MFC توتال گزارش گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

بررسی اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی عصاره الکلی بره موم بر روی ۴۰ ایزوله از گونه کاندیدا آلبیکانس و نیز ۱۸ ایزوله آسپرژیلوسی شامل: *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* انجام گرفت. نتیجه اثردهی رقت‌های ۱/۲۰ تا ۱/۶۴۰ عصاره بر روی سوسپانسیون‌های مخمری با کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵ در جدول ۲ نشان داده شده است. چنان‌که ملاحظه می‌گردد بیش از نیمی از سویه‌ها تحت تاثیر مهارکنندگی رقت ۱/۴۰ (MIC ۰/۲۵g/dl) عصاره قرار گرفته‌اند و همچنین حداقل غلظت کشنده عصاره نیز در بیش از نیمی از ایزوله‌ها MFC ۰/۲۵g/dl تعیین گردید. البته بایستی توجه داشت که تعداد کمتری از سویه‌ها تحت اثر کشندگی بالاتری نسبت به اثر مهارکنندگی قرار گرفته‌اند. مشاهدات ما نشان می‌دهد که رقت‌های ۱/۶۴۰ و ۱/۳۲۰ از عصاره بره موم اثر مهارکنندگی و کشندگی برروی ایزوله‌ها نداشته‌اند و در مقابل رقت ۱/۲۰ عصاره اثر مهارکنندگی برروی تمام سوش‌ها دارد (۰/۵g/dl MIC) و به استثنای یک‌مورد این رقت عصاره اثر کشندگی بر تمام سویه داشته است. اثردهی رقت‌های مذکور عصاره برروی گونه‌های



شکل-۱- a: سیر تغییرات مورفولوژیک *آسپرژیلوس فلاووس* (رنگ کلونی و اسپور زایی) از رقت ۱/۲۰ تا ۱/۳۲۰ عصاره پروپولیس. چنان‌که ملاحظه می‌شود قطر کلنی‌ها و میزان رنگ‌زایی و اسپور زایی با افزایش غلظت عصاره کاهش قابل ملاحظه یافته است. b: تغییرات مورفولوژیک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از رقت ۱/۲۰ تا ۱/۳۲۰ عصاره د. در این شکل تغییرات رشد شدید در غلظت‌های بالای عصاره دیده می‌شود، در صورتی‌که غلظت‌های پایین‌تر تنها تغییرات مورفولوژیک را شامل می‌گردند. c: مقایسه تغییرات مورفولوژیک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در دو رقت ۱/۲۰ و ۱/۳۲۰ عصاره پروپولیس نشان‌دهنده اثر غلظت عصاره بر چگونگی رشد می‌باشد. d: سیر تغییرات رشد *آسپرژیلوس نایجر* از رقت ۱/۲۰ تا ۱/۳۲۰ عصاره که علاوه بر خصوصیات مورفولوژیک، رشد و تشکیل کلنی را نیز مورد تاثیر قرار داده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول- ۱: مقادیر میانگین MFC عصاره الکلی پروپولیس بر روی گونه‌های مختلف آسپرژیلوس

گونه‌ها	تعداد ایزوله‌ها	میانگین حداقل غلظت کشندگی (MFC)
آسپرژیلوس فلاووس	۱۱	۰/۰۶۲۵g/dl
آسپرژیوس نایجر	۲	۰/۱۲۵g/dl
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۵	۰/۰۳۱۳g/dl

آسپرژیلوس با روش رقت آگار نتایج متفاوتی را با توجه به تغییرات گونه‌ها در برداشت. چنان‌که در مورد *آسپرژیلوس فلاووس*، بیش از نیمی‌از سویه‌ها تحت تاثیر کامل رقت ۰/۱۲۵ و نیمی تحت اثر نسبی رقت ۰/۰۶۲۵ عصاره قرار گرفته‌اند، به این معنی که رشد کاملاً متوقف نگردیده است و به صورت کلنی‌های کوچک با رشد بطئی ملاحظه می‌گردد. *آسپرژیلوس فومیگاتوس* حتی در مقابل رقت ۰/۰۳۱۳ عصاره به‌طور نسبی موثر بود و بالاخره تاثیر عصاره بر *آسپرژیلوس نایجر* به‌طور نسبی با رقت ۰/۰۶۲۵ مشاهده گردید (جدول ۱). در روش سریال رقت در آگار، علاوه بر تاثیر کمیّتی عصاره بر رشد کلنی، تغییرات در خصوصیات مورفولوژیک کلنی شامل رنگ، میزان اسپورزایی و قطر کلنی نیز بسته به رقت عصاره نیز قابل مشاهده بود (شکل ۱). هرچند که این تغییرات خصوصیات مورفولوژیک میکروسکوپی قارچ را بر نمی‌گرفت.

