تاثیر عصاره الکلی بره موم بر فعالیت پروتئازی جدایه های بالینی کاندیدا آلبیکنس

نکیسا سهرابی حقدوست[1*]، نازیلا متدین[2]، امیر علی انوار[3]، پوریا عسگری[4]

چکیده

کاندیدا آلبیکنس *(Candida albicans)* یکی از شایع ترین مخمرهای فرصت طلب انسانی و حیوانی است و در افراد دارای نقص سیستم ایمنی طیف وسیعی از بیماریها را ایجاد میکند. از مهم ترین فاکتورهای حدت در این مخمر میتوان به آنزیم های ترشحی پروتئاز اشاره کرد که نقش مهمی را در بیماریزایی و تهاجم ایفا می کند. شکست درمان مبتلایان به عفونتهای ناشی از کاندیدا آلبیکنس با داروهای ضد قارچی رایج، تحقیق بر روی عوامل ضد قارچی جدید را اجتناب ناپذیر میکند. در این راستا فعالیت پروتئازی جدایه های کاندیدا البیکنس در حضور عصاره الکی بره موم بررسی گردید. نمونه های مورد نظر از ضایعات دهان (۱۵)، ناخن (۸) و واژن (۱۵) جدا شدند. در ابتدا فعالیت پروتئازی درتمام جدایه ها محاسبه گردید سپس از کمترین غلظت ممانعت کننده عصاره الکلی بره موم بدست آمده در مطالعه قبلی، برای ارزیابی فعالیت پروتئازی در گروه تیمار استفاده گردید. نتایج نشان داد، میانگین کمترین غلظت مهار کننده و کمترین غلظت کشنده بره موم برای تمامی جدایه های مورد مطالعه به ترتیب ۳۶۰/۶ و ۱۲۵۰/۱ میکروگرم در هر میلی لیتر تعیین گردید. میانگین فعالیت پروتئازی در گروهای ناخن، واژن و دهان به ترتیب برابر است با ٪۰/۰۳± ۰/۲، ٪۰/۰۶±۰/۳٤ و ٪۰/۰٦ ± ۰/۳۵ محاسبه گردید. فعالیت پروتئازی تمام گروه ها پس از تیمار با بره موم نسبت به گروه کنترل به طورمعناداری کاهش پیدا کرده است (P<0.0001). با توجه به خاصیت بره موم در کاهش فعالیت پروتئازی در جدایه ها شاید بتوان از آن در کاهش بیماریزایی و درمان عفونتهای کاندیدایی بهره جست.

واژگان کلیدی: *فعالیت پروتئازی، عصاره بره موم، کاندیدا آلبیکنس*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۹

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس یک میکروارگانیسم چند شکلی است که انتقال از شکلی به شکل مخمر، هیف کاذب و هایف حقیقی در آن دیده میشود.

این ارگانیسم میتواند بر روی بافتهای مخاطی (دهان ،واژینال و دستگاه گوارش) پوست و ناخن انسان و حیوان کلنیزه شود(۱). تحت شرایط خاصی *کاندیدا آلبیکنس* میتواند عامل طیف وسیعی از عفونتهای مخاطی مزمن تا عفونتهای سیستمیک شدید در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و یا افراد دیابتی ایجاد کند. عوامل و مکانیسم های زیادی که با خاصیت بیماری زایی این قارچ مرتبط هستند، موردشناسایی قرار گرفتند. از آنجمله میتوان به ، ترشح هیدرولازها مانند پروتئازها، انتقال مخمر به فرم هایفی و مولکول هایی که میانجی چسبندگی و تهاجم به سلول های میزبان می شوند، تشکیل بیوفیلم و پاسخ به استرس ها برای افزایش شانس بقاء در شرایط نامساعد محیطی را می توان نام برد(۲, ۳). این عوامل با تولید آنزیم های مختلف از جمله پروتئاز ها، علاوه بر ایجاد عفونت می توانند در فساد مواد غذایی نقش مهمی را ایفا کنند. توانایی *کاندیدا آلبیکنس* برای تغییر از فرم مخمری به فرم رشته ای یکی از مهمترین فاکتورهای حدت در این میکروارگانیسم است(٤،٦). تغییر شکل مورفولوژیکی در میان فرم مخمر، هایف و سودوهایف اغلب به عنوان عامل افزایش حدت در این میکروارگانیسم تلقی میشود پروتئازها از دیگر فاکتورهای ویرولانس در *کاندیدا آلبیکنس* به شمار میرود. از آنجا که پروتئین ها از اجزای اصلی شیمیایی غشای سلولی میزبان هستند، برای دستیابی به درون سلول میزبان و همچنین رشد و گسترش میکروارگانیسم این پروتئین ها بوسیله آنزیم پروتئازها باید تجزیه شده بنابراین

۱. استادیار گروه میکروبیولوژی ، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (sohrabi.nakisa@gmail.com)
۲. گروه میکروبیولوژی ، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
٤. دانشجوی دکتری حرفه ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ایران

این آنزیم سبب نفوذ میکروارگانیسم به درون سلول میگردد و از عوامل مهم حدت در *کاندیدا آلبیکنس* به شمار می آید(۱).

