




Original Article

Histopathology of Propolis Ethanolic Extract (EEP) effects on inflammatory reactions in Experimental Cutaneous Candidiasis in goats

**Kamiyar Eslamee Milanee¹ , Aliasghar Tehrani^{1*} , Vahid Najjarnejad², Abdolghaffar Ownagh³ ,
Masoumeh Pourjabali⁴ **

¹Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

²Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁴Department of Pathology, School of Medicine, University of Medical Sciences, Urmia, Iran

*Corresponding author; E-mail: aa.tehrani@urmia.ac.ir

Received: 29 November 2016 Accepted: 12 February 2017 First Published online: 7 July 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 August-September; 40(3):16-25

Abstract

Background: During the history, researchers studied the healing effects of traditional medicine against many infectious diseases. In order to explore therapeutic role of Propolis Ethanolic Extract (EEP), an experimental cutaneous candidiasis was induced in goat model as InVivo study.

Methods: Four young healthy goats without any skin fungal infection were selected from different herds. The skin on both sides of the lateral thoracic and flank areas of the studied animals were shaved. The *Candida albicans* CPTC 5027 suspension were inoculated on each site. On day 8th, 64 large abscesses and pimples were appeared on all inoculated sites. All treatments begun on 8th day. Wideness of Cutaneous Candidiasis lesions on all sites of all goats scaled by a ruler during this study in centimeter and monitored planimetrically and analyzed statistically. Biopsy were collected on particular days under local anesthesia after intradermal inoculation date. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E) and special stain of G.M.S. for fungal infection.

Results: Comparison of the values for different treatments revealed a significant reduction in abscess size and inflammatory signs in EEP treated group comparing to Nystatin treated, Glycerin treated and untreated groups ($P \leq 0.05$). Histological findings showed anti-inflammatory results, with better cutaneous repair, sebaceous, sweat gland, and hair follicle regeneration in EEP group, better than other treatment groups ($P \leq 0.05$).

Conclusion: EEP has a considerable anti-inflammatory and antifungal effects even more better than Nystatin, without its side effects (scar formation, shedding of infected crust, "treatment dependent hypersensitivity").

Keywords: Histology, Pathology, Candidiasis, Skin, Propolis, Ethanol, EEP, Goat Skin

How to cite this article: Eslamee Milanee K, Tehrani A, Najjarnejad V, Ownagh A gh, Pourjabali M. [Histopathology of Propolis Ethanolic Extract (EEP) effects on inflammatory reactions in Experimental Cutaneous Candidiasis in goats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 August-September;40(3):16-25. Persian.

مقاله پژوهشی

هیستوپاتولوژی اثرات عصاره اتانولی بره موم بر واکنشهای التهابی در کاندیدیازیز جلدی تجربی در بز

کامیار اسلامی میلانی^۱، علی اصغر طهرانی^{۱*}، وحید نجارنژاد^۲، عبدالغفار اونق^۳، معصومه پورجبلی^۴

^۱ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۲ گروه بیماری‌های درونی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۳ گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۴ گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
 * نویسنده مسوول: ایمیل: aa.tehrani@urmia.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۹/۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۴/۱۶

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۷؛ ۴۰(۳): ۱۶-۲۵

چکیده

زمینه: در طول تاریخ محققین داروها و مواد حاصل از طب سنتی و جایگزین زیادی را در شرایط (InVivo) علیه اجرام کاندیدیایی تحت بررسی قرار داده و برای درمان ضایعات کاندیدیازیز جلدی ناشی از کاندیدا آلبیکنس پیشنهاد کرده‌اند. در این مطالعه، عصاره اتانولی بره موم (Ethanolic Extract of EEP) جهت بررسی InVivo روی مدل حیوانی بز مورد مطالعه هیستوپاتولوژیک قرار گرفت.

روش کار: تعداد ۴ بز جوان سالم و بدون علائم عفونت جلدی قارچی از گله‌های مختلف انتخاب شد. موهای مناطق سینه‌ای راست و چپ و تهیگاه راست و چپ همه بزها در هر دو طرف تراشیده شد. بطور داخل جلدی به هر ناحیه از محلول سوسپانسیون کاندیدا آلبیکنس (PTCC5027) تلقیح گردید. ۸ روز پس از تلقیح در همه این مناطق به تعداد ۶۴ عدد جوش و آبه در محل تزریق ایجاد شد. در روز هشتم درمان با تیمارها و کنترل شروع گردید. به ترتیب جوشهای هر سمت از هر ناحیه جداگانه، تحت درمان با داروهای مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های بیوپسی در روزهای مشخصی از بعد از روز تلقیح، با بی‌حسی موضعی، برداشته شدند. اندازه قطر ضایعات ماکروسکوپی با یک خط‌کش در طول مطالعه حین عکسبرداری سنجیده شد. برای مطالعه میکروسکوپی مقاطع رنگ‌آمیزی H&E و اختصاصی GMS برای تعیین درجه آلودگی قارچی بکار برده شد.

یافته‌ها: ماکروسکوپی: در گروه جوشهای درمان شده با عصاره اتانولی بره موم از لحاظ کاهش دهندگی علائم التهاب و اندازه جوشها به طور محسوسی از گروه درمانی با گلیسرین (شم)، نیستاتین و گروه عدم درمان متفاوت بود ($P \leq 0/05$).

میکروسکوپی: اثرات ضد التهابی، ترمیم ضایعات، بازسازی غدد عرق، سباسبه و فولیکولهای مو و حذف کامل کیست آبه از درم، در گروه درمانی عصاره اتانولی بره موم که به مدت حداقل یک هفته با استعمال خارجی انجام شده بود، نسبت به گروه درمان نشده بطور معنی‌دار واضح‌تر بودند ($P \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی بره موم دارای اثرات ضد قارچی و ضد التهابی قابل مقایسه با نیستاتین در درمان کاندیدیا زیر جلدی تجربی مدل حیوانی بز داشت. اثرات ضد قارچی این عصاره در درمان زخم کاندیدیایی نسبت به گروه نیستاتین بهتر بوده به طوری که در این گروه اثرات جانبی (ایجاد بافت اسکار همراه با دفع کروسست آلوده و ازدیاد حساسیت وابسته به درمان) که در گروه نیستاتین ایجاد شده بود دیده نشد.

