● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره دهم، شمارهٔ ۵، آذر – دی ۱۳۸۷، صفحه ۲۲-۱۵

اثر عسل شمال ایران بر کاندیدا آلبیکانس

سعید مهدوی عمران*[۱]، قربان ملیجی[۲]، سیدعلی اصغر سفیدگر[۱]، محمدرضا یوسفی[۳]، محمود حاجی احمدی[۴]، سیدجواد موسوی[۵]، مریم السادات شفیعی[۶]

۱- استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۳- عضو هیأت علمی گروه انگل شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل ۴- عضو هیأت علمی گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۵- کارشناس آزمایشگاه ۶- کاردان آزمایشگاه

سابقه و هدف: نظر به افزایش مقاومت گونه های کاندیدا به داروهای ضد قارچی در بعضی از مبتلایان به کاندیدیازیس، مطالعه ترکیبات با منشأ طبیعی رواج یافته است. عسل ترکیبی است که دارای اثرات ضد کاندیدایی می باشد و تحقیق حاضر با هدف تعیین نقش عسل در مهار رشد کاندیدا در شرایط آزمایشگاهی و کاربرد احتمالی آن انجام گرفت.

مواد و روشها: در این بررسی پس از تعیین برخی از خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی و میکروبی چهار نوع عسل شمال ایران، رقت های ۷۵-۱۵٪ از این نوع عسل ها و رقت های ۱۶- ۰/۰۰۸ میکروگرم در هر میلی لیتر از داروی ضد قارچی آمفوتریسین ب و رقت های ۱۲۸- ۰/۰۶ میکروگرم در هر میلی لیتر از داروی فلوکونازول به همراه دو گونه کاندیدا آلبیکانس و یک گونه کاندیدا دابلینینسیس در میکروپلیت کشت شدند. میکروپلیت ها در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با حرکت (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ٤٨ ساعت نگه داری شدند. با کشت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حفره های شفاف، حداقل غلظت آنها برای مهار رشد (MIC) و یا مرگ (MFC) کاندیدا ها بدست آمد. تفاوت مهار رشد با استفاده از روش های t-Student و Mann-Whitney و ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته ها: در تلقیح عسل ها روی محیط های کشت، هیچ گونه ارگانیسم قارچی و یا باکتریایی رشد نکرد. انواع مختلف عسل در رقت های ۲۵-۲۰٪، ۳۰-۱۵٪ توانستند رشد گونه های مختلف کاندیدا را به ترتیب در دمای۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد حداقل به میزان ۵۰٪ و در طیف ۷۰-٤۰٪ و ۷۰-٤۵٪ به میزان ۱۰۰٪ مهار کنند. اختلاف معنی داری بین اثر مهار کنندگی عسل ها مشاهده نشد. آمفوتریسین ب در دمای۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد به ترتیب در رقت های ۰/۱۲۵-۰/۰۳ و ۰/۰۶-۰/۰۳ میکروگرم در هر میلی لیتر حداقل به میزان ۵۰٪ و در رقت های ۰/۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر به طور کامل رشد کاندیداها را مهار کرد. این مقادیر برای فلوکونازول ٤- ۲ و ۰/۵-۰/۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر برای مهار ۵۰٪ و ٦٤- ۳۲ و ۳۲- ۱٦ میکروگرم در هر میلی لیتر برای مهار کامل رشد کاندیداها بود.

نتیجه گیری: با توجه اثر مهاری عسل ها بخصوص نوع مانده حرارت ندیده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد روی رشد گونه های کاندیدا بویژه گونه دابلینینسیس، امکان استفاده از عسل در درمان عفونت های تجربی وجود خواهد داشت.

واژه های کلیدی: *عسل، کاندیدا، حداقل غلظت مهار کنندگی قارچ، حداقل غلظت کشندگی قارچ.*

دریافت: ۸۷/۳/۲۰، ارسال جهت اصلاح: ۸۷/۴/۱۹، پذیرش: ۸۷/۶/۲۷

مقدمه

افزایش مقاومت گونه های کاندیدا به داروهای ضد قارچی در مبتلایان به کاندیدیازیس (۳- ۱)، سبب گسترش تحقیق روی استفاده از داروهای ضد قارچی با منشاء طبیعی شده است. این ترکیبات علاوه بر اثر درمانی مناسب دارای آثار سوء کمی بوده و

▣ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۷۱۱۹۷۲٤۳۵ از اعتبارات دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]

