

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر عسل‌های مرتعی بومی استان کهگیلویه و بویراحمد بر فعالیت کاندیدا آلبیکانس

یدالله عدالت‌پناه^{۱*}، فریبا عنایتی‌پرور^۲، سجاد رجایی‌نژاد^۱

^۱ دکتری تخصصی بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
^۲ کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۹

چکیده

مقدمه: عسل به‌عنوان یک ترکیب غذایی قوی و اثرگذار در برابر بسیاری از بیماری‌ها عمل می‌کند. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر عسل‌های مرتعی بومی استان کهگیلویه و بویراحمد بر کاندیدا آلبیکانس انجام شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه آزمایشگاهی حاضر در سال ۱۳۹۸ انجام شد. در این مطالعه برای بررسی ویژگی ضد میکروبی، ابتدا هفت گونه از عسل‌های استان کهگیلویه و بویراحمد تهیه شد و به همراه فلوکونازول علیه قارچ کاندیدا آلبیکانس به روش اندازه‌گیری عدم تشکیل هاله، MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و شمارش زنده بررسی گردید. پس از آنکه مشخص شد عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری بیشترین خاصیت ضد میکروبی را در محیط کشت داشته‌اند، ۴۸ حیوان آزمایشگاهی در چهار گروه جداگانه (در هر گروه ۱۲ حیوان) مورد مطالعه قرار گرفتند که دو گروه مربوط به حیوانات آلوده به کاندیدا، و تحت درمان با دو عسل طبیعی (عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری) بودند، گروه سوم به‌عنوان گروه کنترل دارو و تحت درمان با داروی استاندارد فلوکونازول در نظر گرفته شد و گروه چهارم حیواناتی بودند که به‌عنوان کنترل مثبت و پس از ایجاد کاندیدیازیس گوارشی تحت هیچ‌گونه درمانی قرار نگرفتند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون‌های واریانس یک‌راهه و t زوجی تجزیه و تحلیل گردیدند.

یافته‌ها: نتایج اندازه‌گیری عدم تشکیل قطر هاله و MIC نشان دادند که در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد، عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری، بیشترین تأثیر را بر کاندیدا آلبیکانس داشته‌اند ($P < 0/05$). نتایج شمارش زنده حاکی از آن بودند که عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری، کمترین تعداد کلنی را تشکیل داده‌اند ($P < 0/05$). بر مبنای نتایج، عسل‌های بلوط و چهل گیاه در مقایسه با فلوکونازول در ارتباط با موش‌ها، ویژگی ضد کاندیدا/بی قوی‌تری داشته‌اند ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: از میان عسل‌های مورد استفاده در این مطالعه، عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری در مقایسه با فلوکونازول اثر ضد کاندیدیایی قوی داشتند که این امر ناشی از وجود ترکیبات ضد میکروبی قوی بوده و در این نوع عسل‌ها وجود داشته است.

کلمات کلیدی: عسل، عسل بلوط، عسل چهل گیاه گرمسیری، فلوکونازول، کاندیدا آلبیکانس

مقدمه

عسل یک ماده شیرین طبیعی تولیدشده به وسیله زنبورهای عسل از شهد گل‌ها یا ترشحات بخش‌های زنده گیاهان است که زنبور عسل این مواد را جمع‌آوری و حمل نموده، با مواد خاصی از بدن خود ترکیب می‌کند و در شانهای عسل ذخیره می‌نماید (۱).

عسل ماده شیرین طبیعی تولیدشده توسط زنبورهای عسل از شهد گل‌ها یا ترشحات بخش‌های زنده گیاهان است که علاوه بر مصرف خوراکی، اهمیت دارویی آن در قدیمی‌ترین اسناد مختلف علمی به ثبت رسیده است و از دوران باستان خاصیت ضد باکتریایی و نیز فعالیت پاکسازی و ترمیم زخم آن شناخته شده است. ویژگی شفابخشی عسل به فعالیت ضد باکتریایی، حفظ شرایط مرطوب زخم و ویسکوزیته بالای آن مربوط می‌باشد که به ایجاد یک سد محافظ در برابر عفونت کمک می‌کند. شایان ذکر است که خواص ایمنی‌شناسی عسل مربوط به ترمیم بیش از اندازه زخم‌ها می‌باشد (۲).

عسل یک ترکیب فوق‌العاده غذایی با خواص بیولوژیک بوده که کاربرد فراوانی در رژیم غذایی انسان و سایر حیوانات دارد (۳). عسل دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، تقویت بافت پیوندی نرم، ممانعت از فعالیت برخی از اکسیدو ردوکتازها و کینازها بوده و محرک سیستم ایمنی هومورال و سلولی می‌باشد (۲). یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های این ماده غذایی، ویژگی ضد میکروبی آن است که پیش‌تر در گزارشات متعددی به اثبات رسیده است (۴). بسیاری از پژوهشگران اثر ضد میکروبی عسل را به منبع گیاهی مورد استفاده زنبور عسل و برخی از ویژگی‌های شیمیایی از جمله اسیدیته، pH و پراکسید هیدروژن و نیز برخی از ترکیبات آنزیمی همچون کاتالاز و ترکیبات غیر آنزیمی مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، اسید آسکوربیک و غیره نسبت داده‌اند (۵).