افزایش گزارشات مبنی بر مقاومت سویه های *کاندیدا آلبیکنس* به داروهای ضد قارچی به عنوان خطری تهدید کننده برای زندگی افراد دارای نقص سیستم ایمنی مورد توجه قرار گرفته است(۱, ۷). تعدادی از داروهای ضد قارچی معمول برای درمان انواع کاندیدیازیس استفاده میشود ولی به دلیل مشکلاتی مانند اثرات جانبی، افزایش مقاومت به این داروها، قیمت بالا و کارایی نامناسب آنها در مقابل تعدادی از گونه های کاندیدا استفاده از استراتژی‌های جدید درمانی ضروری به نظر می‌رسد. اخیرا تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی در پاسخ به افزایش مستمر اثرات جانبی و مقاوت نسبت به داروهای ضد قارچی گسترش یافته است(۸). انتظار می رود ترکیبات طبیعی تولید یک یا تعدادی از فاکتور های حدت در غلظتهای پایین دارو را کاهش بدهد یا در تولید آن تداخل ایجاد کند و با کاهش بیماریزایی گونه های کاندیدا باعث غلبه بر گسترش مقاومت شود(۹, ۱۰). بره موم یک محصول طبیعی مشتق از رزین گیاهی تجمع یافته توسط زنبور عسل در دیواره داخلی کندوها می باشد و عمل محافظت از موم و زنبورها را بر عهده دارد بره موم از ۳۰ درصد موم، ۵۰ درصد صمغ (عمدتا فلاونوئید ها و اسیدهای فنلیک)، ۱۰ در صد چربی های ضروری، مواد آروماتیک و ۵ درصد پولن تشکیل شده است. فعالیت بیولوژیک بره موم به طور عمده به ترکیبات فنولی آن نظیر فلاونوئید ها وابسته است، پلی فنل ها به دلیل قابلیت مهار انواع آنزیم ها از نظر فارماکولوژیکی، جزء فعال بره موم بوده و غلظت بالای فلاونوئید ها فعالیت ضد میکروبی گسترده ایی را نشان داده است(۹, ۱۱). در این مطالعه بررسی اثر ضد قارچی عصاره الکلی بره موم در ایزوله های کلینیکی جدا شده از ضایعات دهان، واژن و ناخن بیماران انجام شد. همچنین به بررسی توانایی آن در جلوگیری از فعالیت پروتئازی ایزوله های مورد نظر به عنوان استراتژی درمانی درعفونتهای کاندیدایی پرداخته شد.

مواد و روش‌کار

ایزوله های مورد مطالعه

به منظور انجام این مطالعه ایزوله های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول با منشاء ضایعات دهانی (۱۵) نمونه، واژینال (۱۵) نمونه، ناخن(۸) نمونه و نمونه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 90028) مورد استفاده قرار گرفت. کلیه جدایه های بالینی مورد مطالعه از گنجینه قارچی مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. شایان ذکر است که جنس و گونه مخمری در مطالعات قبلی با استفاده از روش های کشت بر روی محیط کروم آگار کاندیدا، آزمون تولید لوله زایا و آزمایش جذب کربوهیدرات ها با استفاده از کیت تجاری RapIDTM Yeast Plus System (Remel. USA) مشخص گردیده بود. مقاومت جدایه های مورد مطالعه به داروی فلوکونازول نیز در مطالعات گذشته مشخص شده بود.