کلید واژه‌ها: هیستوپاتولوژی، پاتولوژی، کاندیدیازیز، جلدی، عصاره اتانولی بره موم (EEP)، بز

نحوه استناد به این مقاله: اسلامی میلانی ک، طهرانی ع، نجارنژاد ا، اونق ع، پورجبلی م. هیستوپاتولوژی اثرات عصاره اتانولی بره موم بر واکنشهای التهابی در کاندیدیازیز جلدی تجربی در بز. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۳): ۱۶-۲۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

کاندیدیازیس (Candidiasis (candidosis, moniliasis, thrush یک عفونت قارچی ناشی از مخمرهایی به نام کاندیدا است. بیش از ۲۰ گونه مخمر شناسایی شده است که از بین آنها گونه کاندیدا آلیکنس می‌تواند باعث ایجاد عفونت در انسان و دامها شود. کاندیدا آلیکنس شایع‌ترین عامل ایجاد کاندیدیازیس شناخته شده است. مخمر کاندیدا بعنوان یک فلور طبیعی فرصت‌طلب در سطح پوست و مخاطات زندگی می‌کنند. با فراهم شدن شرایط رشد بیش از حد این پاتوژن، علائم کاندیدیازیس بروز می‌دهند که علائم آن بسته به محل آلودگی، متغیر است (۱). کاندیدیازیس جلدی بعنوان یک مشکل جدی در افراد دچار نقص سیستم ایمنی و کودکان و افراد دیابتی می‌باشد. کمبود آهن، ویتامین B۱۲ و فولات و وجود کربوهیدرات زیاد در جیره و دیابت متابولیک نیز در میزان بروز کاندیدیازیس موثرند. کاندیدیازیس در سگ، گربه، اسب، بز و طیور گزارش شده است (۲-۴). کاندیدیازیس مخاط دهان و گلو یا کاندیدیازیس آروفرینکس به اسم برفک یا Thrush نیز معروف است. کاندیدیازیس که مخاط واژن را درگیر می‌کند، واژینیت قارچی را در زنان ایجاد می‌کند. بیماری بالینی نوع سومی نیز در انسان و دامها وجود دارد که به دنبال ورود برخی از سویه‌های کاندیدیای مهاجم به خون کاندیدیازیس سیستمیک رخ می‌دهد که ممکن است در این شکل از بیماری با علائم پوستی کاندیدیازیس نیز مشاهده شود (۵ و ۶).

ضایعات کاندیدیازیس جلدی ابتدا به بافت مرده کراتینه شده در طبقه شاخی پوست و مو، ناخن محدود می‌شود. نوع ضایعات آن از وزیکول، پاپول و پوستول تا ایجاد اولسر با لبه‌های تیز و مجزاکنده ناحیه پرخون با سطح بدبو و یا اگزودای سفید و خاکستری، متغیر است. ضایعات مزمن آن بصورت پوست هیپرکراتوتیک نازک شده و بدون مو با چین خوردگیهای برجسته مشخص می‌شود. سایر تغییرات بافت شناختی آن شامل هایپرکراتوزیس، پاراکراتوزیس، پوستولهای سطحی و سابگرنال و نیز اسپونژیوزیس است. لایه درم ادماتوز بوده و حاوی تراوش اطراف عروقی و در داخل ماتریکس بینابینی است. نوتروفیلها و واکنشهای ایمنی با واسطه سلول T نیز از مکانیسمهای اصلی حذف کاندیدا از سطح پوست هستند (۷ و ۸). می‌توان مخمر، سودوهایف و هایف آن را با رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی با روش Grocott's modification of Periodic Acid Schiff (PAS) و یا Gomori's Methenamine Silver (GMS) به خوبی مشاهده نمود که اشکال مخمری، بیشتر در نزدیک سطح ضایعه مشاهده می‌شود و اشکال سودوهایف و هایف بیشتر در اپیدرمیس گسترش می‌یابند (۴-۲ و ۹).

پیش از این، مطالعه کاندیدیازیس جلدی تجربی صرفاً جهت شناخت پاتوژنز و بررسی عوامل دخیل در ایجاد آماس و التهاب

ناشی از این عفونت بر روی موش (۹) و خوکچه هندی (۱۰) ایجاد شده بود. تهیه نمونه‌های بیوپسی و بررسی هیستوپاتولوژی آنها، با هدف شناسایی دقیق حذف یا عدم حذف میکروارگانیزم و همچنین بررسی واکنشهای آماسی و ترمیمی در بافت، حائز اهمیت می‌باشد. بخصوص اگر این ضایعات تحت درمان با داروها قرارگیرند، اهمیت آن برای محققین کنترل کیفیت دارو جهت اطمینان از پاسخ قطعی این نوع داروها، دوچندان می‌شود.

تا به امروز علاوه بر تهیه داروهای ژنریک صنعتی، برای تهیه داروهای ضد قارچ سنتی و درمان ضایعات، تلاشهای زیادی انجام شده است تا نتایج رضایتبخش تری (از لحاظ طول مدت دوره درمانی و مؤثر بودن داروهای ضد قارچی) بدست آید. Ownagh و همکاران میزان مواد موجود در عصاره اتانولی بره موم منطقه استان آذربایجان غربی را توسط کروماتوگرافی گازی GC-MS سنجیده و فیتوآنالیز آنها را بدست آورده (۱۱) و از آن برای درمان کراتیت کاندیدیایی تجربی در قرینه چشم خرگوش استفاده نمودند که نتایج رضایتبخشی داشت (۱۲).

بره-موم دارای محتویات مختلفی با مقادیر متغیر از مواد مؤثره-ای است. نوع و مقدار این مواد مؤثره بسته به منطقه جغرافیایی و میزان تغذیه زنبورها از انواع گیاهان متنوع آن منطقه، متفاوت است. اکثریت این مواد مؤثر، جزو فلاوونن‌ها (فلاونوئیدها) هستند. سه خاصیت ضدالتهابی و ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بره-موم را به این مواد نسبت داده‌اند (۱۶-۱۳).

ایجاد کاندیدیازیس جلدی تجربی در بز می‌تواند مدل خوبی برای مطالعه هیستوپاتولوژیک مراحل پاتوژنز و حذف میکرو-ارگانیزم کاندیدا آلیکنس و آزمایش اثر درمانی عصاره اتانولی بره موم (EEP) و تأثیر آن بر روی پارامترهای التهابی و ترمیمی باشد. هدف از انجام این تحقیق مطالعه پاتولوژیک کاندیدیازیس جلدی در مدل حیوانی بز و اثرات درمانی EEP بر آن بود. در مقایسه با جوندگان، پوست بز ضخامت و لایه کراتینه کافی بیشتری نسبت به حیوانات آزمایشگاهی برای بررسی واکنشهای التهابی و تغییرات و ضایعات بافتی دارد.