شمار سوش‌های میکروبی مقام به آنتی‌بیوتیک‌ها هر روز بیشتر می‌شود؛ از این رو نیاز به مواد ضد باکتری جدید و با ضرر کمتر، بیشتر نمایان می‌گردد. در این راستا، بررسی اثرات ضد میکروبی مواد طبیعی می‌تواند راه را برای به‌دست‌آوردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید هموار سازد (۶).

بررسی‌های انجام‌شده در مورد قارچ‌های بیماری‌زا نشان می‌دهند که عسل تأثیر زیادی بر بیماری‌های قارچی به‌ویژه کاندیدیازیس دارد. پژوهشگران در ارتباط با بیماری‌های پروتوزوئری توانسته‌اند به نقش عسل در مقابل بیماری‌هایی چون تریکومونیا، آمیبیازیس، ژیاوردیوز، لیشمانیوز و چند بیماری پروتوزوئری دیگر پی ببرند (۴،۷).

مخمر *کاندیدا* به‌عنوان یک میکروارگانیسم فرصت‌طلب سهم عمده‌ای در بروز بیماری‌های انسانی دارد (۹). *کاندیدا آلبیکانس* یک قارچ چندشکلی است که رابطه همسفرگی با انسان دارد. عفونت‌های ناشی از این قارچ به‌ندرت در افراد سالم ایجاد می‌شوند. در بین گونه‌های *کاندیدایی*، *کاندیدا آلبیکانس* مهم‌ترین و شایع‌ترین گونه بیماری‌زا می‌باشد؛ اما بروز عفونت با گونه‌های دیگر همچون *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزی* نیز رشد روزافزونی داشته است (۱۰).

کاندیدایزیس شایع‌ترین علت التهاب مری، التهاب واژن در زنان و مشکلات پوستی ناشی از استفاده از پوشک در نوزادان است. گونه *کاندیدا*، ارگانیسم‌های فرصت‌طلبی هستند که می‌توانند عفونت‌هایی سطحی را در پوست، ناخن، مخاط دهان و ناحیه تناسلی ایجاد نمایند. *کاندیدا آلبیکانس* می‌تواند فلور طبیعی دهان، روده و واژن باشد؛ بدون اینکه ایجاد بیماری نماید. تظاهرات بالینی عفونت کاندیدیایی براساس ناحیه مبتلا، متفاوت می‌باشد (۱۱).

در این ارتباط، سلاح‌ورزان و همکاران (۲۰۱۴) به مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی ضد میکروبی دو نوع

به همراه دارد که محققان را به یافتن ترکیباتی با خواص ضد میکروبی با منشأ بیولوژیک و بدون عارضه سوق می‌دهد. عسل به‌عنوان یک ترکیب غذایی طبیعی از دیرباز مورد توجه بوده و خواص ضد میکروبی آن بارها به اثبات رسیده است؛ اما متأسفانه تاکنون گزارش مستندی در این ارتباط به‌ویژه در مورد ویژگی‌های ضد کاندیدیایی عسل‌های بومی استان کهگیلویه و بویراحمد در شرایط *In vivo* و *In vitro* ارائه نشده است و به نظر می‌رسد که با انجام این مطالعه، گام‌های اولیه در این زمینه محقق گردد. با توجه به مطالب بیان‌شده، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر عسل‌های مرتعی بومی استان کهگیلویه و بویراحمد بر فعالیت کاندیدا/آلبیکاناس انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه آزمایشگاهی حاضر در سال ۱۳۹۸ انجام شد. برای انجام پژوهش، ۱۰ نمونه کاندیدا/آلبیکاناس از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهر یاسوج (بیمارستان شهید بهشتی، امام سجاد و شهدای یاسوج) تهیه گردید. همچنین هفت گونه از عسل‌های بومی استان کهگیلویه و بویراحمد (گون گرمسیری، گون سردسیری، چهل گیاه گرمسیری، چهل گیاه سردسیری، بلوط، جوکار و راک) در برابر قارچ کاندیدا/آلبیکاناس ATCC10231 مورد استفاده قرار گرفت.

برای بررسی حساسیت قارچ کاندیدا/آلبیکاناس نسبت به فلوکونازول و عسل‌های مورد استفاده، ابتدا سویه حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا/آلبیکاناس در محیط کشت SDA (Sabouraud Dextrose Agar) به روش پورپلیت کشت داده شد. در این روش پس از آماده‌سازی پلیت‌های حاوی محیط کشت با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده با تراکم سلول در هر میلی‌لیتر به پلیت‌های مذکور تلقیح شد. پس از گذشت ۲۰

عسل حاصل از تغییر در جیره غذایی زنبور عسل در مقایسه با دیگر عسل‌های تولیدشده در منطقه آستان شهرستان خرم‌آباد پرداختند و گزارش نمودند که عسل شیرین‌بیان بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در مقابل باکتری‌ها و مخمرها به‌ویژه سودوموناس آئروژینوزا و کاندیدا/آلبیکاناس دارد (۱۲).

قوتاسلو و همکاران (۲۰۱۶) نیز در مطالعه‌ای به بررسی اثر ضد باکتریایی عسل آذربایجان بر بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا پرداختند و گزارش نمودند که اثرات ضد باکتریایی عسل در هر دو شکل آزاد و بیوفیلمی مشاهده می‌شود؛ اگرچه غلظت‌های بالاتری از عسل برای مهار بیوفیلم مورد نیاز می‌باشد. نتایج این مطالعه پتانسیل ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عسل را تأیید نمودند. می‌توان از این نتایج در درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد (۱۳).