بحث

فعالیت ضد قارچی ماده بره موم یا پروپولیس در معالجه بیماران مبتلا به اونیکومیکوزیس،[۱۴] و به‌عنوان یک داروی گیاهی مقرون به صرفه برای پروفیلاکسی ولوواژینیت نشان داده شده است.[۱۵و۱۶] در یک بررسی در ایران اثرات ضد درماتوفیتی بره موم تایید شده است.[۱۷] همچنین تاثیر عصاره الکلی بره موم برزیلی در غلظت‌های مختلف، بر روی *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا ترروپیکالیس* با تعیین (MIC) به‌خوبی بررسی شده است.[۱۴] در مطالعه حاضر بازدارندگی رشد عصاره الکلی بره موم بر روی گروهی از قارچ‌های مخمری و کپکی مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌های مورد مطالعه عمدتاً از *کاندیدا آلبیکنس* هستند و مطابق نتایج تحقیق، میانگین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره بر روی ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکانس* ۰/۲۵g/dl،

جدول- ۲: مقادیر MIC و MFC عصاره الکلی پروپولیس بر روی ایزوله‌های مختلف کاندیدا آلبیکانس

ایزوله‌های کاندیدا آلبیکانس (۴۰ ایزوله)	میانگین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)	میانگین حداقل غلظت کشندگی (MFC)
واژن- گروه ۱ (۱۰-۱)	۰/۰۶۲۵g/dl	۰/۲۵g/dl
پوست- گروه ۲ (۲۰-۱۱)	۰/۲۵g/dl	۰/۲۵g/dl
ناخن- گروه ۳ (۳۰-۲۱)	۰/۲۵g/dl	۰/۲۵g/dl
خلط- گروه ۴ (۴۰-۳۱)	۰/۲۵g/dl	۰/۵g/dl

می‌باشد که در واقع نشان‌دهنده مقاومت نسبی سویه‌های *کاندیدا آلبیکانس* به این ماده می‌باشد. این یافته مورد تایید مطالعات گذشته می‌باشد.[۱۸] میانگین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره پروپولیس بر روی ایزوله‌های *آسپرژیلوس فلاووس* ۰/۰۶۲۵g/dl، بر ایزوله‌های *آسپرژیلوس نایجر* ۰/۱۲۵g/dl و بر روی ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۰/۰۳۱۳g/dl تعیین گردیده است که نشان‌دهنده تفاوت قابل ملاحظه در حساسیت به پروپولیس میان گونه‌های آسپرژیلوس مهم بیماری‌زا می‌باشد. توجه به این نکته قابل اغماض نیست که فعالیت پروپولیس در مقابل بیماری‌زاترین گونه آسپرژیلوس یعنی *اسپرژیلوس فومیگاتوس* چشمگیر است. در واقع این گونه قارچ به‌دلیل توانایی رشد و مقاومت در دمای بالاتر از 40^{oc} و همچنین قدرت تهاجم مستقیم به عروق خونی ناحیه ریه و چندین عامل ویرولانس دیگر به‌عنوان مهمترین عامل قارچی عفونت مهاجم ریه مطرح است و بایستی این نکته را هم ذکر نمود که گونه‌های آسپرژیلوس انتشار زیادی در محیط‌های بیمارستانی شامل بخش‌های جراحی، مراقبت ویژه و اتاق‌های عمل به‌خصوص در مواردی که ساخت و ساز و تعمیرات ساختمانی در محوطه‌های بیمارستانی جریان دارد، می‌یابند[۱۹] و تماس تنفسی بیماران بستری یا تحت عمل با این قارچ‌ها اجتناب‌ناپذیر است و با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تاثیر پروپولیس بر گونه‌های آسپرژیلوس به‌عنوان مرگ‌بارترین قارچ‌های فرصت‌طلب بیمارستان‌ها انجام نشده است، نتایج این مطالعه قابل تعمق است. نتایج این بررسی حاکی از تغییر در خصوصیات مورفولوژیک در ایجاد کلنی گونه‌های آسپرژیلوسی شامل رنگ، میزان اسپور زایی و قطر کلنی بسته به رقت عصاره می‌باشد (شکل ۱). هر چند که این تغییرات خصوصیات میکروسکوپی قارچ را شامل نمی‌شوند. تفاوت‌های قابل مشاهده در