روش کار

پروتکل این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه ارومیه در مورد حیوانات آزمایشگاهی تنظیم گردید و به تصویب رسید. در این تحقیق از کاندیدا آلیکنس (PTCC 5027) موجود در آرشیو بخش قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه استفاده شد. برای تهیه عصاره اتانولی بره موم، از بره موم (جمع‌آوری شده از منطقه آذربایجان غربی در اوایل فصل پاییز) دارای قوام خمیری و تهیه شده از کندوهای زنبور عسل، استفاده شد. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی کاندیدا آلیکنس با دوزاژ معین و عصاره

تحت هیچ درمانی قرار نگرفت. از تیوپ پماد جلدی نیستاتین ۱۵ گرمی حاوی هر ۱۰۰ گرمی که حاوی ۱۰ میلیون واحد است (ساخت داروسازی جابر بن حیان، تهران-ایران) بعنوان داروی استاندارد سنتتیک بصورت موضعی روزی ۲ بار در محل جراحات ایجاد شده در سمت چپ ناحیه قفسه سینه استفاده گردید.

جهت بررسی ماکروسکوپی مراحل ایجاد ضایعات و روند درمان، محل تلقیح کاندیدا آلبیکنس از زمان تلقیح تا زمان جراحات و به موازات درمان جراحات بصورت روزانه تا روز نوزدهم عکسبرداری گردید. جهت بررسی هیستوپاتولوژیک ضایعات بعد از تلقیح، نمونه‌های بیوپسی در روزهای صفر (برای نمونه پوست سالم)، روز دوم، ششم، هشتم، یازدهم و روز پانزدهم بعد از تلقیح اجرام کاندیدا آلبیکنس با بی‌حسی موضعی تزریق لیدوکائین ادرنالینه (ساخت شرکت نصر فریمان، ایران)، برداشته شدند. نمونه‌ها در محلول فرمالین بفره ۱۰٪ فیکس شده و به آزمایشگاه ارسال گردید. پس از فیکساسیون و مراحل پاساژ بافتی و قالب‌گیری با بلوک پارافینه، یک لام از هر کوپ پارافینی برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H & E) و یک لام برای رنگ-آمیزی اختصاصی Gomori's Methenamine Silver (G.M.S) برای مشاهده اجرام احتمالی در هر دو مرحله ایجاد بیماریزایی و درمان، تهیه شد. برای عکسبرداری از نمای میکروسکوپی از دوربین Dino-Lite AM ۲۳۷۰ با مقیاس زنی L شکل و نیز دوربین Euromex 1300 با مقیاس زنی خطی شکل و با دقت عکسبرداری ۱/۳ مگاپیکسل و نرم‌افزار Image Focus 3 مربوط به آن برای وارد کردن مقیاس در تصاویر کمک گرفته شد.

در رنگ‌آمیزی اختصاصی G.M.S. با توجه به رنگ گرفتن کاندیدا با املاح نقره، بصورت نقاط سیاه رنگ در پس زمینه سبز «رنگ‌آمیزی لایت گرین»، با شکلها و الگوهای مختلف قرارگیری در بافت (درصورت آلوده بودن نمونه‌ها)، رشته‌های هایف و سودوهایف و اجرام مخمری شکل قابل مشاهده شدند (تصویر ۲). بر اساس مشاهده یا عدم مشاهده این الگوهای مختلف، وخامت آلودگی بافتی، رتبه‌بندی شد و مقدار آلودگی به عنوان فاکتور هیستومورفومتریک مورد آنالیز آماری نیمه کمی قرار گرفت تا بتوان درباره ضد قارچ بودن گروههای مختلف درمانی نیز قضاوت نموده و تأثیر گروههای درمانی را امتیازبندی کرد (جدول ۲). بدین ترتیب که اگر ترکیبی از همه علائم آلودگی ذکر شده در تصویر ۲ را علاوه بر تخریب بافتی، التهاب و آبنه (ستون چپ تصویر ۱) را داشت، بسیار شدید (+++++)؛ اگر آبنه و اکثر علائم آلودگی را داشت، شدید (++++)، اگر برخی از علائم آلودگی مذکور، به نسبت کمتر و متوسط را داشت، متوسط (+++)، اگر آبنه کوچک بود و مقدار کمی از علائم آلودگی مشاهده شد، ملایم (++)، اگر دارای میکروآبنه بود و آلودگی آن در حد ناچیزی بود و تشخیص آلودگی و آبنه‌ها با زحمت بسیار مواجه

اتانولی بره موم با غلظت مشخص، از روشهای استاندارد شده در مطالعات قبلی، استفاده شد (۱۱). کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) و دوزاژ مؤثر این عصاره اتانولی بره موم مورد مطالعه پیشین، در شرایط آزمایشگاهی روی گونه‌های مختلف قارچی قبلاً توسط Ownagh و همکاران آزموده شد و $1000 \mu\text{g/ml}$ به عنوان دوزاژ مؤثر مورد استفاده در این تحقیق تعیین گردید (۱۱).

تعداد ۴ رأس بز نر ۱۰ ماهه بعد از خریداری برای دو هفته (دوره آدپتاسیون) در محل کلینیک دانشکده دامپزشکی نگهداری شدند تا از نظر سلامت ارزیابی شوند و با ۲ داروی ضدانگل وسیع‌الطیف آلبندازول (ساخت شرکت رازک، ایران)، با دوز $7/5 \text{ mg/Kg}$ و ۲ دوز به فاصله دو هفته و با یک تک دوز آیورمکتین $0/2 \text{ mg/Kg}$ بر علیه انگلهای مختلف درمان گردیدند. برای درمان و پیشگیری از سایر بیماریهای میکروبی پوستی نیز از داروی آنتی‌بیوتیکی اکسی‌تراسایکلین ۲۰٪ با رعایت (زمان فاصله انداختن) مناسب بین درمان آنتی‌بیوتیکی و ایجاد بیماری تجربی، با دوز 11 mg/Kg یکبار زیر جلدی تجویز شد. برای ایجاد بیماری پوستی موهای سمت راست و چپ در ناحیه قفسه سینه و گودی تهیگاه، در هر دو طرف تمام داهما، در هر ناحیه به مساحت حدود ۱۰ سانتی‌متر مربع تراشیده شد. جهت تضعیف سیستم ایمنی بدن حیوانات، دگزامتازون (ساخت شرکت ابوریحان، ایران)، با دوز 2 mg/Kg یکبار در روز، به مدت ۴ روز، بصورت عضلانی تزریق گردید. در روز پنجم در نواحی مشخص شده و در هر ناحیه به تعداد ۴ تزریق روی هر کدام از نواحی تراشیده شد و به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول سوسپانسیون با دوز 10^6 واحد کلنی در میلی‌لیتر (معادل نیم مک فارلند) کاندیدا آلبیکنس، بصورت داخل جلدی تلقیح گردید.