نتایج آزمایشگاهی و بالینی تعدادی از آنها در مهار رشد گونه های مختلف قارچی از جمله کاندیدا امیدوار کننده بوده است (۶- ۴). در این بین بررسی روی عسل که ترکیبی با منشاء گیاهی است و در فرهنگ های مختلف به صورت خوراکی و یا برای تهیه مواد دارویی و آرایشی مورد استفاده قرار می گیرد، جایگاه ویژه ای دارد (۹- ۷). استفاده از این ترکیب در بسیاری از فرهنگ ها و تمدن ها به زمانهای بسیار دور برمی گردد و ارسطو نیز به استفاده از این ماده برای درمان زخم بستر و عفونت های ناشی از سوختگی اشاره نموده است (۱۰). بعضی از محققین نشان داده اند که غلظت های بالای عسل دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و سبب مهار رشد بعضی از باکتریها و قارچ ها می شود (۱۱و۸). این اثرات وابسته به وجود بعضی از عوامل ترکیبات موجود در عسل از جمله اسمولاریته بالا (۱۲و۱۰)، هیدروژن پراکسید (۱۳) و اسیدیته بالا (۱۱) می باشد. محققین با استفاده از تجربیات آزمایشگاهی، از عسل در درمان بعضی از بیماریها همچون زخم های ناشی از عمل جراحی (۱۴)، زخم های پوستی (۸) و عفونت معده و روده باریک پس از عمل جراحی (۱۲) استفاده نمودند.

در مطالعه حاضر با هدف کاربرد احتمالی عسل، اثر ضد کاندیدایی تعدادی از عسل های پاییزه کوهستان های شمال ایران که دارای تنوع گیاهی مناسبی است با استفاده از روش استاندارد میکرودایلوشن مورد استفاده قرار داد تا در صورت داشتن آثار مفید از آن برای طراحی کاربردهای بالینی کنترل شده در حیوانات آزمایشگاهی سود جست.

مواد و روشها

قارچ ها: در مطالعه حاضر دو ایزوله کاندیدیا آلبیکانس و یک ایزوله کاندیدا دابلینینسیس که از دانشگاه های تهران و تربیت مدرس (تهران، ایران) تهیه شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. این گونه ها با استفاده از روش های معمول تأیید گونه شدند. آنگاه سوسپانسیون ۴۸ ساعته مخمرها با استفاده از سرم فیزیولوژی تهیه و تعداد نهایی مخمر زنده جهت تلقیح با استفاده از لام شمارش گلبولی هموسیتومتر نئوبار به ۵×۱۰^{۲} –$۲/۵\times۱۰^{۳}$ رسانده شد.

عسل ها: چهار نوع عسل پاییزه شامل عسل تازه حرارت دیده و حرارت ندیده و عسل قدیمی تر (با قدمت بیش از ۶ ماه) حرارت دیده و حرارت ندیده از منطقه کوهستانی شمال ایران (شرکت عسل گلیران، بابل، ایران) مورد استفاده قرار گرفت. این نمونه ها در طول آزمایش در ظروف در بسته و در جای تاریک قرار داشتند. روی این عسل ها برخی آزمایشات فیزیکی و بیوشیمیایی شامل میزان رطوبت، قند، خاکستر و اسیدیته در آزمایشگاه موادغذایی معاونت دارو و غذای دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام گرفت. به منظور بررسی آلودگی اولیه عسل به میکروارگانیسم ها، مقدار ۵۰µl از هر نمونه عسل در دو سری روی پلیت های حاوی محیط سابورو دکستروز آگار (تهیه شده از شرکت مرک) کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردیدند.

داروها: برای کنترل و مقایسه اثر ضد کاندیدایی عسل با داروهای ضد کاندیدایی متداول، غلظت ۱۲/۸mg/ml از آمفوتریسین ب (شرکت سیگما) و فلوکونازول (شرکت فوجی ژاپن) به ترتیب با حل کردن آنها در دی متیل سولفوکساید (یا DMSO، شرکت سیگما) و آب مقطر تهیه و در مقادیر کم تا زمان مصرف در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۵).