از سوی دیگر، در مطالعه بنائیان بروجنی و همکاران (۲۰۱۳) در ارتباط با مقایسه تأثیر ضد کاندیدیایی عسل و میکونازول بر کاندیدا/آلبیکاناس در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد که عسل در غلظت ۸۰ درصد به میزان زیادی موجب جلوگیری از رشد کاندیدا/آلبیکاناس گردید؛ درحالی که میکونازول به‌طور کامل موجب مهار رشد کاندیدا/آلبیکاناس گردید (۱۴).

از آنجایی که شبه مخمر کاندیدا به‌عنوان چهارمین عامل عفونی در بروز عفونت‌های بیمارستانی مطرح بوده و متأسفانه آمار صحیح و قابل‌استنادی از شیوع بیماری کاندیدیازیس در کشور ارائه نشده است؛ از این رو اهمیت مطالعات بیشتر و عمیق‌تر در این راستا بر کسی پوشیده نمی‌باشد. از سوی دیگر با افزایش روزافزون عفونت‌های قارچی، شاهد افزایش چشمگیر و بی‌رویه استفاده از داروهای ضد قارچی نظیر فلوکونازول می‌باشیم. استفاده از این داروها، مقاومت‌های دارویی و عوارض جانبی فراوانی را

PTCC 5027 که از قبل روی محیط کشت سابوراد دکستروز آگار کشت داده شده بود، به ۶ میلی‌لیتر محیط کشت سابوراد مایع اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند که به‌طور نسبی حاوی 10^6 سلول مخمری است، تهیه شد و در حجم ۳۶۰ میلی‌لیتر با استفاده از آب مقطر استریل آماده گردید. سوسپانسیون حاصل به ۳۰۰ گرم غذای پودر شده و استریل (توسط اتوکلاو) موش‌های آزمایشگاهی (موش سوری ماده با سن چهار تا شش هفته و وزن تقریبی ۲۵ گرم) اضافه شد و مجدداً به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور خشک گردید؛ به‌نحوی که به‌طور منظم و روزانه، به مدت یک هفته توسط حیوانات مورد مطالعه به‌عنوان غذای اصلی استفاده شد. به‌منظور اطمینان از آلودگی غذا به سلول‌های کاندیدا/آلبیکانس، به‌طور روزانه ۱ گرم از غذای خشک به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و رقت‌های متوالی از آن تهیه شد. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت سابوراد جامد اضافه گردید و جهت گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه، تعداد کلنی‌های رشد یافته شمارش شد و میزان CFU (Colony-forming Unit) محاسبه گردید. با توجه به اینکه از میان هفت گونه عسل مورد استفاده در مطالعه حاضر، عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری بیشترین خاصیت ضد کاندیدیایی را داشتند، این دو گونه برای درمان موش‌های کاندیدیازیس مورد استفاده قرار گرفتند. شایان ذکر است که برای کار با موش‌ها، کد اخلاق از کمیته اخلاق دانشگاه پیام‌نور به شماره IR.PNU.REC.1398.024 دریافت شد. برای بررسی تأثیر عسل بر درمان بیماری کاندیدیازیس، ۴۸ حیوان آزمایشگاهی در چهار گروه جداگانه (در هر گروه ۱۲ حیوان) مورد مطالعه قرار گرفتند که دو گروه حیوانات آلوده به کاندیدیای تحت درمان با دو عسل طبیعی (چهل

دقیقه، دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مختلف عسل رقیق‌سازی از غلظت ۵۰ به ۵ درصد به همراه دیسک‌های فلوکونازول ۲۵ میکروگرمی روی پلیت‌های حاوی SDA قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری گردید (۸،۱۵).

برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در این آزمایش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت سابوراد دکستروز براث درون چاهک‌ها ریخته شد. سپس غلظت‌های متوالی از عسل در محلول ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکساید تهیه شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه گردید. در ادامه، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی از هریک از سویه‌های کاندیدا با تراکم 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر به آن اضافه شد. سپس، پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گذاشته شد. پس از طی زمان انکوباسیون، میزان رشد کاندیدا/آلبیکانس براساس تعیین کدورت چاهک‌ها با استفاده از الیزا ریدر ارزیابی گردید. پایین‌ترین غلظت جلوگیری‌کننده از رشد مخمر به‌عنوان MIC عسل و فلوکونازول در نظر گرفته شد (۱۶).

جهت مشخص‌نمودن زمان کشته‌شدن سلول‌های کاندیدا/آلبیکانس توسط ترکیبات ضد قارچی مذکور، ابتدا ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 1×10^7 سلول بر میلی‌لیتر از کاندیدا/آلبیکانس تهیه شد و در ادامه ۴ میلی‌لیتر از ترکیبات ضد قارچی مورد مطالعه در رقت‌های مختلف به آن اضافه گردید و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس تعداد مخمرها براساس واحد سازنده کلنی با استفاده از روش شمارش زنده (Viable count) در فواصل زمانی ۲ تا ۴۸ ساعت پس از شروع گرمخانه‌گذاری محاسبه شد (۱۴).