www.SID.ir

Archive of SID

توان بازدارندگی عصاره الکلی بره موم با توجه به شرایط یکسان در آزمایشات می‌تواند حاکی از تفاوت‌های فیزیکی و ساختمان سلولی باشد. ساختار دیواره سلولی قارچ‌ها به‌طور کلی شامل گلوکان، کیتین، کیتوزان، گالاکتان و مانان می‌گردد که اختلافات ساختار دیواره در میان جنس‌ها و گونه‌های قارچی قابل ملاحظه می‌باشد. مهم‌ترین تفاوت‌ها از این نقطه نظر در بین مخمرها و کپک‌ها مشاهده می‌شود. اما نتایج ما نشان می‌دهد علاوه بر تفاوت اثر مهارکنندگی در سطوح جنس و گونه، اختلافات درون گونه‌ای نیز در نوع واکنش به اثر بازدارندگی عصاره بره موم دیده می‌شود، به‌طور نمونه تمامی ایزوله‌های متعلق به گونه *کاندیدا آلبیکانس* در مجاورت عصاره مهار رشد یکسان نشان نمی‌دهند (جدول ۲). از طرفی می‌توان شاهد اثر یکسان عصاره بر رشد ایزوله‌هایی از گونه و جنس‌های ناهمسان بود، به این ترتیب می‌توان گفت که تاثیر بازدارندگی بره موم چندان دستخوش تغییرات ساختاری بین گونه‌ای و جنس نمی‌گردد. چنان‌که خاصیت کشندگی بره موم برای *کاندیدا آلبیکنس* از طریق مهار فعالیت فسفولیپازی قارچ توصیف گشته است،[۵و۸] همچنین نقش عوامل مختلف را بر ماهیت و میزان مهارکنندگی عصاره بره موم نمی‌توان از نظر دور داشت و عواملی چون اختلافات فیزیولوژیک و تفاوت ساختاری درون گونه‌ای، اکتساب مقاومت ژنتیکی و خطاهای آزمایشگاهی و فردی مورد نظر هستند. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، مشاهده میانگین بالای اثر حداقل میزان بازدارندگی عصاره الکلی بره موم، بر رشد ایزوله‌های کاندیدایی و آسپرژیلوسی می‌تواند موید اثر ضد قارچی این ماده باشد، تحقیقات بیشتر امکان آن را فراهم خواهد کرد که ماده بره موم یا پروپولیس مورد استفاده دارویی قرار گیرد.