تهیه عصاره الکلی بره موم و بررسی ترکیبات آن

نمونه های بره موم از کندوهای زنبور عسل واقع در مناطق شمالی استان کردستان خریداری و در داخل کیسه های پلاستیکی استریل به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه های مذکور تا زمان استخراج عصاره در یخچال و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در ادامه عصاره گیری از بره موم در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام گردید. به طوریکه نمونه های بره موم خرد شدند و ۱۰ گرم از آن را در داخل یک بالن ۲۵۰ میلی لیتری و حجم آن را با استفاده از اتانول ۸۰ ٪ به ۱۰۰ میلی لیتر رسانیدیم. سپس با استفاده از شیکر بره موم با الکل به خوبی مخلوط شد و محلول به

دست آمده به مدت دو هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در مکانی تاریک جهت استخراج نگهداری شد. پس از آن جهت حذف موم، واکس و ذرات معلق نامحلول از عصاره، محلول به مدت ٢٤ ساعت در دمای۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید. فرایند انجماد فیلتر جهت حذف کامل مواد نامحلول سه مرتبه تکرار و بدین ترتیب عصاره اتانولی بره موم استخراج شد. سپس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی ترکیبات این عصاره شناخته شد.

تعیین اثر ضد قارچی عصاره بره موم بر روی سلول های مخمری *کاندیدا آلبیکنس* به روش میکرودایلوشن براث

در این مطالعه جهت تعیین حساسیت جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم فلوکونازول نسبت به عصاره اتانولی بره موم از روش رقت سازی در محیط مایع طبق دستورالعمل استاندارد (Clinical & Laboratory Standards Institute)CLSI و روش شماره M27-S4 استفاده گردید(۱۳, ۱۲). برای تهیه سوسپانسیون قارچی، ابتدا جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و به مدت ۱۷ تا ٢٤ ساعت در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سوسپانسیون دارای $۱۰^{۳}$ × ۲/۵–۰/۵سلول در هر میلی لیتر برای تست مورد نظر استفاده شد و غلظت نهایی عصاره بره موم از ۰/۰۳ تا ۷/۸ میلی گرم در هر میلی لیتر در محیط۱٦٤۰ RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA) تهیه شد. جهت انجام این تست از میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای استفاده شد. ۱۰۰میکرولیتر از غلظتهای عصاره بره موم مورد نظر، جداگانه به هر چاهک از میکروپلیت ریخته شد سپس به درون تمامی چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری اضافه شد. یک چاهک به عنوان کنترل منفی دارای ۲۰۰ میکرولیتر محیط۱٦٤۰ RPMI و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. به این ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر محیط۱٦٤۰ RPMI و۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری اضافه شد. برای هر جدایه دو تکرار در نظر گرفته شد. پلیت ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و پس از ٤۷ ساعت، حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره (Minimum Inhibitory Concentration) MIC قرائت گردید. برای تعیین حداقل غلظت کشنده MFC (Minimum Fungicidal Concentration) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از گوده ایی که به عنوان MIC در هر جدایه تعیین گردید و همچنین چندگوده با غلظت بالاتر از MIC که به ظاهر شفاف بودند بر روی محیط پوتیتو دکستروز آگار (PDA, HiMedia) کشت داده شد و در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و نتایج بعد از ٢٤ تا ٤۸ ساعت، مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظتی که مانع رشد *کاندیدا آلبیکنس* شده بود، به عنوان MFC در نظر گرفته شد.

ارزیابی فعالیت پروتئاز جدایه های *کاندیدا آلبیکنس*

جهت ارزیابی پروتئاز جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* از روش موهان و همکاران (١٦) استفاده شد. ابتدا ۱۱/۷ گرم) YCB Yeast Carbon Base) (Biomark) همراه با ۲ گرم سرم آلبومین گاوی (Merck) را با ۰/۱گرم yeast extract (Ibresco) در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس به ۸۰۰ میلی لیترآب مقطر همراه با ١٦ گرم آگار اضافه شد. سوسپانسیون استاندارد سلولی هر جدایه به میزان $۱۰^{٦}$×۱ سلول در هر میلی لیتر بر روی پلیت های حاوی محیط کشت توضیح داده شده در بالا کشت داده شد و به مدت ٦ روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. ناحیه فعالیت پروتئاز(Protease activity zone) Pz جدایه ها بوسیله اندازه گیری قطر هاله کلونی تقسیم بر قطر هاله کلونی بعلاوه منطقه رسوب که در اطراف کلونی مشاهده شد اندازه گیری شد.

P_Z = diameter of the colony / total diameter of the colony plus the precipitation zone

ارزیابی تاثیر عصاره بره موم بر فعالیت پروتئاز جدایه های *کاندیدا آلبیکنس*

جهت ارزیابی تاثیر عصاره بره موم بر فعالیت پروتئاز جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* سوسپانسیون استاندارد سلولی هر جدایه به میزان 1×10^6 سلول در هر میلی لیتر به همراه غلظت MIC عصاره بره موم و بدون عصاره (شاهد) بر روی پلیت های YCB همراه با سرم آلبومین گاوی و yeast extract به صورت لکه گذاری کشت داده شد و به مدت ٦ روز در دمای ٣٧ درجه انکوبه گردید. تاثیر عصاره بره موم بر فعالیت پروتئاز جدایه ها از طریق مقایسه قطر هاله کلونی جدایه های تیمار و کنترل محاسبه شد.