روش میکرودایلوشن: روش توصیه شده توسط کمیته ملی استاندارد سازی آزمایشگاه ها (NCCLS) برای میکرودایلوشن در محیط مایع با استفاده از محیط RPMI 1640 (همراه با L-glutamine، بدون بیکربنات و دارای شاخص اسیدیته، شرکت جیبکو آمریکا) که به آن به میزان ۲ گرم در لیتر و بافر ۳- ان مورفولینو پروپیونو سولفونیک اسید (MOPS) به میزان ۳۴/۵۳g/L (شرکت سیگما) اضافه شده بود، مورد استفاده قرار گرفت (۱۵و ۱۶). آزمایش میکرودایلوشن با استفاده از میکروپلیتهای ۹۶ خانه استریل در دار ته گرد (شرکت Sarstedt آمریکا) انجام گرفت. در این روش ۱۲ رقت مختلف عسل به فاصله ۵٪ و با استفاده از محیط کشت RPMI 1640 در ظروف استریل به صورت جداگانه طوری به دست آمد که رقت نهایی آن در ۲۰۰µl بمیزان ۷۵-۱۵٪ حجمی – حجمی برسد (مقادیر بدست آمده از دانسیته عسل در محاسبه درصد حجمی– حجمی عسل برای آزمایش میکردایلوشن در محیط مایع بکار رفت). این نمونه ها به میزان ۱۸۰µl به هر حفره اضافه شد. در مورد داروها پس از ریختن ۱۰۰µl از محیط کشتRPMI 1640 در هر حفره، ۱۰۰µl از غلظت مناسب دارو به حفره اول هر ردیف از میکروپلیت اضافه شد، آنگاه رقت دو برابر داروها با غلظت نهایی ۱۶µg/ml–۰/۰۰۸ و ۱۲۸ µg/ml–۰/۰۶ بترتیب برای آمفوتریسین

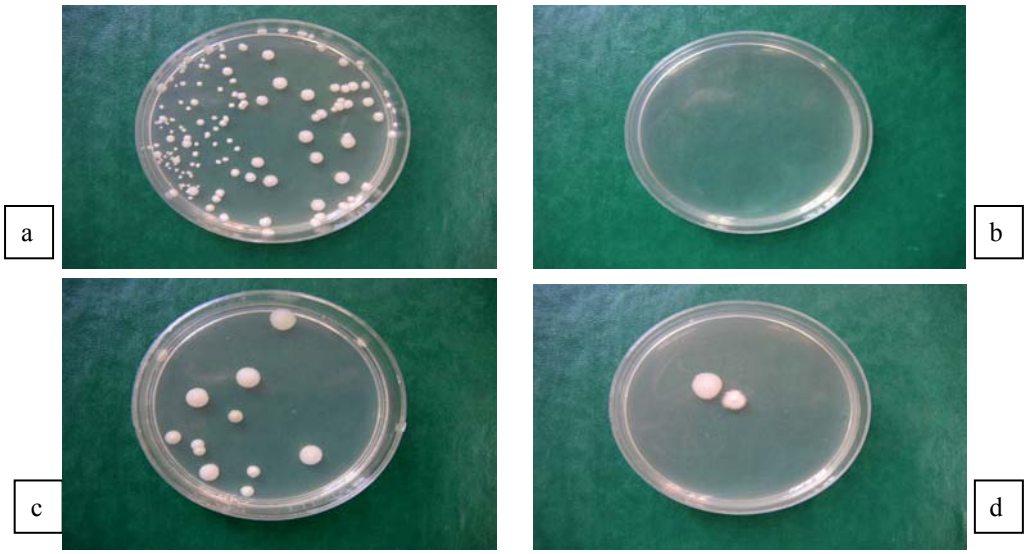
[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]

ب و فلوکونازول به دست می آمد. سوسپانسیون قارچی با غلظت نهایی cells/ml $۲/۵\times۱۰^{۲}$–۵×۱۰^{۳} مخمر زنده به میزان ۲۰µl برای نمونه های حاوی عسل و ۱۰۰µl برای نمونه های دارو به هر یک از حفره ها اضافه می شد. کنترل حلال (DMSO) به میزان ۱٪ (مشابه بیشترین میزان غلظت حلال در نمونه ها) به همراه کنترل های مثبت (محیط کشت حاوی قارچ و فاقد دارو یا عسل) و منفی (محیط کشت فاقد قارچ و دارو) نیز در نظر گرفته شد. همه نمونه ها و کنترل در ۲ سری تهیه و جداگانه در ۲ انکوباتور شیکر دار با حرکت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