به تعداد ۴ جوش (آبنه درمی)، در چهار ناحیه تراشیده شده هر حیوان، ایجاد شد. هر ۴ جوش ایجاد شده در هر ناحیه‌ای (چه ناحیه سینه‌ای و چه ناحیه تهیگاهی) به عنوان یک گروه درمانی، در نظر گرفته شد. این کار، در ۴ حیوان تکرار شد تا تکرار پذیری مناسب فراهم شود؛ و بدین ترتیب برای هر گروه درمانی ۱۶ جوش تهیه شد و در مجموع، کل جوشها به ۶۴ عدد رسید.

بعد از ۸ روز از ایجاد ضایعات جلدی از عصاره اتانولی بره موم در محلول گلیسرین با دوزاژ $1000 \mu\text{g/ml}$ جهت درمان بصورت موضعی روزی دو بار در محل جراحات ایجاد شده در سمت راست ناحیه قفسه سینه استفاده گردید. جهت اطمینان از بی اثر بودن گلیسرین، بعد از ایجاد ضایعات جلدی، گلیسرین خالص بعنوان ماده بی اثر بصورت موضعی روزی دو بار در محل جراحات پوستی ایجاد شده در گودی تهیگاه راست مورد استفاده قرار گرفت. در گودی تهیگاه چپ همانند سایر نواحی جراحی به صورت ۴ جوش، در هر چهار بز ایجاد گردید ولی تا پایان مطالعه

سایدگی که رأس آنها لخته خونی داشت، تا انتهای مطالعه بدون تغییر باقی ماندند.

نتایج میکروسکوپی: بررسی هیستوپاتولوژیک بافتها نشان داد که در تمام گروهها قبل از درمان، شرایط مشابه واکنشهای بافتی برقرار بوده و هیچ تفاوت معنی داری در پارامترهای هیستومرفومتیک در گروههای مختلف درمانی وجود نداشت ($P > 0/05$) (تصویر ۱؛ تصاویر ستون سمت چپ). دیپادز لگوستیها (عمدتاً نوتروفیل) در ۴۸ ساعت اول بعد از تزریق مشاهده شد. نوتروفیلها در اطراف عروق و فولیکولهای مو نیز تجمع کرده بودند. جراحات فولیکولها و آبه مهمترین یافته در کاندیدیازیز بز بود. افزایش سریع تعداد نوتروفیلها باعث تشکیل آبه در دم تا روز هشتم بعد از تلقیح در همه گروهها شده بود. بطوریکه در محل اتصال مابین آبه بزرگ در دم و اپیدرم، تمامی ضمامم بافتی (مجاری غدد عرق، غدد سباسه و فولیکول مو) از بین رفته بودند. فولیکولهای مجاور ضایعه بشدت آتساع پیدا کرده و نکروتیک بودند و از مواد کراتینه لایه لایه متحدالمرکز پر شده بودند. این بقایای فولیکولی به تدریج به سمت سطح اپیدرم، از قشرشان کاسته شده و از سطح اپیتلیوم شاخی در حال دفع شدن، بودند. محللهای دفع و به بیرون زدن این فولیکولهای تحلیل رفته و مواد کراتینه همراه آنها که گاهی حاوی گلولههای قرمز خون بزرگ و فرم مخمری قارچ بود، سطح اپیتلیوم را گوده دار نموده و بدین ترتیب در تمامی سطوح اپیتلیوم ایجاد ناهمواری غیرطبیعی کرده بودند. پس از سه روز درمان با EEP آبهها کوچک شده بودند و تفاوت معنی دار و چشمگیری در اندازه آبه با گروه درمان نشده وجود داشت ($P \leq 0/05$). در روز هفتم بعد از درمان با EEP، اپیتلیوم اندازه طبیعی داشته، فولیکولهای موی سطحی، میانی و عمقی طبیعی بود، و آبههای دیده نشد. در این گروه درمانی سلولهای پلی مرفونوکلوتر در اطراف مویرگهای زیر اپیتلیوم مطابق شاخی در بین رته پگها، جای خود را به سلولهای تک هسته‌ای و پلاسماسلها داده بودند. در گروه درمان با گلیسرین، در روز سوم و هفتم بعد از درمان، آبه بزرگی در دم وجود داشت و فولیکولهای دوباره سازی شده به تعداد کم و نکروتیک بودند. اپیتلیوم ضخیم و دارای کروسست آلوده بودند. فیروز همراه با سایر علائم مزمن شدن بیماری پوستی مشاهده شد. در گروه درمان شده با نیستاتین، ضمامم بافتی در روز سوم بعد از درمان، دیده نشدند. اپیتلیوم نکروتیک و کروسست آلوده وجود داشت. در روز هفتم بعد از درمان، تمام ضمامم بافتی، که شامل سه منطقه فولیکول موی سطحی (۱) همراه با غدد سباسه و مجاری عرق، میانی (۲) و عمقی (۳) می باشد، وجود داشت (تصویر ۱؛ مقایسه تصاویر ستون چپ و راست).

بود، آلودگی ناچیز (+)، در صورتیکه موردی از بیوپسی دیده شد که برخلاف سایرین درمان نشده بود و یا آلودگی داشت، آلوده (-)، اعلام شد و اگر همه نمونه‌ها عاری از علائم آلودگی و میکروآبه بود، پاک (-)، اعلام گردید.

داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری قطر ماکروسکوپیک جوشها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA)، مورد بررسی آماری قرار گرفتند. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean=SD) نشان داده شدند. برای داده‌های نیمه-کمیتی نیز از آزمون Kruskal-Wallis استفاده گردید (۱۷). از نرم‌افزار SPSS 18 کمک گرفته شد. تفاوت در سطح $P \leq 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تغییرات ماکروسکوپیک بافتی در گروههای مختلف آزمایشی در مراحل ایجاد بیماری و ترمیم ناشی از داروی درمانی، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج میانگین قطر وسعت جوشها با مقیاس سانتی‌متر در جدول ۱ قابل مشاهده است.