در ادامه، یک تا سه کلنی از مخمر کاندیدا/آلبیکانس

گیاه گرمسیری و بلوط)، گروه سوم گروه کنترل داروی تحت درمان با داروی استاندارد فلوکونازول و گروه چهارم حیواناتی بودند که به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند و پس از ایجاد کاندید یازیس گوارشی تحت هیچ‌گونه درمانی قرار نگرفتند. به‌منظور بررسی تغییرات بافتی، دو حیوان از هر گروه در روزهای دوم، چهارم، هفتم، چهاردهم و سی‌ام پس از عفونت به‌طور تصادفی انتخاب شدند و پس از معدوم‌نمودن آن‌ها، کلیه‌ها با رعایت اصول بهداشتی خارج شده و در راستای مطالعات بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS 23 استفاده شد. نرمال بودن داده نیز با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی گردید. همچنین برای مقایسه میانگین متغیرهای پاسخ در گروه‌های مورد مطالعه از آنالیز واریانس یک‌راهه (یک‌طرفه) در سطح اطمینان ۰/۰۵ بهره گرفته شد.

نتایج

نتایج اندازه‌گیری عدم تشکیل قطر هاله کاندیدا/

آلبیکانسیس با روش دیسک‌گذاری برای گونه‌های مختلف عسل نشان می‌دهد که عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری، بیشترین تأثیر را بر رشد کاندیدا/آلبیکانسیس (به‌ترتیب در غلظت‌های ۵۰ و ۴۰ درصد) داشته‌اند ($P < 0/05$). مطابق با جدول ۱، در غلظت ۵۰ درصد، میانگین برای عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری به‌ترتیب معادل $32 \pm 4/1$ و $29 \pm 1/8$ میلی‌متر به‌دست آمده و برای غلظت ۴۰ درصد برای عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری به‌ترتیب معادل $28 \pm 3/2$ و $26 \pm 2/7$ میلی‌متر محاسبه گردیده است. بر مبنای نتایج، فلوکونازول نسبت به گونه‌های مختلف عسل تأثیر ضعیف و معناداری ($P < 0/05$) بر مهار رشد کاندیدا/آلبیکانسیس داشته است (جدول ۱).

با توجه به اینکه بیشترین قطر عدم تشکیل هاله مربوط به غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد بود، برای MIC نیز از این دو غلظت استفاده گردید. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی MIC عسل‌ها نشان داد که عسل بلوط و عسل چهل گیاه گرمسیری بیشترین خاصیت ضد کاندیدا/آلبیکانسیس را داشته‌اند ($P < 0/05$)؛ به‌طوری که MIC برای عسل بلوط و عسل چهل گیاه گرمسیری در غلظت‌های ۵۰ و ۴۰ درصد به‌ترتیب معادل ۳۲ و ۴۱ و نیز ۳۵ و ۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MIC^{۹۰} به‌ترتیب برای عسل بلوط و عسل

جدول ۱: نتایج عدم تشکیل قطر هاله با روش دیسک‌گذاری در گونه‌های مختلف عسل با غلظت‌های ۵۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد به همراه فلوکونازول (بر حسب میلی‌متر)

نام عسل	غلظت ۵۰ درصد	غلظت ۴۰ درصد	غلظت ۲۰ درصد	غلظت ۱۰ درصد	غلظت ۵ درصد
گون گرمسیری	۲۱±۱/۲	۱۸±۲/۷	۱۶±۱/۳	۱۵±۳/۲	۱۱±۱/۳
چهل گیاه یاسوج	۱۴±۰/۶	۱۴±۱/۳	۱۱±۲/۳	۱۱±۰/۸	۸±۱/۲
چهل گیاه گرمسیری	۲۹±۱/۸	۲۶±۲/۷	۲۳±۱/۷	۱۵±۲/۱	۱۴±۲/۲
عسل راک	۱۶±۲/۵	۱۵±۳/۷	۱۳±۲/۴	۱۱±۲/۶	۷±۱/۱
عسل بلوط	۳۲±۴/۱	۲۸±۳/۴	۲۳±۲/۷	۱۸±۱/۷	۱۳±۳/۷
گون گرمسیری	۲۷±۳/۴	۲۱±۲/۲	۱۸±۴/۷	۱۶±۳/۳	۱۱±۲/۳
عسل جوکار	۱۸±۲/۷	۱۶±۳/۴	۱۲±۲/۱	۱۰±۲/۵	۸±۳/۱
فلوکونازول	۵±۰/۸	۶±۳/۴	۴±۰/۹	۸±۳/۱	۴±۰/۹

جدول ۲: نتایج MIC گونه‌های مختلف عسل و داروی فلوکونازول (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

MIC _{۹۰}	MIC _{۵۰}	MIC _{۵۰}	MIC _{۵۰}	نام عسل
غلظت ۴۰ درصد عسل	غلظت ۵۰ درصد عسل	غلظت ۴۰ درصد عسل	غلظت ۵۰ درصد عسل	
۱۷۰	۱۶۰	۹۰	۸۰	گون گرمسیری
۲۴۰	۲۲۰	۱۲۵	۱۲۰	چهل گیاه یاسوج
۸۱	۶۷	۴۲	۳۵	چهل گیاه گرمسیری
۲۰۵	۱۹۵	۱۱۵	۱۰۵	عسل اراک
۷۸	۶۲	۴۱	۳۲	عسل بلوط
۸۶	۷۰	۴۵	۳۸	گون گرمسیری
۱۸۰	۱۷۰	۹۵	۸۵	عسل جوکار
۴۱۰	۳۹۵	۲۱۵	۲۰۵	فلوکونازول