آنالیز آماری

در این مطالعه اغلب مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارزیابی گردید. رابطه معنادار متغیرها با استفاده از تست One Way ANOVA و نرم افزار SPSS نسخه ١٨ تعیین شد. ($P < 0.05$) به عنوان رابطه معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

ترکیبات عصاره بره موم

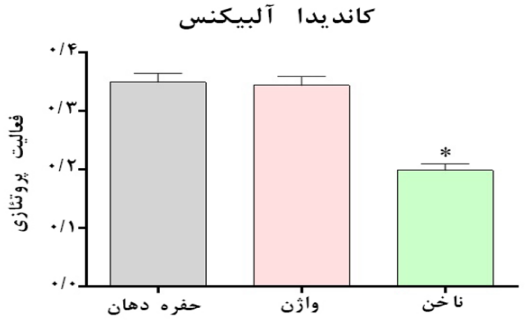
ترکیبات عصاره اتانولی بره موم با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی مشخص گردید. آنالیز عصاره پروپولیس وجود بیش از ٤٥ ترکیب شیمیایی منحصر به فرد را مشخص نمود. ترکیبات فنلیک، اسیدهای آروماتیک، اسیدهای آلیفاتیک، قندها، هیدروکربن های آروماتیک پلی سایکلیک عمده ترین ترکیبات این عصاره بودند.

حساسیت جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* به عصاره بره موم به روش میکرودایلوشن

مطابق نتایج بدست آمده در مطالعه قبلی(١٣)، بسته به نوع جدایه *کاندیدا آلبیکنس* میزان کمترین غلظت مهار کننده عصاره از ١٢٠/٢ تا ٩٧٠/٦ میکروگرم در هر میلی لیتر و کمترین غلظت کشنده آن از ٤٨٠/٨ تا ٣٩٠٠/٤ میکروگرم در هر میلی لیتر متغیر بود. در کل میانگین کمترین غلظت مهار کننده و کمترین غلظت کشنده عصاره برای تمامی جدایه های مورد مطالعه به ترتیب ٣٦٠/٦ و ١٢٥٠/١ میکروگرم در هر میلی لیتر محاسبه گردید. از طرفی میانگین کمترین غلظت مهار کننده عصاره در هر یک از گروه های دهان، واژن و ناخن به ترتیب شامل ٣٩٠/٨ ، ٣٨٠/٢ ، ٢٨٠/٥ میکروگرم در هر میلی لیتر محاسبه گردید.

تعیین فعالیت پروتئاز جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* در گروه های ناخن ، دهان، واژن

میانگین فعالیت پروتئازی جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* در نمودار ٣ مشخص شده است. میانگین فعالیت پروتئازی در گروهای ناخن، واژن و دهان به ترتیب برابر است با ٠/٠٣± ٠/٢، ٠/٠٦± ٠/٣٤ و ٠/٠٦ ± ٠/٣٥ که نشان دهنده فعالیت پروتئازی بالادر سه گروه ناخن، واژن و دهان است. هرچند جدایه های گروه ناخن اختلاف معناداری نسبت به دیگر جدایه های گروه های واژن و دهان نشان می دهد ($P<0.0001$).



نمودار ١: فعالیت پروتئازی جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* (گروه های دهان، واژن و ناخن)

تعیین تاثیر عصاره الکلی بره موم بر فعالیت پروتئاز جدایه های *کاندیدا آلبیکنس*

جدول۱- آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده عصاره الکلی بره موم با دستگاهGC-MS