طبق مشاهدات، در روز تلقیح محللهای تزریق در یکی از بزها به طور واکنشی با شدت بسیار زیادتری پرخون شد. یک روز بعد از تلقیح داخل جلدی کاندیدا آلیکنس، محل تلقیح کمی پرخون شدند ولی در تمام نواحی میزان پرخونی یکسان بود. محل تلقیح در روز دوم واضح‌تر بود. چهار روز بعد از تلقیح کاندیدا آلیکنس نشانه‌های بالینی بصورت تورم جلدی با مرکز کاملاً برجسته، قابل لمس، گرم، دردناک، قرمز شدن و سپس با پوسته پوسته شدن ناحیه تلقیح مشخص گردید. محل تلقیح کاندیدا آلیکنس تا روز هشتم (روز شروع درمانها) حالت تاول مانند بودند و دارای ارتفاع ۰/۵ سانتی متر تا یک سانتی متر از سطح پوست طبیعی بودند. برخی از این جوشها دارای ترشحات چرکی از ناحیه رأسی بودند. ضایعات جلدی ایجاد شده بدنبال تجویز بره موم برای پنج روز و تجویز نیستاتین برای هفت روز بطور کامل بهبود یافتند، درحالیکه بدنبال عدم درمان و یا تجویز گلیسرین، در روز ششم بعد از تلقیح کاندیدا آلیکنس، جراحات به سطح پوست سر باز کرده و از آن ترشحات غلیظ کرم رنگ خارج گردید. در پایان روز یازدهم درمان جراحات پوسته پوسته شدگی و اولسر در محل تلقیح کاندیدا آلیکنس در گروه‌های عدم درمان و آروزبون، در گروه درمان شونده با گلیسرین وجود داشت. سه روز پس از درمان با نیستاتین ناحیه سینه ای سمت چپ یکی از بزها دچار قرمزی پوست و «واکنش ازدیاد حساسیت وابسته به درمان» شده بود. از سایدگی محل ناحیه، مشخص بود که بز دچار خارش نیز بوده است. نهایتاً اغلب محللهای تزریق کاندیدا که با نیستاتین درمان شدند، به شکل برجستگی کوچک (یا بدون برجستگی) و اثر

جدول ۱: میانگین قطر ماکروسکوپیک جوشها (به سانتیمتر) در گروههای مختلف در زمانهای متفاوت در طول مطالعه بعد از تزریق داخل جلدی کاندیدا آلیکنس

روزها ↓	گروه گلیسرین	گروه عدم درمان	گروه عصاره اتانولی بره موم	گروه نیستاتین
۳	۰/۶۵±۰/۲۶	۰/۷۵±۰/۲۴	۰/۹±۰/۲۷	۰/۸±۰/۴۱
۸	۱/۶۷±۰/۵۸	۱/۷۶±۰/۲۶	۱/۶۵±۰/۲۷ a	۱/۷۱±۰/۴۱
۹	۱/۵۹±۰/۲۵	۱/۶۵±۰/۸	۱/۱۵±۰/۲۱	۱/۴۸±۰/۶
۱۱	۱/۵±۰/۸۵	۱/۶۵±۰/۸۳	۱/۲±۰/۲۳	۱/۳۸±۰/۲
۱۵	۱/۴۳±۰/۲	۱/۵±۰/۲۷	۰	۰/۵±۰/۱
۱۹	۱/۲±۰/۲	۱/۴۸±۰/۲۷	۰ b	۰/۲۸±۰/۱

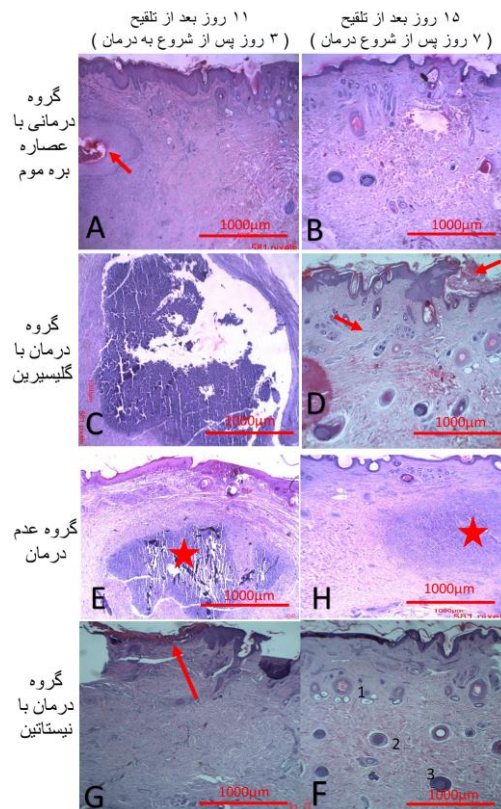
پس از شروع درمان، از روز هشتم به بعد، در گروه EEP نسبت به سایر گروهها و همچنین در طول زمان نسبت به زمان قبلی (b نسبت به a) اختلاف معنی داری وجود دارد ($P \leq 0/05$).

جدول ۲: میزان شدت آلودگی مقاطع بافتی بر اساس امتیازدهی میکروسکوپیک*

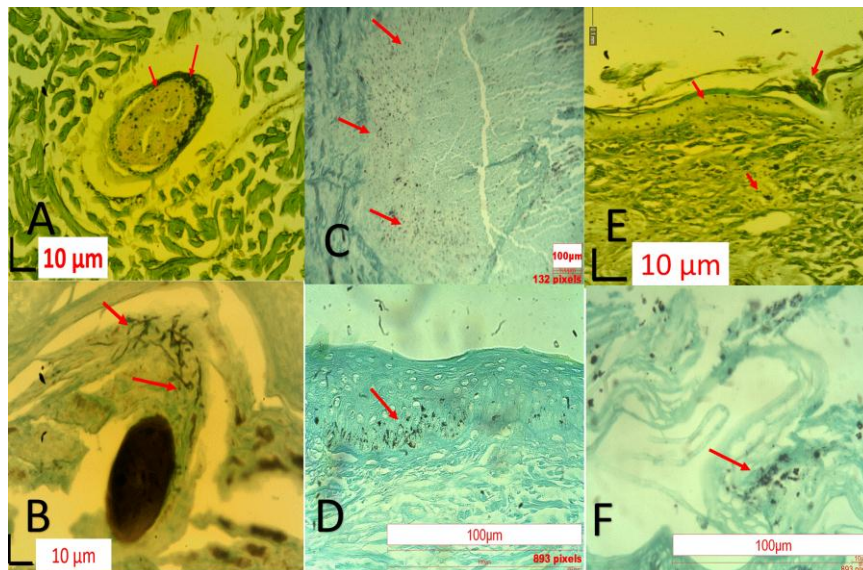
ترتیب روزها ↓	گروه عصاره اتانولی بره موم	گروه عدم درمان	گروه گلیسرین	گروه نیستاتین
۲	++	++	++	++
۸	+++++	+++++	+++++	+++++
۱۱	++	++++	+++	++
۱۵	-	++++	++	-

+++++: آلودگی بسیار شدید، ++++: شدید؛ ++: متوسط؛ +++: ملایم، +: ناچیز؛ -: آلوده، _ : پاک.