جدول ۳: شمارش کلنی‌های تشکیل شده کاندیدا/آلبیکانس در بازه زمانی ۴۸ ساعته

عسل	چهار ساعت	هشت ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
چهل گیاه گرمسیری ۵۰ درصد	۲۲/۱ ± ۲/۳	۱۶/۴ ± ۲/۵	۱۱/۳ ± ۳/۵	۷/۲ ± ۲/۱	۳/۶ ± ۱/۶
چهل گیاه گرمسیری ۴۰ درصد	۲۵ ± ۷/۵	۲۰/۳ ± ۴/۷	۱۵/۳ ± ۲/۵	۱۱/۳ ± ۳/۸	۴/۷ ± ۶/۵
بلوط ۵۰ درصد	۱۷ ± ۲/۸	۱۳/۵ ± ۳/۸	۹ ± ۲/۹	۳/۸ ± ۴/۸	۱/۳ ± ۰/۵
بلوط ۴۰ درصد	۲۱/۳ ± ۲/۴	۱۷/۶ ± ۲/۴	۱۳/۵ ± ۱/۸	۹/۳ ± ۱/۴	۲/۴ ± ۰/۸
فلوکونازول	۳۲/۶ ± ۷/۵	۳۱ ± ۴/۷	۲۹/۳ ± ۲/۵	۲۶/۳ ± ۳/۸	۲۰/۷ ± ۶/۵

در موش‌های سوری را در یک بازه زمانی ۳۰ روزه نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، عسل بلوط خاصیت ضد کاندیدیایی قوی‌تری نسبت به عسل چهل گیاه گرمسیری و فلوکونازول داشته است؛ به‌طوری که پس از گذشت ۳۰ روز از درمان موش‌ها توسط عسل، تعداد کلنی‌ها در عسل بلوط ۱۲۴ مورد، در عسل چهل گیاه گرمسیری ۲۱۰ مورد و در فلوکونازول ۳۲۲۵ مورد بوده است ($P < 0/05$).

نتایج مطالعات بافت‌شناسی در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در موش‌های تحت درمان با عسل، تعداد آبه‌های موجود روی کلیه‌ها نسبت به موش‌های مبتلا به کاندیدیازیس کمتر است و در موش‌های مبتلا، عناصر قارچی کاندیدا/آلبیکانس از طریق رنگ‌آمیزی بازشیف قابل مشاهده می‌باشد.

چهل گیاه گرمسیری در غلظت ۵۰ درصد معادل ۶۲ و ۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای غلظت ۴۰ درصد برابر با ۷۸ و ۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بر مبنای نتایج، فلوکونازول نسبت به گونه‌های مختلف عسل بر مهار رشد کاندیدا/آلبیکانس تأثیر ضعیف‌تری داشته است ($P < 0/05$) (جدول ۲).

در جدول ۳ تعداد کلنی‌های تشکیل شده کاندیدا/آلبیکانس در یک بازه زمانی ۴۸ ساعته برای فلوکونازول و عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با گذشت زمان تعداد کلنی‌ها در گونه‌های عسل و فلوکونازول کاهش یافته است که این کاهش برای عسل بلوط نسبت به عسل چهل گیاه گرمسیری در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد معنادار می‌باشد ($P < 0/05$).

جدول ۴ تعداد کلنی‌های کاندیدا/آلبیکانس شکل گرفته

جدول ۴: تأثیر عسل و فلوکونازول در موش‌های آزمایشگاهی بر کاندیدا آلبیکانس در یک بازه زمانی یک ماهه

نام گروه	روز دوم	روز چهارم	روز هفتم	روز دوازدهم	روز بیستم	روز سی‌ام
عسل چهل گیاه گرمسیری	۷۵۵۲±۱۵۲۱	۶۲۰۰±۱۲۴۵	۱۵۴۲±۳۲۱	۱۴۵۲±۵۲۴	۱۲۵۰±۱۲۱	۲۱۰±۴۵
عسل بلوط	۹۲۱۰±۲۰۱۲	۸۷۲۱±۱۵۸۷	۳۸۲۷±۵۸۷	۱۵۲۴±۶۵۴	۱۱۲۰±۳۲۱	۱۲۴±۵۶
فلوکونازول	۱۴۵۸۰±۵۴۸	۱۸۷۰۰±۳۵۷	۱۲۵۸۰±۳۴۱	۹۸۷۵±۶۵۴	۷۴۱۰±۸۷۴	۳۲۲۵±۵۴۹
کنترل	۱۸۷۰۰±۹۵۴	۲۰۱۲۱±۱۲۰۳	۱۵۴۱۲±۱۰۲۵	۱۴۸۹۰±۲۰۱۰	۱۶۵۴۱±۱۲۰۲	۱۷۴۸۹±۲۰۱۵