بعد از گذشت زمان مورد نظر ۱۰µl از محتویات حفره های شفاف و نیز حفره های کنترل، در پلیت های استریل یکبار مصرف (با قطر ۶ سانتی متر) حاوی محیط سابورو دکستروز آگار به همراه کلرامفنیکل کشت و با استفاده از ۱ میلی لیتر از آگاروز ۰/۶٪ مایع (از شرکت مرک) با دمای نزدیک به ۴۵ درجه سانتی گراد در سطح پلیت پخش می شد. پلیت ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری می شدند. پس از رشد کاندیدا در هر پلیت، با مقایسه تعداد کلنی آن با تعداد کلنی رشد کرده در پلیت حاوی نمونه های کنترل مثبت، حداقل غلظت مهار کننده رشد قارچ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) و حداقل غلظت کشنده قارچ (Minimum Fungicidal Concentration, MFC) برای عسل و یا داروها به دست می آمد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون Student- test و Mann-Whitney برای مقایسه دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد؛ آنالیز واریانس و Kruskal-Wallis برای مقایسه انواع عسل ها، تفاوت بین گروه ها در صورتی معنی دار تلقی می شد که $p<۰/۰۵$ باشد.

یافته ها

هیچ ارگانیسمی در کشت عسل ها روی پلیت حاوی محیط سابورو دکستروز آگار رشد نکرد. آزمایش برخی از خصوصیات عسل ها نشان داد که گرچه این عسل ها دارای شباهت هایی بودند، ولی میزان ساکاروز عسل تازه حرارت دیده و خاکستر عسل تازه حرارت ندیده بالاتر از دیگر عسل ها بوده است (جدول شماره۱). عسل ها در محیط مایع و با فاصله ی ۵٪ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تا رقت ۲۰٪ رشد گونه های کاندیدا را به میزان ۵۰٪ مهار کردند و اثر مهاری رشد آنها به میزان ۹۰٪ در غلظت های ۵۵–۳۰٪ عسل مشاهده شد. در این دما توقف کامل رشد کاندیداها در طیف ۷۰–۴۰٪ دیده شد. در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مهار ۵۰٪ از رشد کاندیدا در رقت های ۳۰–۱۵٪ عسل و مهار ۹۰٪ از رشد کاندیدا در محدوده ی رقت ۵۰–۳۵٪ عسل دیده شد. عسل در محدوده ی ۷۰–۴۵٪ توانست به طور کامل رشد قارچ را مهار کند (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۲).



شکل شماره ۱. پلیت های حاصل از کشت حفره های شفاف: a کنترل مثبت (حاوی قارچ و محیط کشت)، b کنترل منفی (حاوی محیط کشت)، c نمونه (حاوی غلظتی از قارچ که رشد ۵۰٪ از کاندیدا را مهار کرده است، MIC_{50}) و d نمونه (حاوی غلظتی از قارچ که رشد ۹۰٪ از کاندیدا را مهار کرده است، MIC_{90}).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]

جدول شماره ۱. برخی از خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی چهار نوع عسل مورد آزمایش

نوع آزمایش / نوع عسل	درصد قندهای احیا (گلوکز + فروکتوز)	درصد ساکاروز	بریکس	pH	درصد رطوبت	درصد خاکستر	دانسیته
تازه حرارت ندیده	۷۳/۹	۸	۸۰	۳/۹	۱۸/٤	۰/۲۹	۱/۲۹
تازه حرارت دیده	۷۵	۱۵	۸۰	۳/۹۸	۱۸/٤	۰/۲۵	۱/۳۱
مانده حرارت ندیده	۷۳/۸	۳/٦	۸۱	۳/۷۷	۱۷/٤	۰/۲۳	۱/۲۹
مانده حرارت دیده	۷۳/۸	٤/٤٦	۸۰	۳/۸۸	۱۸/٤	۰/۲۷	۱/۲۹