* با توجه به شکل‌های ۱ و ۲.



تصویر ۱: نمای هیستوپاتولوژیک مقاطع بافتی پوست بزها پس از شروع به درمان ها: A و B: مربوط به گروه بره موم است. B: فلش قرمز رنگ محدوده آبنه و بافت احاطه کننده چرک در مرکز آن است که پس از ۳ روز درمان با عصاره اتانولی بره موم کوچک شده است. ضخامت اپیتلیوم در B در مقایسه با A نازکتر شده و دارای تراکم فولیکولهای مو، کلاژن نامنظم متراکم و نبودن آبنه متمایز است. C و D: مقاطع هیستولوژیک گروه درمان با گلیسرین. C: آبنه بسیار بزرگ در روز سوم درمان. D: در روز هفتم، آبنه از بین نرفته و بافت فیبروز (فلش چپ) از سطح تا عمق درم جایگزین شده است و لایه خارجی فولیکولها به شدت هیپرتروفیک‌اند. هنوز هم اپیتلیوم مطلق شاخی ضخیم بوده و دارای کروسست (فلش راست). E و H: گروه عدم درمان: ستاره، مرکز آبنه را نشان می‌دهد که در مدت مطالعه بدون تغییر ماند. F و G: مقاطع هیستولوژیک گروه درمان با نیستاتین. G: روز سوم پس از درمان. ضمامت بافتی دیده نمی‌شوند و زخم اروزیون (نوک فلش). F: ضمامت بافتی وجود دارند و هیچ آبنه‌ای دیده نمی‌شود (رنگ آمیزی H&E و X۴۰).



تصویر ۲. مقاطع رنگ آمیزی شده با رنگ اختصاصی GMS: تصاویر A و B در بالای مقطع موی بیضی شکل که به رنگ قهوه‌ای رنگ گرفته اند، رشته‌های سودوهایف سیاه رنگ و متمایز، دیده می‌شوند (X100). C: غشاء پایوژن آبنه آلودگی را نشان می‌دهد (X40). نقاط بسیار ریز (نوکلئوس قرمز رنگ) از بقایای ساختار بدنه کاندیدا در بین سلولهای اپیتلیوم (بین لایه بازال و خاردار) (X400). E: عفونت بصورت منتشر (X100)؛ F: عفونت در داخل کروسست و پوسته‌ها و اجزاء و پارتيكلهای جدا شونده (X1000).

بحث

ارگانیزم در درم، باعث جذب نوتروفیل و تشکیل چرک گردید. فولیکولهای مو اندامهای ریزی هستند که در عملکردهای زیادی مانند ترمیم پوست، محل تجمع سلولهای فاگوسیتوز کننده در اطراف مویرگهای آنها و ترشح اسیدهای چرب از غدد سباسه آنها بر روی پوست و در سیستم ایمنی نقش مهمی دارند. کاندیدا آلبیکنس، فولیکولهای موی موجود در محل تزریق را از بین برد. فولیکولهای باقی مانده متسع، هیپرپلاستیک و نکروتیک بودند. فولیکولهای موی بصورت مؤثری در درمان با عصاره اتانولی بره‌موم ترمیم پیدا کرده و دوباره سازی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد، تمامی پارامترهای هیستومورفومتريک مذکور تا زمان شروع درمانها، در همه گروههای درمانی، در شرایط یکسانی بوده‌اند ($P > 0.05$).

در روز سوم پس از درمان، هرچند که آثار ضد التهابی EEP بر اساس معیارهای ماکروسکوپی (آنالیز قطر جوشها) نسبت به گروه درمان با نیستاتین خالص، بطور کاملاً معنی‌داری، بهتر بود ($P \leq 0.05$) ولی طبق مشاهدات میکروسکوپی (تصاویر ۱ و ۲)، اثرات ضدقارچی و حذف کامل آلودگی توسط EEP نسبت به نیستاتین تغییرات محسوسی نداشت ($P > 0.05$). آثار ضدقارچی EEP، در روز هفتم پس از درمان با EEP، در مقایسه با نیستاتین، به طور محسوسی ($P \leq 0.05$) مشاهده گردید (جدول ۲) به شکلی که حتی کروسست آلوده نیز روی اپیدرم مشاهده نشد. در روز هفتم پس از درمان (آخرین روز بیوپسی پوستی) از گروههای درمان شده با نیستاتین، یکی از بزها هنوز دارای آبنه در درم بود

وقتی سیستم ایمنی توسط بیماریهایی مانند دیابت، سرطان، تضعیف سیستم ایمنی در پیوند اعضا، تضعیف میشود کاندیدا می‌تواند در انسان و سایر موجودات ایجاد بیماری کند. مطالعات نشان داده که اگر کاندیدا بصورت سیستمیک انتشار یابد در تمام ارگانهای اصلی بدن مخصوصاً مغز و کلیه می‌تواند ایجاد جراحی بکند (۶). فهمیدن نقش بیماریزایی کاندیدا آلبیکنس بوسیله تحقیقاتی که بر روی حیوانات مدل انجام شده پیشرفت کرده است. اما نقش دقیق آن در عفونت‌های پوستی در بز دقیقاً مشخص نشده است. هدف از انجام این تحقیق ایجاد کردن کاندیدایز در مدل حیوانی بز و آنالیز وقایع پاتولوژیک آن، بعد از درمان با بره‌موم بود. در این تحقیق، عفونت پوستی کاندیدایز، در چهار بز تضعیف شده سیستم ایمنی انجام شد. بارزترین و مهمترین یافته هیستولوژیک و پارامتر هیستومورفومتريک، «آبنه»، «فولیکولیت» و «مشاهده اجرام قارچی در بافت» بود. سه معیار اصلی هیستومورفومتريک مذکور این امکان را فراهم ساخت که مقایسه نیمه کمی گروههای مختلف انجام شده و نقش ضدقارچی بره‌موم، بصورت هیستولوژیک بررسی شود.