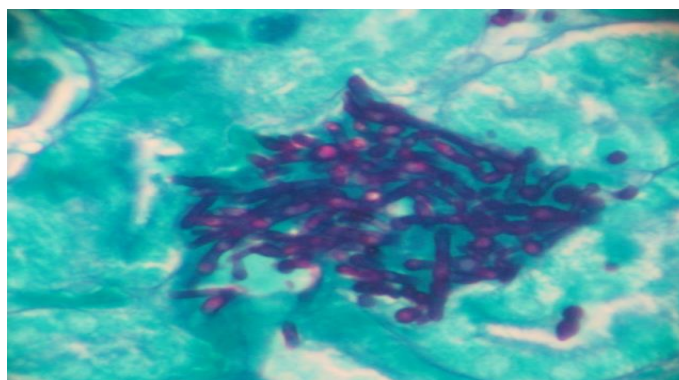


ب

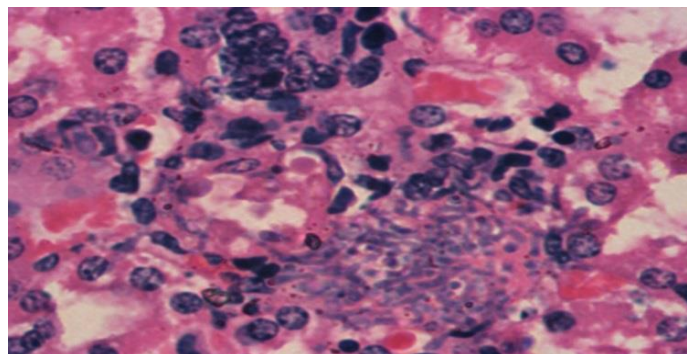


الف

شکل ۱: کلیه سالم (الف) و عفونی (ب) موش آزمایشگاهی مبتلا به کاندیدایازیس گوارشی

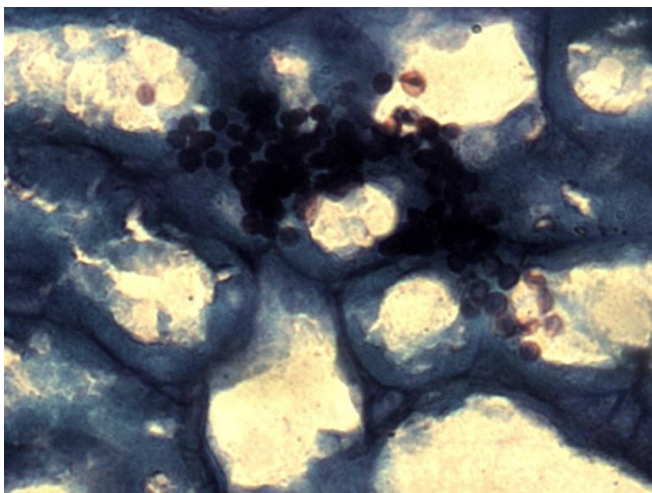


الف



ب

شکل ۲: وجود آبنس روی کلیه عفونی موش آلوده به کاندیدایازیس (الف) و کلیه موش درمان‌شده با عسل (ب)



شکل ۳: وجود عناصر قارچی و ریشه کاندیدا در بافت کلیه موش آزمایشگاهی مبتلا به کاندیدیازیس گوارشی با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف

بحث

داشته‌اند. نتایج شمارش زنده کلنی‌های تشکیل شده از قارچ کاندیدا/آلبیکانس حاکی از آن بودند که عسل بلوط نسبت به عسل چهل گیاه گرمسیری و فلوکونازول، خاصیت ضد کاندیدیایی قوی‌تری داشته و گذشت زمان سبب شده است که از تعداد کلنی‌ها کاسته شود. بر مبنای نتایج، عسل بلوط در غلظت ۵۰ نسبت به غلظت ۴۰ درصد، خاصیت ضد کاندیدیایی قوی‌تری داشته است. یافته‌ها حاکی از آن بودند که عسل بلوط نسبت به عسل چهل گیاه گرمسیری، خاصیت ضد کاندیدیایی قوی‌تری داشته و عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری نسبت به فلوکونازول در کنترل کاندیدا/آلبیکانس قوی‌تر عمل نموده‌اند. در مطالعات بافت‌شناسی نشان داده شده است که با مصرف عسل، بافت کلیه موش‌های مبتلا به کاندیدیازیس درمان گردید. Boukraa و Bouchehrane (۲۰۰۷) در پژوهشی گزارش نمودند که عسل به‌طور معناداری بر کاندیدا/آلبیکانس و آسپرژیلوس نایجر مؤثر بوده و حداقل اثر مهارکنندگی عسل به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۴۲ و ۴۶ درصد می‌باشد. در مطالعه حاضر غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد بیشترین اثر مهارکنندگی را داشتند (۱۸). یافته‌های پژوهش Mercan و همکاران نیز

مطالعه حاضر در ارتباط با ۱۰ نمونه کاندیدا/آلبیکانس جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهر یاسوج انجام شد. در این پژوهش هفت گونه از عسل‌های بومی استان کهگیلویه و بویراحمد از هر دو منطقه گرمسیری و سردسیری تهیه شدند و اثر آن‌ها به همراه فلوکونازول بر قارچ کاندیدا/آلبیکانس جدا شده از بیماران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اندازه‌گیری قطر عدم تشکیل هاله به روش دیسک‌گذاری نشان دادند که عسل‌های بلوط و چهل گیاه گرمسیری، بیشترین ویژگی ضد کاندیدیایی را داشته‌اند و هرچه غلظت عسل بالاتر بوده است، خاصیت ضد کاندیدیایی قوی‌تری داشته است؛ به طوری که کمترین اثر ضد کاندیدیایی مربوط به غلظت ۵ درصد و بیشترین خاصیت ضد کاندیدیایی مربوط به عسل ۵۰ درصد بوده است. نتایج این مطالعه با یافته‌های Manisha و همکاران (۲۰۱۱) که به بررسی ویژگی ضد میکروبی عسل پرداختند و بیان نمودند که در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد، عسل بیشترین خاصیت ضد میکروبی را دارد، همسو می‌باشد (۴).