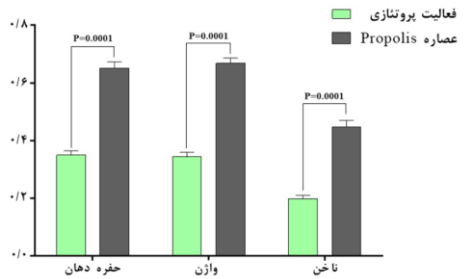
Peak number	Compound name
Aromatic acids	
1	Benzoic acid
3	p-Methoxy-Cinnamic acid
10	3,4-Dimethoxy-Cinnamic acid
12	Ferulic acid
13	Isoferulic acid
14	4-Methoxy-Cinnamic acid
15	Caffeic acid
Aliphatic acids	
3	Succinic acid
12	Palmitic acid
16	Octadecadienoic acid
Sugars	
6	D-Fructose
7	Glucofuranose
9	Talose
10	Treitol
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)	
8	7,14-Dihydro-dibenz[a,j]anthracene
37	(R)-(1)-2-Amino-20-(isopropylamino)-1,10-binaphthyl
33	1,3,6,7,8-Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2,4(1H,3H)-pteridindione
39	syn-Phenanthro[9,10:10,20][2.2]metacyclophan-1-ene
43	2-Imino-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,3,4-benzotriazepine
Phenolics	
17	3-Methyl-3-butenyl isoferulate
19	2,6-Di-t-butyl-4-nitro-phenol (DBNP)
40	5-(Hydroxymethyl)resorcinol
Other compounds	
45	Methylindan
21	Phoratoxon sulfone
25	Benzazepin derivatives
34	Pentachlorobenzenamine
40	2,5-Bis(4-methylphenyl)-1,4-dithiin
5	Methylthiouracil
18	p-Toluidine
20	Pinostrobin chalcone
22	4-Methyl-6,7-dimethoxy-2H-1,3-benzothiazine
27	Chalcone
29	2,4-Bis(methylthio)-5,6-dihydro-8-methoxybenz[f]isoquinoline
31	9,10-Bis(7-deuterobicyclo[4.1.0]hept-7-yl)-9,10-dihydro-anthracene
32	2-1-methylethyl)-8-oxo-1,2-dihydrofurano[2,3-H]2H-chromene
41	Buxozine-C
42	Salbutamol
46	Delta 1-tetrahydrocannabinolic acid
47	Guaifenesin
23,24,26,28,30,35,36,38,44	Unknown components

جدول ۲- تاثیر عصاره الکلی بره موم بر فعالیت پروتئازی جدایه های کاندیدا آلبیکنس

جدایه ها	منبع	فعالیت پروتئاز	تاثیر پروپولیس بر فعالیت پروتئاز
کاندیداآلبیکنس	حفره دهان	۰/۲۸±۰/۰۰۷	۰/۷٦±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۳۱±۰/۰۲	۰/۷۵±۰/۰۲
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/٤۵±۰۰۰۰	۰/۵۵±۰/۰۱
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۲۷±۰/۰۲	۰/۷۹±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۲۷±۰۰۰۰	۰/۷±۰۰۰۰
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/٤۰±۰/۰۰۷	۰/٦٤±۰/۰۲
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/٤۲±۰/۰۰۷	۰/٦۰±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۳۷±۰/۰۱	۰/۵۵±۰۰۰۰
کاندیداآلبیکنس	حفره دهان	۰/۳۷±۰۰۰۰	۰/٦۰±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۳٦±۰/۰۱	۰/٦۸±۰۰۰۰
کلندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۲۸	۰/۷۱±۰/۰۱
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/٤۰±۰/۰۰۷	۰/٦۷±۰/۰۱
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۳۱±۰/۰۱	۰/٦٦±۰۰۰۰
کاندیداآلبیکنس	حفره دهان	۰/۳۸±۰/۰۰۷	۰/۵۲±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	حفره دهان	۰/۳۳±۰/۰۱	۰/۵٤±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۲۷±۰/۰۰۷	۰/٦۵±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۲۵±۰/۰۰۷	۰/٦۱±۰/۰۲
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۳۵±۰۰۰۰	۰/٦۵±۰۰۰۰
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۳۱±۰/۰۱	۰/۷۳±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۲۹±۰۰۰۰	۰/۷۵±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/٤٤±۰/۰۰۷	۰/۷۸±۰۰۰۰
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/٤۱±۰/۰۰۷	۰/٦۷±۰۰۰۰
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/٤۱±۰/۰۲	۰/٦۸±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۳۸±۰۰۰۰	۰/۷۲±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۳۷±۰/۰۰۷	۰/۵۳±۰/۰۲
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۳۱±۰/۰۱	۰/۷۰±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۳۳±۰/۰۲	۰/٦۷±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۳۱	۰/۵٤±۰/۰۲
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/۲۸±۰۰۰۰	۰/٦±۰/۰۱
کاندیدا آلبیکنس	واژن	۰/٤۱±۰/۰٤	۰/٦۹±۰/۰۱
کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۱۸±۰/۰۰۷	۰/٤۱±۰/۰۱
کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۲۲±۰/۰۲	۰/٤۷±۰/۰۰۷

کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۱۷±۰/۰۰۷	۰/۵۱±۰/۰۲
کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۱۸±۰/۰۱	۰/۳٤±۰۰۰۰
کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۲±۰۰۰۰	۰/۵۱±۰/۰۱
کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۲±۰/۰۱	۰/٤۱±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۱٤±۰/۰٦	۰/۵۳±۰/۰۲
کاندیدا آلبیکنس	ناخن	۰/۲۱±۰/۰۱	۰/۳۷±۰/۰۰۷
کاندیدا آلبیکنس ATCC	ATCC	۰/۲٦±۰/۰۰۷	۰/٤۵±۰۰۰۰

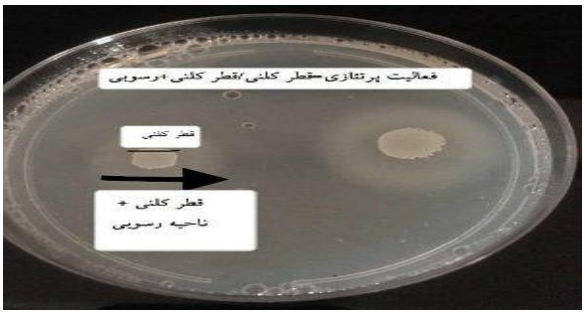
تاثیر MIC عصاره بره موم بر فعالیت پروتئازی در گروه های مختلف دهان، واژن و ناخن جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* ومقایسه آن با گروه کنترل در نمودار ٤ نشان داده شده است. فعالیت پروتئازی تمام گروه ها پس از تیمار با عصاره پروپولیس نسبت به گروه کنترل به طورمعناداری کاهش پیدا کرده است.($P<0.0001$). به طوریکه میزان فعالیت پروتئازی پس از تیمار با عصاره پروپولیس در گروههای دهان، واژن و ناخن به ترتیب ٪۰/۰۸± ۰/ ٦۵ ، ٪۰/۰۷ ± ۰/٦۷ و ٪۰/۰۷± ۰/٤۵ اندازه گیری شد که نشان دهنده فعالیت پروتئازی کمتری در مقایسه با گروه شاهد در همه گروهای مورد مطالعه بود.



نمودار ۲: فعالیت پروتئازی جدایه های کاندیدا البیکنس (گروه های حفره دهان، واژن و ناخن) تیمار شده با MIC عصاره بره موم ستون سبز نشان دهنده فعالیت پروتئازی جدایه ها (گروه شاهد) می باشد و ستون خاکستری گروه تیمار می باشد.

بحث

طبق مطالعات گسترده انجام شده، تا کنون در بین گونه های مختلف مخمری که در جنس کاندیدا طبقه بندی می شوند،



نگاره ۱: ناحیه رسوبی ناشی از فعالیت پروتئازی جدایه *کاندیدا آلبیکنس* سمت راست(نمونه شاهد) سمت چپ (نمونه تیمار)

کاندیدا آلبیکنس مهمترین گونه ای است که می تواند به اشکال مختلف ایجاد عفونت نماید.این ارگانیسم بر روی سطوح مخاطی بدن مانند مخاط دهان و واژن کلونیزه شده و ایجاد عفونت می نماید. از طرفی ترشح طیف وسیعی از آنزیم ها، *کاندیدا آلبیکنس* را قادر به نفوذ در لایه های سطحی پوست (کاندیدیازیس جلدی) و ناخن (اونیکومایکوزیس) می کند. این ارگانیسم در بیماران دچار ضعف یا نقصان سیستم ایمنی به دلیل شکل گیری ضایعات التهابی در اندام های داخلی می تواند ایجاد عفونت های سیستمیک کشنده نماید. توانایی این ارگانیسم درکلونیزه شدن بر روی سطوح مخاطی و در ادامه تهاجم و ایجاد بیماری به کمک فاکتورهای متعددی (فاکتورهای حدت) صورت می گیرد. (۱۳). یکی از مهمترین فاکتورهای حدت در *کاندیدا آلبیکنس* تولید آنزیم پروتئاز است که باعث افزایش توانایی کلونیزه شدن این میکروارگانیسم، نفوذ به بافت میزبان، گریز از سیستم ایمنی میزبان و تخریب در