طی ۴۸ ساعت بعد از تلقیح، اوج یک التهاب حاد بصورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی مشاهده گردید. افزایش سریع در جمعیت نوتروفیلی منجر به تشکیل آبنه شد که با نکروز فولیکولی و از بین رفتن بافت اپیتلیال همراه بود. در مراحل اولیه عفونت کاندیدا آلبیکنس در بافت اپیتلیال افزایش یافت که با گسترش به درم، باعث نکروز در اپی درم و التهاب در درم شد. وجود این

دارو بستگی دارد. اما بره موم مناطق جغرافیایی مختلف با وجود آنکه ممکن است ترکیبات شیمیایی متفاوت داشته باشد، خاصیت ضد میکروبی مشابهی دارند (۲۴ و ۲۸).

Ownagh و همکاران با استفاده از کروماتوگرافی گازی GC-MS که بر روی نمونه بره موم انجام دادند، ۱۶ نوع ماده فلاونوئیدی شناسایی و گزارش کردند (۱۱). ۸٪ از کل مواد موجود در این عصاره اتانولی بره موم ۵-هیدروکسی-۷-متوکسی فلاون (MCL-1) یا پینوستروبین است. گزارش شده است که MCL-1 توانسته است تولید آنیون سوپراکسید القا شده توسط ان-فرمیل-ال-متیونیل-ال-لوسیل-ال-فنیل آلانین را در نوتروفیل‌های انسان مهار کند. انفجار تنفسی نقش کلیدی در نوتروفیل‌ها برای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها دارد (۷). اما می‌تواند باعث آماس و تخریب بافتی نیز شود. فعالیت MCL-1 موجود در عصاره می‌تواند عوارض فعالیت نوتروفیل‌ها در جوشهای کاندیدیازین جلدی را کاهش داده و ترمیم زودرسی را ایجاد کند. موارد ذکر شده مورد انتظار از مواد و محتویات EEP مورد استفاده، با مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مطابقت کامل داشتند.

نتیجه‌گیری

نتایج مشاهدات میکروسکوپی در این مطالعه نشان داد که جراحات ایجاد شده بوسیله کاندیدا آلبیکنس که با عصاره اتانولی بره موم درمان شدند، دارای اثرات ترمیمی و ضدالتهابی روی کاندیدیازین پوستی در بز است. از بین رفتن آبه‌ها و علائم عفونت قارچی با بکاربردن EEP ارتباط مستقیم داشته و نسبت به سایر گروه‌های درمانی از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($P \leq 0.05$) و در مدت زمان یک هفته با دوز ۲۰٪ مصرف دو بار در روز، باعث التیام کامل زخم و حذف عفونت پوستی شد که نسبت به درمان با نیستاتین، درمان سریعتر و کاملاً قطعی‌تر می‌باشد.

قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر، تشکر و قدردانی خود را از حمایت مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه اعلام می‌دارند. این مقاله خلاصه‌ای از پروپوزال پایان‌نامه‌ای است که ضمن تصویب در جلسه دفاعیه، در سایت irandoc.ir به شماره ۱۲۴۱۶۴۹ ثبت شده است. پایان‌نامه با شماره ۱۰۵-۲۰۱۵ با موفقیت دفاع شد و با شماره ۲۴۰۴۱۲۷ در سایت irandoc.ir به ثبت رسید.

References

- Center for Disease Control and Prevention (CDCP), U.S. Department of Health & Human Services, Candidiasis, 2016. Available from: <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/> (Accessed Jan 2017).
- Maxie G, Ontario G. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th ed. University of Guelph, Elsevier Inc. Saunders Ltd. 2016; 3: 647. doi: 10.1016/B978-0-7020-5319-1.00021-9

اما گروه‌های عصاره اتانولی بره موم، هیچیک از علائم هیستومورفومتریک التهابی و مرتبط با آلودگی را نداشتند ($P \geq 0.05$). در روز ۱۱ پس از درمان با EEP، در مقایسه با سایر گروه‌های درمانی، پوست کاملاً سالم و طبیعی بود و برخلاف سایر گروه‌های درمانی هیچ برجستگی موضعی در محل تلقیح کاندیدا در پوست بز، زیر انگشت قابل لمس نبود.

Ownagh و همکاران (۱۱)، Agüero و همکاران (۱۸) در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بدن، و Ahangari و همکاران به ترتیب در کراتیت چشمی (۱۲) و کاندیدیازین واژنی تجربی در خرگوش (۱۹) اثرات ضد قارچی بره موم را بررسی کردند و نتایج پژوهش آنها نشان داد که دوز مصرفی ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر عصاره اتانولی بره موم کارایی مناسبی دارد و با مقدار تأثیر ضدقارچی و بویژه ضد کاندیدیایی در این مطالعه مطابقت دارد. مطالعات قبلی که توسط Kilic و همکاران (۲۰)، Tukmechi و همکاران (۱۳) انجام گرفت نقش ضد باکتریایی عصاره اتانولی بره موم را در مقابل باکتری‌های پاتوژن مانند *hyrophilia, Y. ruckeri*, *A. S. iniae* نشان دادند. Bosio و همکاران (۱۴) Mohammadzadeh و همکاران (۲۱) بیان کردند که نقش ضد باکتریایی بره موم، با ترکیبات فلاونوئیدی آن در ارتباط است. سایر مطالعات این ارتباط را مورد تأیید قرار داده‌اند (۱۸ و ۲۲ و ۲۳ و ۲۴). Yousefbeigi و همکاران نشان دادند که بره موم تهیه شده از مناطق مختلف شمال غرب کشور دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی در شرایط خارج از بدن است. در مطالعه ایشان فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره اتانولی بره موم بر ضد استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس بررسی شد. این پژوهشگر غلظت ۴ تا ۱۰ درصد آن را بر ضد این دو ارگانیزم مؤثر تشخیص داد (۲۵). Basma و همکاران اثرات ضدباکتریایی بره موم را بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به آکنه در روی صورت مورد بررسی قرار دادند و اثرات مؤثر ضد باکتریایی بره موم را بصورت کلینیکی و کشت میکروبی نشان دادند (۲۶). Behrens بصورت تجربی در ۲۱ خرگوش، با استفاده از کاندیدا آلبیکنس کراتیت تجربی ایجاد کرد و آنرا با فلوکونازول درمان کرد. این محقق اعتقاد داشت که اغلب داروهای ضدقارچی، در آلودگی‌های سطحی مؤثرند و تأثیر زیادی بر آلودگی‌های عمقی ندارند (۲۷).