نتایج آزمون MIC نشان دادند که عسل چهل گیاه گرمسیری و عسل بلوط، بیشترین غلظت مهارکنندگی را

مطالعه برای پژوهشگران وجود داشت، نداشتن میکروسکوپ الکترونی در دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی استان کهگیلویه و بویراحمد و نیز عدم دسترسی به تمامی گونه‌های عسل موجود در مناطق استان بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه بیانگر خاصیت ضد کاندیدایی عسل‌های مرتعی و بومی استان کهگیلویه و بویراحمد بودند که مهم‌ترین دلیل این امر، داشتن ترکیبات و اسانس‌های گیاهی است که در گونه‌های عسل وجود دارد. با توجه به اینکه در این مطالعه عسل بلوط بیشترین خاصیت ضد کاندیدایی را داشت، احتمالاً دلیل این امر داشتن ترکیبات فلاونوئیدی در این نوع عسل می‌باشد. استفاده از پتانسیل ضد میکروبی ترکیبات با منشأ طبیعی نظیر عسل می‌تواند جایگزین داروهای شیمیایی شود و یا حداقل به‌عنوان مکمل دارویی مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به مشکلات متعددی که قارچ کاندیدا/آلبیکانس ایجاد می‌نماید، عسل به دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند در مهار رشد این قارچ مضر مورد استفاده قرار بگیرد.

حمایت مالی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه پیام‌نور و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج صورت گرفته است.

ملاحظات اخلاقی

این طرح تحقیقاتی با شماره IR.PNU.REC.1398.024 در دانشگاه پیام‌نور تأیید شده است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در

بیانگر خاصیت ضد کاندیدایی عسل بودند؛ به‌طوری که افزودن عسل به محیط‌های کشت حاوی کاندیدا/آلبیکانس با غلظت ۸۰ درصد در یک بازه زمانی ۶-۲ ساعته موجب از بین رفتن کلنی‌های کاندیدا/آلبیکانس گردید. یافته‌های این مطالعه نشان دادند که در یک بازه زمانی ۴۸ ساعته، عسل با غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد موجب کاهش رشد کاندیدا/آلبیکانس می‌گردد (۱۹). در مطالعه بنائیان و همکاران (۲۰۱۱) مشخص گردید که عسل با غلظت ۵۰ درصد و بالاتر می‌تواند رشد کاندیدا/آلبیکانس را به میزان بالایی مهار کند؛ اما در مطالعه حاضر نشان داده شد که در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد، عسل بیشترین خاصیت ضد کاندیدایی را دارد (۱۴). وجود فلاونوئیدهای گیاهی در عسل یکی از عوامل ضد کاندیدایی آن است. از موارد دیگر خاصیت آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌اکسیدانی عسل، ویژگی اسموتیک آن می‌باشد (۱۶).

تاکنون مطالعه‌ای در ایران به بررسی ویژگی ضد کاندیدایی عسل در موش و دیگر موجودات زنده نپرداخته است. در مطالعه رهنما و آقاجانلو (۲۰۰۹) اثرات ضد میکروبی عسل و مقایسه زمان‌های مورد استفاده از آن بر موش‌های آلوده‌شده به باکتری سالمونلاتیفی موریوم مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که عسل، عفونت‌های روده‌ای در موش‌ها را کاهش داده و منجر به مهار باکتری سالمونلاتیفی موریوم در غلظت بالای ۵۰ درصد می‌گردد؛ اما در مطالعه حاضر در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد، عسل بر کنترل رشد قارچ کاندیدا/آلبیکانس اثرگذار بود (۱۷).

در این زمینه، در مطالعه Al-Waili (۲۰۰۵) نشان داده شد که با به‌کارگیری غلظت بالای عسل در برابر کاندیدا/آلبیکانس در یک بازه زمانی ۸-۲ ساعته، رشد این قارچ به‌طور کامل مهار می‌گردد. در این مطالعه گزارش گردید که پس از گذشت ۴۸ ساعت همچنان تعداد محدودی کلنی تشکیل می‌شود (۲۰).

مهم‌ترین محدودیت‌هایی که در راستای انجام این

این پژوهش وجود ندارد.

و با همکاری مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج (برای انجام آزمایشات) صورت گرفته است. بدین‌وسیله از تمامی افرادی که در راستای انجام این طرح با پژوهشگران همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از یک طرح تحقیقاتی با شماره ۱۴۲۵ مصوب دانشگاه پیام‌نور (به‌عنوان حامی مالی) بوده