جدول شماره ۲. نتایج اثر مهاری عسل‌ها داروها روی رشد کاندیدا به روش میکرودایلوشن

نوع قارچ	۲۵ درجه سانتی گراد			pvalue	۳۷ درجه سانتی گراد			pvalue
حداقل غلظت مهار نوع عسل و یا دارو	۵۰٪h	۹۰٪ i	۱۰۰٪ j		۵۰٪	۹۰٪	۱۰۰٪	
عسل۱d	۲۰٪k	٤۰٪	۷۰٪		۲۵٪	٤۰٪	٦۵٪	
عسل۲e	۲۰٪	٤۰٪	۵۰٪		۲۰٪	٤۰٪	٤۵٪	
عسل۳f	۲۵٪	۳۵٪	۷۰٪		۳۰٪	۳۵٪	۷۰٪	
قارچ ۱a عسل٤g	۲۰٪	٤۵٪	۵۵٪	۱	۲۵٪	٤۵٪	۵۰٪	۰/۷۱۳
آمفوتریسین ب	۰/۱۲۵l	۰/۲۵	۰/۵		۰/۰۳	۰/۰٦	۰/۱۲۵	
فلوکونازول	۲	۸	۳۲	۰/۱۳	۰/۲۵	۱	۳۲	۰/۰۱۵
عسل ۱	۲۰٪	٤۰٪	۵۵٪		۳۰٪	٤۰٪	۵۰٪	
عسل ۲	۲۰٪	۳۵٪	٤۵٪		۱۵٪	۳۵٪	٤۵٪	
عسل ۳	۲۵٪	۳۵٪	٦۰٪		۲۵٪	٤۰٪	٦۰٪	
قارچ ۲b عسل ٤	۲۰٪	۳۵٪	۵۰٪	۰/۹٤	۲۰٪	٤۰٪	٤۵٪	۰/۷۰٦
آمفوتریسین ب	۰/۰۳	۰/۱۲۵	۰/۵		۰/۰٦	۰/۲۵	۱	
فلوکونازول	۲	۸	۳۲	۰/۵۸۱	۰/۵	۲	۱٦	۰/۰۰۲
عسل ۱	۲۵٪	۵۵٪	٦۵٪		۲۰٪	٤۰٪	۵۵٪	
عسل ۲	۲۰٪	۳۰٪	٤۰٪		۲۵٪	۳۵٪	۵۰٪	
عسل ۳	۲۵٪	۳۵٪	۷۰٪		۲۵٪	۵۰٪	٦۰٪	
قارچ ۳c عسل ٤	۲۵٪	٤۰٪	٤۵٪	۰/۸۹۳	۲۵٪	۳۵٪	٤۵٪	۰/۷۸۷
آمفوتریسین ب	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵		۰/۰٦	۰/۲۵	۰/۵	
فلوکونازول	٤	۱٦	٦٤	۰/ ۷۱۲	۰/۵	٤	۱٦	۰/۰۰۲

کاندیدا آلبیکانس، b کاندیدا دابلینینسیس، c کاندیدا آلبیکانس، d عسل تازه حرارت ندیده، e عسل مانده حرارت ندیده، f عسل تازه حرارت دیده، g عسل مانده حرارت دیده، h حداقل غلظتی از عسل که رشد قارچ را به میزان ۵۰٪ مهار می‌کند. i- حداقل غلظتی از عسل که رشد قارچ را به میزان ۹۰٪ مهار می‌کند. j- حداقل غلظتی از عسل که رشد قارچ را به طور کامل مهار می‌کند. k- برحسب حجم مشخصی از عسل در هر میلی لیتر محیط کشت و l- برحسب µg/ml.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]

با تجزیه و تحلیل آماری تفاوت مشاهده شده در میزان غلظت مورد نیاز برای درجات مختلف مهار رشد کاندیدا معنی دار نبود. گر چه گونه دابلینینسیس حساس تر از دو گونه دیگر بود، ولی این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نبود. هر چند این چهار نوع عسل در رقت های متفاوتی رشد گونه های کاندیدا را مهار کردند ولی از لحاظ آماری این اختلاف ها معنی دار نبود، در مورد اثر دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد روی میزان مهار رشد کاندیدا نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد. آمفوتریسین ب در دمای۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد به ترتیب در رقت های ۰/۱۲۵-۰/۰۳ و ۰/۰۶-۰/۰۳ میکروگرم در هر میلی لیتر حداقل به میزان ۵۰٪ و در رقت های ۰/۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم در هر میلیلیتر به طور کامل رشد کاندیداها را مهار کرد. فلوکونازول در دمای۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بترتیب در رقت های۴- ۲ و ۰/۵-۰/۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر حداقل بمیزان ۵۰٪ و در رقتهای ۶۴-۳۲ و۳۲-۱۶ میکروگرم در هر میلی لیتر بطور کامل رشد کاندیداها را مهار کرد(جدول شماره ۲).