ترکیبات شیمیایی عصاره بره موم بعلا تفاوت‌های طبیعی، هنوز مورد بررسی قرار دارد. اثرات ترکیبات بره موم به عواملی همچون منطقه جغرافیایی، منشاء گیاهی و تکنیک تهیه و فناوری

3. Mc Gavine DM, Zackary JF. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. University of Illinois, Elsevier Mosby Inc. 2012; PP: 234, 335-336.
4. Pritt B, Gibson LE, Comfere NI. Diagnosis of deep cutaneous fungal infections: correlation between skin tissue culture and histopathology. *J Am Acad Dermatol* 2014; **71**(2): 293-301. doi: 10.1016/j.jaad.2014.03.042
5. Verduyn Lunel F M, Meis JFGM, Voss A. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagnostic Microbiol & Infec Dis* 1999; **34**(3): 213-220. doi: 10.1016/S0732-8893(99)00035-8
6. Khosravi A R, Mardjanmehr H, Shokri H, Naghshineh R, Rostambashman M, Naseri A. Mycological and histopathological findings of experimental disseminated candidiasis in dogs. *Iran J Vet Res, Shiraz Univer* 2009; **10**(3): 228-234.
7. Diamond R D, Clark R A, Haudenschild C C. Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro. *J Clin Invest* 1980; **66**(5): 908-917. doi: 10.1172/JCI109958.
8. Csató M, Bozóky B, Hunyadi J, Dobozy A. *Candida albicans* phagocytosis by separated human epidermal cells. *Arch Dermatol Res* 1986; **279**(2): 136-139. doi: 10.1007/bf00417535
9. Hahn B L, Sohnle P G. Characteristics of Dermal Invasion in Experimental Cutaneous Candidiasis Leucopenic Mice. *J Invest Dermatol* 1988; **91**(3): 233-237. doi: 10.1111/1523-1747.ep12470359
10. Sohnle P G, Kirkpatrick C H. Deposition of Complement in the Lesions of Experimental Cutaneous Candidiasis in Guinea Pigs. *J Cutan Pathol* 1976; **3**(5): 232-238. doi: 10.1111/j.1600-0560.1976.tb00868.x
11. Ownagh A, Tukmechi A, Adibhesami M, Ebrahimzade S, Comparative study on the effect of Ethanolic extract of Propolis collected from west Azerbaijan apiaries against dermatophytes and nondermatophytes fungi. *Urmia Med J* 2010; **21**(3): 206-14. (Persian)
12. Ahangari AA, Ownagh A, Tehrani AA, Tukmechi A. The effects of Ethanolic Extract of Propolis (EEP) on the experimentally induced *Candida* keratitis in rabbits. *Tehran Univer Med J* 2011; **69**(1): 22-28. (Persian)
13. Tukmechi A, Ownagh A, Mohebbat A. In vitro antibacterial activities of ethanol extract of Iranian Propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* & *Streptococcus iniae*). *Braz J Microbiol* 2010; **41**(4): 1086-1092. (Persian)
14. Bosio K, Avanzini C, Avolio AD, Ozino O, Savoia D. In vitro activity of Propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol* 2000, **31**(2): 174-177. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00785.x
15. Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Luciano Saso. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by 'ferric reducing antioxidant power' assay and cyclic voltammetry. *Biochimicaet Biophysica Acta* 2005; **1721**: 174-184. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.11.001
16. Niwat C, George T, Gordon M, Lovegrove J. The consumption of fruit juice rich in flavonoids increases plasma antioxidant status. *Precede Nut Society* 2008; **67**: 419. doi: 10.1017/S0029665108000931
17. Rumsey Deborah J. *Intermediate Statistics for Dummies*. Indianapolis, Indiana, Canada, Wiley Publishing Inc, 2007; PP: 295-306.
18. Agüero M, Svetaz L, Luna ML, Lima B, Lopez ML, Zacchino S, et al. Argentinean Andean Propolis associated with the medicinal plant *Larrea tridactyla* Cav. (Zygophyllaceae) HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food Chem Toxicol J* 2011; **49**(5): 1970-1978. doi: 10.1016/j.fct.2011.05.008
19. Ownagh, A, Adibhesami M. Treatment of Vaginal Candidiasis by Ethanolic Extract of Propolis in Rabbit. *Armagha danesh* 2012; **17**(3): 233-242.
20. Kilic A, Baysallar M, Besirbellioglu B, Salih B, Sarkun K, Tanyuksel M. In vitro antimicrobial activity of Propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Ann Microbiol* 2005; **55**(2): 113-117.
21. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian Propolis. *J Food Chem* 2007; **103**: 1097-1103. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.10.006
22. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinos I, Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of Propolis extracts from Greece and Cyprus. *J Food Chem* 2009; **116**: 452-461. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.060
23. Yang H Y, Ho WL, Chang CM, Chou CC. Antibacterial Activity of Propolis Ethanol Extract against *Streptococcus mutans* as Influenced by Concentration, Temperature, pH and Cell Age. *JFDA* 2007; **15**(1): 75-81.
24. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of Propolis. *Phytothe Res* 2001; **15**: 561-571. doi: 10.1002/ptr.1029
25. Yousefbeigi G, Ownagh A, Hasanloei M. Antibacterial and antifungal of activity of Iranian propolis against *staphylococcus aureus* and *candida albicans*. *Pak J Biol Sci* 2007; **10**(8): 1343-1345. doi: 10.3923/pjbs.2007.1343.1345
26. Basma M Mohammad Ali, Naglaa F Ghoname, Abeer A Hodeib, Marwa A Elbadawy. Significance of topical

- propolis in the treatment of facial acne vulgaris. *Egypt J Dermatol Venereol* 2015; **35**(1): 29-36. doi: 10.4103/1110-6530.162468
27. Behrens-Beuman W. *Mycoses of the eye and its adnexa*. Magdeburg, Developments in Ophthalmology, Basel; S Karger. 1989; **32**: 80.
28. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of Propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; **64**(3): 235-40. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00131-7