مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۴، ۳۸۴-۳۷۹

Journal of Veterinary Research. 69,4:379-384, 2014

Original Article

ارزیابی اثر عسل بر روی قدرت کشندگی و تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c علیه آسپرجیلوس فومیگاتوس

دنیا نیک آیین[۱،۲] احمد عرفان‌منش[۳] حسن قربانی چوبقلو[۲] حجت اله شکری[۴] زهرا طوطیان[۵] هادی باقری[۶] علیرضا خسروی[۲*]

۱) گروه میکرو بیولوژی کاربردی، جهاددانشگاهی واحد تهران، تهران - ایران

۲) مرکز تحقیقات قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

۳) گروه فرآورده‌های بیولوژیک دامی، جهاددانشگاهی واحد تهران، تهران - ایران

۴) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فن آوری‌های نوین آمل، آمل - ایران

۵) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

۶) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۴ مهر ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۴ آبان ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: عسل یک ترکیب قندی فوق اشباع دارای خاصیت ضد التهابی وآنتی اکسیدانی می‌باشد. ازآنجایی که در سال‌های اخیر بیماریهای قارچی و نیز مقاومت دارویی افزایش داشته است استفاده از ترکیبات طبیعی با خاصیت تحریک‌سیستم ایمنی می‌تواند مفید واقع شود. **هدف:** هدف ازاین مطالعه ارزیابی اثرسه نوع عسل ایرانی برقدرت کشندگی وتولیدنیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی درموش BALB/c بود. **روش کار:** دراین مطالعه‌سه نوع عسل از مناطق مختلف ایران تهیه گردید و دریک دوره ۱۰ روزه به موش خورانده‌شد. بعدازآن موش‌ها یوتانایز گردیده وماکروفاژهای صفاقی آنهاکشت داده‌شد. روی این سلول‌هاآزمایش قدرت کشندگی وسنجش تولیدنیتریک اکسایدانجام گردید. **نتایج:** این مطالعه نشان دادکه عسل قدرت کشندگی ماکروفاژها را افزایش می‌دهد واین افزایش درمقایسه باگروه کنترل معنی‌داربود ($p<۰/۰۵$). درمورد تولید نیتریک اکساید، نسبت به گروه کنترل درگروه تیمارشده با عسل مناطق شمالی ومرکزی کاهش ودرگروه تیمارشده با عسل جنوبی ومخلوط افزایش مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$). درهیچ یک‌ازگروه‌ها تحریک ماکروفاژها بالیپوپلی‌ساکارید (LPS) افزایش معنی‌داری را در تولیدنیتریک اکساید نشان نداد ($p<۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی:** عسل دارای خاصیت ضد التهابی بوده وعلاوه براین، می‌تواند با افزایش قدرت کشندگی ماکروفاژها، توانایی آنها را در حذف کنیدی آسپرجیلوس فومیگاتوس افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: آسپرجیلوس فومیگاتوس، عسل، ماکروفاژ، قدرت کشندگی ماکروفاژ، نیتریک اکساید

مقدمه

عسل یک محلول قندی فوق اشباع حاوی فروکتوز و گلوکز است. به دلیل آب فعال پایین عسل (۰/۶aw) اکثر میکروارگانیسم‌ها در عسل رشد نمی‌کنند. عسل دارای مقادیر جزیی از ویتامین‌ها و مواد معدنی و نیز ترکیبات آنتی اکسیدان شامل کریسین، پینوبنکسین، ویتامین C، کاتالاز و پینوکمبرین می‌باشد (۲). چگالی عسل ۱/۳۶kg/L می‌باشد (۲۰). عسل دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، سیتوستاتیک و ضدالتهابی است (۱۷). از ۲۷۰۰ سال پیش تا کنون، عسل توسط انسان‌ها برای درمان بسیاری بیماریهای مزمن موضعی استفاده می‌شده است، ولی تنها در چند سال اخیر خواص ضدعفونی کنندگی و ضدباکتریایی عسل از نظر شیمیایی توضیح داده شده است (۲۰). عسل به دلیل داشتن آب فعال پایین، اسیدیته بالا و داشتن موادی چون هیدروژن پراکسید و متیل گلیوکسال دارای خاصیت ضدباکتریایی مناسبی می‌باشد (۱۷،۲۱). هنگامی‌که قارچ وارد بدن می‌شود، در زمان عفونت، سیگنال‌های شیمیایی فاگوسیت‌ها را به محل تهاجم می‌خوانند. فاگوسیت‌ها سد دفاعی مهمی در برابر عفونت‌ها هستند. فاگوسیت‌ها بعد از بلع عامل بیماریزا، آنرا با اکسیدانت‌ها و نیتریک اکساید (NO) از بین می‌برند (۹). نیتریک اکساید به عنوان محصول واکنش ماکروفاژهای التهابی تحقیقات زیادی را به خود جلب کرده است. نیتریک اکساید از اسیدآمینه ال آرژنین توسط آنزیم iNOS سنتز می‌شود. نیتریک اکساید با سوپراکساید واکنش داده و پراکسی نیتریت تولید می‌کند که در سبب شناسی بیماریهای قلبی عروقی و سرطان با افزایش استرس تنفسی و روند التهاب نقش دارد (۱،۳،۶).