اختلاف مشاهده شده بین این دو دارو در مهار رشد گونه های کاندیدا از لحاظ آماری معنی دار بوده و نشان دهنده قدرت مهار کنندگی بهتر آمفوتریسین ب نسبت به فلوکونازول بوده است (p=۰/۰۱۵)، ولی تفاوتی از لحاظ میزان مهار و درجه حرارتهای مورد بررسی مشاهده نشد. قدرت مهاری داروها روی گونه های کاندیدا توسط دو داروی مورد آزمایش دارای اختلاف معنی داری نبود، هر چند گونه آلبیکانس حساس تر بود (p=۰/۰۱۳).

بحث و نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر نشان داد که عسل های مورد مطالعه توانایی مهار رشد گونه های کاندیدا را در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد دارند. تفاوت در توانایی مهار رشد کاندیدا در این دو دما می تواند در تصمیم گیری برای کاربرد های موضعی و یا خوراکی در مطالعات روی حیوان و یا بالینی مفید باشد (۱۷و۱۲). در فعالیت ضد میکروارگانیسمی عسل، منشأ و فلور گیاهی منطقه استحصال و نیز فصل جمع آوری عسل را نیز باید در نظر گرفت (۱۸و۱۲). در مطالعه حاضر عسل مورد استفاده از نوع پاییزه و حاصل گیاهان متنوع و معطر منطقه کوهستانی مازندران بوده که در صورت استفاده از عسل بهاره، مقایسه بین عسل های استحصالی در این دو فصل از لحاظ میزان مهار رشد کاندیداها ممکن می شد. در این مطالعه همانند برخی از مطالعات از محاسبه حجمی- حجمی برای ارائه غلظت مورد نیاز برای عسل استفاده شد (۱۸و۱۲) ولی چون به دلیل بالا بودن ویسکوزیته عسل، استفاده از این نوع مقیاس مشکل می باشد؛ به همین خاطر در بعضی از بررسی ها برای غلبه بر این مشکل از روش وزنی - حجمی استفاده شده است (۲۰و۱۹و۱۳و۱۰).

نتایج بعضی از مطالعات که با استفاده از انواع مختلف عسل با منشأ گیاهی متفاوت صورت گرفت هم خوانی هایی با نتایج حاصله در بررسی حاضر داشته است (۱۰و۴). گرچه بعضی از مطالعات نشان دادند که ارگانیسم ها حتی در غلظت های بالای عسل توانایی رشد را در آن دارند (۸)، این اختلاف ها می تواند ناشی از عوامل موثر از جمله محیط کشت و دمای مورد استفاده و نیز نوع عسل باشد (۱۰). در بررسی حاضر تفاوت معنی داری بین اثر ضد کاندیدایی عسل های تازه و کهنه و نیز حرارت دیده و حرارت ندیده مشاهده نشد، ولی در بعضی از بررسی ها این نوع عسل ها دارای تفاوت در میزان مهار رشد میکروارگانیسم ها بودند (۲۱).در بررسی حاضر به توجه به توصیه NCCLS مقدار تلقیحی مخمر به میزان 5×10^{3}cells/ml- $2/5\times10^{2}$ و به صورت دوتایی بوده است (۱۶و۱۵)، در حالی که در مطالعات دیگر به میزان $8/5\times10^{6}$cells/ml نیز رسیده است (۱۱و۱۰و۴). تعداد مخمر در مطالعه حاضر که با استفاده از لام نئوبار شمارش شده است؛ می تواند به روش های دیگری همچون سل کانتر و یا اسپکتروفتومتر نیز محاسبه گردد (۱۵و۱۰و۴)، البته این روش ها در دقیق بودن تعداد مخمر تلقیحی تأثیری نداشته و تنها سبب تسریع در شمارش مخمر و یا کونیدی قارچ می شود. در این بررسی MIC و MFC با کشت محتویات حفره های شفاف میکروپلیت در محیط سابورو دکستروز آگار و مقایسه تعداد کلنی رشد کرده در آن پلیت ها با تعداد مخمر اولیه به دست آمد، در حالی که در بعضی از مطالعات این مقادیر با کدورت سنجی به وسیله اسپکتروفتومتر مشخص می شد (۱۶و۱۵و۱۰).