پروتئین های مهم سیستم ایمنی از جمله ایمنوگلوبولین ها، پروتئین های کمپلمان و سایتوکانها شود(٤). در این مطالعه ابتدا ترکیبات شیمیایی عصاره بره موم و اثر ضد کاندیدایی آن بر روی جدایه های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* مورد ارزیابی قرار گرفت و در ادامه تاثیر عصاره مذکور بر فعالیت پروتئازی جدایه ها به عنوان فاکتور کلیدی حدت ارزیابی گردید. با توجه به نتایج بدست آمده، مهمترین ترکیبات موجود در بره موم استفاده شده در این مطالعه، شامل اسیدهای آروماتیک (مانند اسید بنزوئیک، اسید کافئیک و اسید فرولیک) فنولیک اسید، استرها، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بودند. ترکیبات فوق بسیار نزدیک به ترکیبات عصاره بره موم استفاده شده در مطالعه عبدالخانی و همکاران بودند(١٤). مطالعات متعددی برای تشخیص ترکیبات عصاره بره موم انجام شده است(١٥). تحقیقات بسیاری با بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره اتانولی بره موم نشان دادند که این اثر می تواند به دلیل وجود اسیدهای آروماتیک به خصوص اسید کافئیک در ترکیبات بره موم باشد(١٦). مطالعات انجام شده خاصیت ضد قارچی بالای عصاره اتانولی بره موم را بر روی *کاندیدا آلبیکنس* های جدا شده از واژن را نشان داده اند(١٧). در این مطالعه نیز اثر ضد کاندیدایی عصاره مذکور بر روی جدایه های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* نشان داده شد. با توجه به نتایج به دست آمده، کمترین غلظت مهار کننده عصاره از ١٢٠/٢ تا ٩٧٠/٦ میکروگرم در هر میلی لیتر و کمترین غلظت کشنده آن از ٤٨٠/٨ تا ٣٩٠٠/٤ میکروگرم در هر میلی لیتر متغیر بود. تفاوت در نتایج بدست آمده مبنی بر غلظت های تاثیر گذار متفاوت عصاره مذکور می تواند به دلیل تفاوت در ناحیه جغرافیایی، تفاوت در پوشش گیاهی مناطقی که بره موم از آن نواحی تهیه شده است، کیفیت و خلوص بره موم استفاده شده، فصل و زمان برداشت صمغ توسط زنبور عسل و نحوه عصاره گیری باشد(١٠).

بعلاوه نشان داده شده است که ترکیبات طبیعی مانند عصاره و اسانس گیاهان مانع فعالیت برخی از فاکتورهای حدت مانند تشکیل جرم تیوب بوسیله *کاندیدا آلبیکنس* میشود(١٠, ١٣, ١٨). مطالعات دیگر فعالیت ضد قارچی بره موم را ناشی از حضور ترکیبات با ساختار فنولیک شامل فلاونوئیدها، اسید فنولیک و استرها عنوان کردند(١٩). از آنجا که توانایی *کاندیدا آلبیکنس* برای ایجاد بیماری در ارتباط با فاکتورهای حدت مانند تولید آنزیمهای هیدرولیتیکی مانند آنزیم پروتئاز است در این مطالعه به بررسی تاثیر غلظت MIC عصاره بره موم بر فعالیت پروتئازی جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* پرداخته شد. مطالعات گذشته به استفاده از عصاره بره موم به عنوان عامل ضد کاندیدایی موثر اشاره میکند(٩, ١٩, ٢٠). بیش از ٩٠٪ در صد عفونت های مهاجم توسط *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد می شود. مطالعات بسیاری فعالیت اگزوآنزیم های کاندیدا را که از سطوح مخاطی جدا شده بودند، ارزیابی کردند. جدایه های کاندیدا آنزیم های خارج سلولی بیشتری را نسبت به فرم کمنسال تولید می کند. عوامل بسیاری مسبب حدت و بیماریزایی سویه های کاندیدا گردیده که فرایند کلونیزاسیون در نواحی مختلف بدن را تسهیل می کنند. تولید پروتئازها در کاندیدا به عنوان فاکتور حدت مهمی شناخته شده است. فقدان یا کاهش تولید پروتئازها موجب کاهش حدت برخی سویه های کاندیدا می شود. در مطالعه متیو و همکاران (٨) ٩٧٪ ایزوله ها فعالیت پروتئاز داشتند. که با نتایج تحقیق ما همخوانی داشت. در مطالعه موهان و همکاران(٨) تنها ٤٥٪ ایزوله ها فعالیت پروتئاز را نشان دادند که علت این اختلاف احتمالا حدت بالای ایزوله های مورد مطالعه حاضر بوده است .مطالعات کمی تولید پروتئاز ها را توسط سویه های کاندیدا مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه دیگر(٢١) ٩٣٪ ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* فعالیت پروتئازی داشتند و از قسمتهای مختلف آناتومیکی جدا شده بودند که نتایج این مطالعه با