توانایی عامل بیماریزا در باقی ماندن و حتی تکثیر درون سلول‌های فاگوسیتی روش بالقوه برای تهاجم به مکانیزم‌های دفاعی میزبان است (۹). بنابراین استفاده از ترکیباتی که بتوانند قدرت کشندگی ماکروفاژها را افزایش دهند می‌تواند توانایی سیستم ایمنی میزبان را در دفع عامل بیماریزا افزایش دهد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر سه نوع عسل ایرانی برقدرت کشندگی و تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی در موش BALB/c بود.

مواد و روش کار

تهیه عسل: با توجه به شرایط آب و هوایی ایران سه نوع عسل از

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۹۹-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ *Email: khosravi@ut.ac.ir*

مناطق مختلف (شمال، غرب و جنوب کشور) تهیه شد. عسل‌های مورد مطالعه به روش chromatography-mass spectrometry (GC-MS) gas آنالیز شدند. عسل‌ها تا زمان استفاده در تاریکی و دمای ۴°C نگهداری شدند. محلول مورد تجویز با رساندن حجم ۴۰g عسل به ۱۰۰mL با کمک آب مقطر تهیه گردید (۱/۵ g/kgBW) و از این محلول ۰/۱cc به هر موش خورانده شد.

تهیه مدل حیوانی: ۵۰ سر موش نر نژاد BALB/c سن ۸-۶ هفته از موسسه واکسن و سرم سازی رازی یک هفته پیش از شروع آزمایش جهت سازگاری با شرایط محیطی، خریداری شده و تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و تغذیه آزاد نگهداری شدند.

براساس میانگین وزنی حیوانات، میزان ۱/۵g به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش در ۰/۱mL آب مقطر استریل از محلول تهیه شده و با استفاده از سرنگ مناسب به معده ی حیوان گاواژ شد (تصویر ۱-۳).

گروه بندی حیوانات: در هر گروه ۱۰ سر موش قرار داده شد.

گروه اول (G1): به این گروه به مدت ۱۰ روز، ۰/۱mL از محلول عسل A خورانده شد.

گروه دوم (G2): به این گروه به مدت ۱۰ روز، ۰/۱mL از محلول عسل B خورانده شد.

گروه سوم (G3): به این گروه به مدت ۱۰ روز، ۰/۱mL از محلول عسل C خورانده شد.

گروه چهارم (G4): به این گروه به مدت ۱۰ روز، ۰/۱mL از محلول مخلوط هر سه عسل خورانده شد.

گروه کنترل (-G): به مدت ۱۰ روز، ۰/۱mL آب مقطر استریل به هر موش خورانده شد.

جمع آوری ماکروفاژهای صفاقی: موش‌ها با استفاده از پنبهٔ آغشته به دی اتیل اتر بیهوش شده، سپس تحت شرایط استریل با باز کردن پوست سینه بدون این که به پرده صفاقی آسیبی وارد شود با لاواژ محیط DMEM سرد از صفاق، سلول‌های صفاقی جمع آوری شدند. سوسپانسیون سلولی یک بار با PBS و یک بار با محیط DMEM به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰g شستشو داده شد و در نهایت سلول‌ها در ۱mL محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS غوطه ور شدند. سلول‌ها با لام هموسیایتومتر شمارش شده و تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷^{o} حاوی ۵٪ CO2 و ۹۵٪ رطوبت منتقل شده و پس از دو ساعت برای حذف لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های نچسبیده چاهک‌ها با PBS استریل شست شو داده شدند. با استفاده از لام نئوبار و شمارش و محاسبه سلول‌های نچسبیده در شش چاهک معلوم شد که حدود ۵۰٪ سلول‌های ریخته شده در هر چاهک، ماکروفاژ بوده و همچنین با استفاده از رنگ آمیزی گیمسا مشخص شد ۹۵٪ سلول‌های چسبیده در هر چاهک ماکروفاژ هستند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷^{o} و ۵٪ CO2 نگهداری شدند.

اندازه گیری میزان قدرت کشندگی: اندازه گیری قدرت کشندگی ماکروفاژها مطابق روش Brummer و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۴) با کمی تغییرات انجام شد. بدین منظور، پس از کشت ماکروفاژها به مدت ۱۸ ساعت و برداشت سوپ رویی کشت سلول‌ها، به هر چاهک ۲۰۰µL محیط DMEM حاوی $۱/۵\times۱۰^{۵}$ کنیدی آسپرجیلوس فومیگاتوس *(1:1 Target to Effector:)* اضافه گردید. دو گوده به عنوان کنترل فاقد ماکروفاژ در نظر گرفته شد که به آنها تنها محیط حاوی کنیدی افزوده شد. آنگاه پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷^{o}C و ۵٪ CO2 گرم خانه‌گذاری شدند. بعد از طی این مدت، مایع رویی برداشت شده و پلیت‌ها با PBS استریل دو بار شستشو داده شد. سپس با استفاده از آب مقطر استریل سرد سلول‌ها لیز شدند. به طوری که هر چاهک سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. از میکروسکوپ معکوس برای اطمینان از شستشو و لیز سلول‌ها استفاده گردید.