References

1. Aarabi A, Mirhojjati H, Naieri H, Nouri M, Shariaty MA, Moghadam MZ. Survey of physicochemical properties of produced honey in Isfahan province of Iran in 2012. *Int J Farm Allied Sci.* 2012; 2(8):183-7. [in Persian]
2. Sepahvand S. The therapeutic properties and antibacterial activity of honey. Third International Conference on New Findings in Agricultural Sciences, Natural Resources and Environment, Tehran, Association for the Development and Promotion of Fundamental Sciences and Technologies, Tehran, Iran; 2015. P. 210-5. [in Persian]
3. Kucuk M, Kolayh S, Karaogla S, Ulusoy E, Baltaci C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.* 2004; 100(2):526-34.
4. Mandal MD, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011; 1(2):154.
5. Tajik H, Shokohi SJ, Valehi S. Assessment of antimicrobial efficacy of commercial Urmia's honeys. *Iran J Food Sci Technol.* 2007; 4(2):39-44. [in Persian]
6. Talei G, Meshkatosadat MH, Delfan B. Antibacterial activity of fruit, leaves extracts of *Artemisia Persica* Boiss, *Rhus Coriaria*, *Ephedra Intermedia* and *Daphne Mucronata* Royle of Lorestan. *Yafte.* 2004; 5(3):19-24. [in Persian]
7. Rafa't Abdul Hassan MJ. Antimicrobial effect of bee honey on some pathogenic bacteria isolated from infected wounds in comparison to commonly used antibiotics. *J Basrah Res.* 2011; 37(4):78-83.
8. Kucuk M, Kolayh S, Karaogla S, Ulusoy E, Baltaci C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.* 2004; 100(2):526-34.
9. Al-Abeid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of *Candida albicans* Spp. In Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal senility. *Jpn J Infect.* 2004; 57(23):279-84.
10. Theunissen F, Grobler S, Gedalia I. The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie.* 2001; 32(4):371-9.
11. Irish J, Carter DA, Shokohi T, Blair SE. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Med Mycol.* 2006; 44(3):289-91.
12. Salahvarzan A, Abdolapour F, Ismaeili A, Sepahvand F. Anti-oxidant and anti-microbial activities of two types of honey by change in bees, diet in comparison with other honey products in Abestan region of Khorramabad province. *Yafte.* 2015; 17(3):115-25. [in Persian]
13. Ghotaslou R, Saghati H, Dehnad A, Salahi Eshlaghi B. Antibacterial effects of Azerbaijan honey on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Iran J Med Microbiol.* 2016; 9(4):40-6. [in Persian]
14. Banaean-Boroujeni S, Rasti-Boroujeni M, Moghim H, Validi M, Mobini G, Kazemian A. *In vitro* effect of honey on *Candida albicans* and *lactobacillus*. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2010; 11(4):52-8. [in Persian]
15. AI-Namma RT. Evaluation of *in vitro* inhibitory effect of honey on some microbial isolate. *J Bacteriol Res.* 2009; 1(6):64-7.
16. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res.* 2005; 36(5):464-7.
17. Rahnema M, Aghajanlou R. Antimicrobial effects of honey on intestinal infections with *salmonella typhimurium* bacteria PTCC, 1547 in male mice. *J Anim Physiol Dev.* 2009; 2(3):31-7. [in Persian]
18. Boukraa L, Bouchehrane S. Additive action of honey and starch against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24(4):309-11.
19. Mercan N, Guvensen A, Celik A, Katircioglu H. Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Nat Prod Res.* 2007; 21(3):187-95.
20. Al-Waili NS. Mixture of honey, beeswax and olive oil inhibits growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Arch Med Res.* 2005; 36(1):10-3.



Original Article

Effect of Different Kinds of Honey Native to Grasslands of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province on the Activity of *Candida albicans*

Yadolah Edalatpanah^{1*}, Fariba Enayatiparvar², Sajad Rajaei Nejad¹

¹ PhD in Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

² MSc in Clinical Biochemistry, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 20 September 2019

Accepted: 29 January 2020

Abstract

Introduction: Honey acts as a powerful and effective dietary compound against many diseases. This study aimed to investigate the effect of different kinds of honey native to grasslands of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Iran, on the activity of *Candida albicans*.

Materials and Methods: This laboratory study was performed in 2019. To evaluate the antimicrobial activity, seven kinds of honey were obtained from Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Iran. Furthermore, they were investigated with Fluconazole against *Candida albicans* using the measurement of the zone of inhibition diameter, minimum inhibitory concentration (MIC), and live count. Following that, Oak and Forty tropical plant (i.e., Chelgiah) honey were identified to contain the highest antimicrobial activity in the culture medium. Subsequently, 48 laboratory animals were divided into 4 groups (12 animals per group). The first 2 groups were candida-infected animals treated with two natural kinds of honey (Oak and Forty tropical plants). Moreover, group 3 was regarded as a drug control and treated with standard Fluconazole, and the fourth group was a positive control that was under no treatments after being infected with digestive candidiasis. Data were analyzed in SPSS software (version 21) using one-way ANOVA and paired t-test.

Results: The results of measurement of the zone of inhibition diameter and MIC showed that at the concentrations of 40% and 50%, Oak and Forty tropical plant honey had the most significant effects on *Candida albicans* ($P < 0.05$). The live counting results also showed that Oak and Forty tropical plant honey had the lowest number of colonies ($P < 0.05$). According to the results, Oak and Forty tropical plant honey had more significant anti-candida effects on rats, compared to Fluconazole ($P < 0.05$).

Conclusion: Out of the different kinds of honey used in this study, Oak and Forty tropical plant honey had more significant anti-candida effects, compared to Fluconazole. This is due to the presence of strong antimicrobial compounds in these kinds of honey.

Keywords: *Candida albicans*, Fluconazole, Forty tropical plant honey (Chelgiah), Oak honey