تحقیق حاضر مطابقت داشت. در مطالعه آنتونلا نیز جدا یه های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از خون فعالیت پروتئاز بیشتری نسبت به ایزوله های جدا شده از ادرار و زخم داشتند. به نظر می رسد میزان فعالیت پروتئازی با ناحیه آناتومیکی استقرار عفونت مرتبط می باشد. در مطالعه حاضر نیز ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از ضایعات ناخن فعالیت پروتئازی معنی داری نسبت به ایزوله های دهان و واژن نشان دادند. این تفاوت در فعالیت آنزیمی در جدایه های کاندیدا می تواند به برخی عوامل مانند روش مورد استفاده در بررسی فعالیت پروتئازی، میزان نمونه، نوع عفونت، مرحله عفونت، جایگاه آناتومیکی عفونت و پاسخ ایمنی میزبان و همچنین الگوی متفاوت تولید آنزیم درجدایه های کاندیدا مرتبط باشد. در این تحقیق اثر عصاره بره موم برروی فعالیت پروتئازی نیز مورد مطالعه قرار گرفت که تاکنون مطالعه ای در این راستا انجام نشده است. غلظت MIC عصاره بره موم، میزان فعالیت پروتئازی را در تمام جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* به صورت معنی داری کاهش داد. اما عصاره مورد مطالعه قادر به غیر فعال کردن کامل فعالیت پروتئاز در غلظت های MIC مربوط به هریک از جدایه های مورد مطالعه نبود.

فهرست منابع

1. Matsumoto H, Nagao J-i, Cho T, Kodama J. Evaluation of pathogenicity of Candida albicans in germination-ready states using a silkworm infection model. Medical mycology journal. 2013;54(2):131-40.
2. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of Candida species isolated from blood cultures. Mycopathologia. 2007;164(6):265.
3. Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R. Insights into Candida tropicalis nosocomial infections and virulence factors. European journal of clinical microbiology & infectious diseases. 2012;31(7):1399-412.
4. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de Candida albicans provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. Revista iberoamericana de micología. 2008;25(1):12-6.
5. Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006;101(5):49.۷-۳
6. Budtz-Jörgensen E. Proteolytic activity of Candida spp. as related to the pathogenesis of denture stomatitis. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1974;12(2):266-71.
7. Yuan X, Mitchell BM, Hua X, Davis DA, Wilhelmus KR. The RIM101 signal transduction pathway regulates Candida albicans virulence during experimental keratomycosis. Investigative ophthalmology & visual science. 2010;51(9):4668-76.
8. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli LdS, Oliveira FdM, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of Candida albicans. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2013;46(3):340-2.
9. Herrera CL, Alvear M, Barrientos L, Montenegro G, Salazar LA. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on Candida spp. Ciencia e investigación agraria. 2010;37(1):75-84.
10. Marcucci MC, Ferreres F, Garcıa-Viguera C, Bankova V, De Castro S, Dantas A, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of ethnopharmacology. 2001;74(2):105-12.
11. Dota KFD, Consolaro MEL, Svidzinski TIE, Bruschi ML. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011;2011.
12. Katiraee F, Teifoori F, Soltani M. Emergence of azole-resistant Candida species in AIDS patients with oropharyngeal candidiasis in Iran. Current medical mycology. 2015;1(3):11.
13. Haghdoost N, Salehi T, Khosravi A, Sharifzadeh A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of Candida albicans. Journal

de mycologie medicale. 2016;26(4):298-305.
14. Abdulkhani A, Hosseinzadeh J, Ashori A, Esmaeeli H. Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/polylactic acid composites coated with ethanolic extract of propolis. Polymer Composites. 2017;38(1):13-9.
15. Marcucci M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 1995;26(2):83-99.
16. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28.
17. Cannon R, Chaffin W. Oral colonization by Candida albicans. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 1999;10(3):359-83.
18. Budzyńska A, Sadowska B, Więckowska-Szakiel M, Różalska B. Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of Candida albicans under the influence of selected plant essential oils. Acta Biochimica Polonica. 2014;61(1.(
19. Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in Candida albicans biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. BMC microbiology. 2010;10(1):114.
20. D'auria F, Tecca M, Scazzocchio F, Renzini V, Strippoli V. Effect of propolis on virulence factors of Candida albicans. Journal of chemotherapy. 2003;15(5):454-60.
21. Kantarcioğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains: Phospholipase-and Protease-Aktivitat bei klinischenCandida-Isolaten mit Bezug zur Herkunft der Stämme. Mycoses. 2002;45(5-6):160-5.