مطالعات مختلف اثرات میکروارگانیسمی عسل را نشان داده است و مشخص شده که عسل در غلظت های بالا دارای فعالیت باکتری کشی است. عمده مطالعات صورت گرفته حساس بودن بیشتر باکتری هایی همچون اشریشیاکلی، پسودوموناس آئروژینوزا و هموفیلوس آنفولانزا نسبت به کاندیدا آلبیکانس و حتی قارچ های رشته ای را نشان می دهد (۱۱و۱۰). در مطالعات بالینی از عسل در درمان بعضی از عفونت های گوارشی - موضعی و حتی زخم های

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]

جراحی استفاده می شود، اثرات ضد میکروبی آن قابل مقایسه با آنتی بیوتیک ها می باشد. از طرف دیگر سرعت بهبودی زخم ها بدون نیاز به حذف بافت های نکروزه و عدم درد در هنگام برداشتن بانداژ از مزایای استفاده از عسل است (۲۱و۲۰و۱۲و۱۰). تنها نکاتی که در هنگام کاربرد درمانی عسل باید مد نظر داشت نیاز به غلظت بالای عسل در هنگام مصرف و نیز احتمال وجود کلستریدیوم بوتولینوم و نیز باقیمانده آنتی بیوتیک در آن است (۲۴-۲۲و۱۲). مطالعه حاضر نشان داد که اثر ضد کاندیدایی عسل در غلظت های ۲۵- ۱۵٪ دارای اثر مشابه دارو های ضد قارچی آمفوتریسین ب (۰/۰۶- ۰/۰۳ میکروگرم در هر میلی لیتر) و فلوکونازول (۰/۵-۰/۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر) بود، بنابراین با توجه به افزایش روز افزون مقاومت قارچ ها از جمله کاندیدا نسبت به این داروها به خصوص در افراد مبتلا به ایدز و نیز افزایش روز افزون نقش گونه های غیر آلبیکاس در ایجاد کاندیدیازیس و نادر بودن عوارض ناشی از عسل، با آزمایش های کنترل شده می توان در مورد استفاده درمانی عسل تصمیم گیری نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل که تأمین بودجه این طرح را به عهده داشتند، پروفسور ابه از انستیتو قارچ شناسی پزشکی دانشگاه تیکیو ژاپن بخاطر کمک های موثر در انجام طرح و نیز شرکت بیوژن (آقای علیزاده) قدردانی گردد.

****

References

1. Citak S, Ozcelik B, Cesur S, Abbasoglu U. In vitro susceptibility of Candida species isolated from blood culture to some antifungal agents. Jpn J Infect Dis 2005; 58(1): 44-6.

2. Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, et al. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. The New England J Med 1999; 340(10): 764-71.

3. Ribeiro MA, Paula CR, John R, Perfect JR, Cox GM. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal Candida strains isolated from HIV-infected women from Brazil. Med Mycol 2005; 43(7): 647-50.

4. Devkatte AN, Zore GB, Karuppayil SM. Potential of plant oils as inhibitors of Candida albicans growth. FEMS Yeast Res 2005; 5(9): 867-73.

5. Lopez A, Hudson JB, Towers GH. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2001; 77(2-3): 189-96.

6. Motsei ML, Lindsey KL, Van Staden J, Jager AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against Candida albicans. J Ethnopharmacol 2003; 86(2-3): 235-41.

7. Alnaqdy A, Al Jabri A, Al Mahroogi Z, Nzeako B, Nsanaz H. Inhibition effect of honey on the adherence of Salmonella to intestinal epithelial cells in vitro. Int J Food Microbiol 2005; 103(3): 347-51.

8. Mundo MA, Padilla Zakour OI, Worob RW. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. Int J Food Microbiol 2004; 97(1): 1-8.

9. Zaghloul AA, El Shattay HH, Kassem AA, Ibrahim EA, Reddy IK, Khan MA. Honey, a prospective antibiotic: extraction, formulation and stability. Pharmazie 2001; 56(8): 643-7.

10. Theunissen F, Grobler S, Gedalia I. The antifungal action of three South African honeys on Candida albicans. Apidologie 2001; 32: 371-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]

11. Wahdan HA. Causes of the antimicrobial activity of honey. Infection 1998; 26(1): 26-31.

12. Namias N. Honey in the management of infections. Surg Infect 2003; 4(2): 219-26.

13. Allen KL, Molan PC, Reid GM. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honey. J Pharm Pharmacol 1991; 43(12): 817-22.

14. Cooper RA, Molan PC, Krishnamoorthy L, Harding KG. Manuka honey used to heal a recalcitrant surgical wound. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20(10): 758-9.