References

1. Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006;7(1):22-31.
2. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008;73(9):R117-24.
3. Fernandes FF, Dias AL, Ramos CL, Ikegaki M, de Siqueira AM, Franco MC. The "in vitro" antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on Cryptococcus neoformans. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007;49(2):93-5.
4. Sforcin JM, Fernandes A Jr, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000;73(1-2):243-9.
5. D'Auria FD, Tecca M, Scazzocchio F, Renzini V, Strippoli V. Effect of propolis on virulence factors of Candida albicans. *J Chemother* 2003;15(5):454-60.
6. Imhof M, Lipovac M, Kurz Ch, Barta J, Verhoeven HC, Huber JC. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;89(2):127-32.
7. Sforcin JM, Fernandes A Jr, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000;73(1-2):243-9.
8. Brätter C, Tregel M, Liebenthal C, Volk HD. Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: a clinical pilot study. *Forsch Komplementarmed* 1999;6(5):256-60.
9. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem* 2004;52(24):7286-92.
10. Gebaraa EC, Pustiglioni AN, de Lima LA, Mayer MP. Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. *Oral Health Prev Dent* 2003;1(1):29-35.
11. Marquele FD, Stracieri KM, Fonseca MJ, Freitas LA. Spray-dried propolis extract. I: physicochemical and antioxidant properties. *Pharmazie* 2006;61(4):325-30.
12. Silici S, Koç NA, Ayangil D, Cankaya S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *J Pharmacol Sci* 2005;99(1):39-44
13. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Z Naturforsch C* 1999;54(5-6):401-5.
14. Oliveira AC, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TI. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(5):493-7.
15. Quiroga EN, Sampietro DA, Soberón JR, Sgariglia MA, Vattuone MA. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* 2006;101(1):103-10.
16. Hronek M, Vachtlová D, Kudlácková Z, Jílek P. Antifungal effect in selected natural compounds and probiotics and their possible use in prophylaxis of vulvovaginitis. *Ceska Gynekol* 2005;70(5):395-9.
۱۷. ضیاء محمدعلی، منانی رضا، محمودی محسن، بیات منصور، فرهاد محقق. بررسی تاثیر عصاره الکلی بره‌موم حاصل از کندوهای زنبور عسل ایران بر رشد تریکوفیتون متاکروفیتس، تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون وروکوزوم. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان: ۱۳۸۸، سال ۹۵: صفحات ۲۳۲ تا ۲۴۱.
18. Silici S, Koç NA, Ayangil D, Cankaya S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *J Pharmacol Sci* 2005;99(1):39-44.
19. Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, P faller MA. Clinical Mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 3-12.

www.SID.ir

Archive of SID

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 2, May 2010: 80-86

In-vitro anti fungal activity of Propolis alcoholic extract on *Candida spp.* and *Aspergillus spp.*

Kambiz Diba Ph.D.[1*]
Bita Mousavi Ph.D.[2]
Mohsen Mahmoudi MSPH[3]
Jamal Hashemi Ph.D.[3]

1- Department of Parasitology & Medical Mycology, School of Medicine, Uromia University of Medical Sciences.
2- Department of Parasitology & Medical Mycology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences.
3- Department of Parasitology & Medical Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences.

[*] Corresponding author: Department of Parasitology & Medical Mycology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Uromiae, Iran.
Tel: +98-912-4464972
email: kambiz37diba@gmail.com

Received: February 01, 2010 Accepted: April 04, 2010

Abstract

Background: Several studies have shown that propolis has antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic activity. Furthermore propolis has been described to have medicinal usages in some fungal infections like Candidiasis. Our aim is to study the inhibitory effects of alcoholic extract of propolis on *Candida spp.* and *Aspergillus spp.*
Methods: To determine inhibitory and fatality dose of propolis extract, we prepared serial dilution of the extract including 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 and 1/640 in 1 ml of liquid medium sabouraud broth. Given numbers of Candida yeasts in 1ml were added to above dilution tubes. *Candida* and *Aspergillus* cultures were incubated at 30°C and 25°C respectively for 24-72 hours.
Results: We obseved that the concentration of 0.25 g/dl of propolis extract showed an inhibitory and killing effect on more than 50% of the isolates. But there were no inhibitory and killing by the concentrations 0.0312 g/dl and 0.0625 g/dl on *Candida* isolates. Our findings showed that 0.0312 g/dl of the extract was partially active on *Aspergillus fumigatus* and dilution of 0.125 g/dl was active on *Aspergillus. niger*. In the agar dilution method, some changes were observed on morphological features (depends on the extract dilution) as well as quantitative effects of dilution of extract on the colonies.
Conclusion: We found that the alcoholic extract of propolis had a prominent antifungal activity and inhibitory effect on *Candida* and *Aspergillus* isolates.

Keywords: Propolis, *Candida, Aspergillus*, inhibitory.

www.SID.ir