15. Makimura K, Sudo T, Kudo M, Uchida K. Development of reference procedures for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts with standardized endpoint determination. Microbiol Immunol 1998; 42(1): 55-9.

16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Document M 27-A2 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard, 2nd ed, USA, Villanova, Pa 2002; 22: 1-59.

17. Efem SE, Udoh KT, Iwara CI. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. Infection 1992; 20(4): 227-9.

18. Basson NJ, Du Toit IJ, Grobler SR. Antibacterial action of honey on oral Streptococci. J Dent Assoc S Afr 1994; 49(7): 339-41.

19. Willix DJ, Molan PC, Harfoot CG. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. J Appl Bacteriol 1992; 73(5): 388-94.

20. Ceyhan N, Ugur A. Investigation of in vitro antimicrobial activity of honey. Riv Biol 2001; 94(2): 363-71.

21. Al Wailli NS. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infection of surgical wounds and conjunctiva. J Med Food 2004; 7(2): 210-22.

22. Snowdon JA, Cliver DO. Microorganisms in honey. Int J Food Microbiol 1996; 31(1-3): 1-26.

23. Heering W, Usleber E, Dietrich R, Martlbauer E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. Analyst 1998; 123(12): 2759-62.

24. Tichy J, Novak J. Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridans streptococci. J Altern Complement Med 2000; 6(5): 383-9.

*آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، تلفن: ۵-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]

EFFECT OF HONEY FROM NORTH OF IRAN ON CANDIDA ALBICANS

S. Mahdavi Omran (PhD) [1*], Gh. Maliji (PhD) [2], S.A.A. Sefidgar (PhD) [3], M.R. Yosefi (MSc) [4], M. Haji Ahmadi (MSc) [5], S.J. Moosavi (BSc) [6], M. Shafii (ASc) [7]

1. [*]Assistant Professor of Medical Mycology & Parasitology Department, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, mahdavios@yahoo.co.uk, 2. Assistant Professor of Cellular & Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences Babol, Iran, 3. Assistant Professor of Medical Mycology & Parasitology Department, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, 4. Academic Member of Parasitology Department, Babol Islamic Azad University, Babol, Iran, 5. Academic Member of Social Medicine Department, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, 6. BSc in Laboratory Sciences, 7. Laboratory Technician

BACKGROUND AND OBJECTIVE: According to the increasing resistance of Candida species to anticandidal drugs in some patients, several researches were led to find out new antifungal agents from natural sources. The aim of this study was to evaluate the anticandidal activity of honey experimentally.

METHODS: In the present study, physical, biochemical and microbial characterization of four types of honey from North of Iran were determined. Different dilution (15-75%) of honey, amphotericin B (0.008-16µg/ml) and fluconazole (0.06-128µg/ml) were used on two species of candida albicans and one species of candida dubliniensis. Micro plates were incubated at 25 °C and 37°C for 48 hours with shaking (150 rpm). 10µl of transparent wells were plated onto sabouraud dextrose agar plates and calculated minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). The anti-candida activity of honey and drugs were analyzed by using t-Student, Mann-Whitney and ANOVA tests.

FINDINGS: It was not grown any organisms on honey cultures. Different dilution of honey in 20-25% and 15-30% can inhibit candidal growth at 25 °C and 37 °C (MIC50). MFC for honey at 25 °C and 37 °C were 40-70% and 45-70%, respectively. The differences between anticandidal effects of honey were not statistically significant. Candidal growth was inhibited (50%) by amphotericin B in 0.03-0.125µg/ml and 0.03-0.06µg/ml at 25 °C and 37 °C, respectively. MFC for this drug and temperature above mentioned were 0.5 and 0.125 µg/mg, respectively. MIC for fluconazole at 25 °C and 37 °C were 2-4 µg/ml and 0.25-0.5 µg/ml, respectively; fluconazole inhibited candida growth, totally (MFC) at 25 °C and 37 °C in 32-64 µg/ml and 16-32µg/ml, respectively.

CONCLUSION: With regard to the anticandidal effects on honey, specially unheated old honey on candida dubliniensis at 37 °C**,** so honey could be considered as antifungal component in the treatment of experimental infections.

KEY WORDS: *Honey, Candida, Minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum fungicidal concentration (MFC).*

Journal of Babol University of Medical Sciences 2008-2009; 10(5): 15-22.

Received: June 9th 2008, Revised: July 9th 2008, Accepted: September 17th 2008.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.5.1.7]