به منظور تعیین میزان قدرت کشندگی ماکروفاژها، از میکروتیوب‌ها رقت سریال ۱۰ تایی تهیه شد. ۰/۱mL از هر گوده با استفاده از سمپلر به محیط کشت سابوروگلوکز آگار برده شده و درون گرم خانه در دمای ۳۰^{o} به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس CFU هر پلیت تعیین گردیده و براساس فرمول زیر درصد کشتار به دست آمد.

Fungicidal activity: [1-CFU experimental culture/CFU untreated] ×100

اندازه گیری تولید نیتریک اکساید: اصول کار براساس روش گریس انجام پذیرفت (۱۹). برای انجام کار، مایع رویی کشت‌ها که قبلاً جمع آوری شده بود، در حجم ۵۰µL به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه الایزا اضافه شد. سپس ۵۰µL سولفانیل آمید ۱٪ در اسید فسفریک ۵٪ و ۵۰µL، NEDA ۱٪ در اسیدفسفریک ۵٪ به هر چاهک اضافه شد. سپس تغییر رنگ حاصل شده با دستگاه جذب سنج در طول موج ۵۴۰nm خوانده شد.

آنالیز آماری: جهت اطمینان از نتایج، آزمایش‌ها سه بار تکرار و نتایج بر اساس Mean±SEM محاسبه گردید. سپس با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون One way ANOVA نتایج مورد بررسی قرار گرفت. معنی‌دار بودن جواب‌ها در حیطه $p<۰/۰۵$ به دست آمد.

نتایج

اثر عسل بر قدرت کشندگی ماکروفاژهای صفاقی: نتایج نشان دادند که در تمامی گروه‌های عسل خورده نسبت به گروه کنترل قدرت کشندگی بالاتر است (جدول ۱). اختلاف آماری معنی‌داری بین تمامی گروه‌های عسل خورده به جز گروه G2 با گروه کنترل وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$). در بین گروه‌های عسل خورده، میان عسل نوع B با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$). اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تحریک شده با LPS و گروه‌های فاقد LPS مشاهده نشد.

اثر عسل بر تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی: تأثیر

جدول ۱. نتایج قدرت کشندگی ماکروفاژهای صفاقی بر روی کنیدی آسپرجیلوس فومیگاتوس (میانگین±خطای معیار).

گروه / قدرت‌کشندگی	نرمال (Mean± SEM %)	LPS (Mean± SEM %)
عسل A	۷۷/۲۵±۰/۶۵	۷۸/۲۴±۰/۵۴
عسل B	۶۸/۳±۱/۱۴	۷۰±۱/۹
عسل C	۷۵/۳±۱/۱۶	۷۵/۶±۲/۰۷
عسل مخلوط	۷۶/۹±۰/۹	۷۷/۳۹±۰/۵
کنترل	۶۵/۳۹±۰/۸۷	۶۶/۱±۰/۶

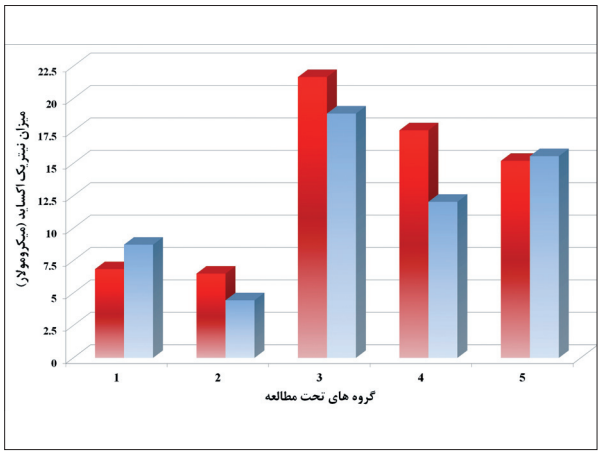
عسل بر تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای صفاقی موش‌های تحت درمان با عسل در نمودار ۱ نشان داده شده است. در عسل مناطق جنوبی و مخلوط میانگین تولید نیتریک اکساید نسبت به گروه کنترل بالاتر بود هرچند این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p>0/05$). عسل مناطق شمالی و مرکزی نسبت به گروه کنترل تولید نیتریک اکساید را کاهش داده بودند اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. در بین گروه‌های تیمار گروه دریافت کننده‌ی عسل C نسبت به عسل A و B به طور معنی‌داری تولید نیتریک اکساید بالاتری داشت ($p<0/005$). تحریک ماکروفاژها با LPS در هیچ یک از گروه‌ها بر میزان تولید نیتریک اکساید اثری نداشت.

بحث

در دهه‌های اخیر، وقوع بیماریهای مزمن و قارچی افزایش چشمگیری داشته است. بروز آسپرجیلوزیس تهاجمی در میزبانان مبتلا به نقص ایمنی در حال افزایش است و مرگ و میر بالایی دارد. لکوپنی، درمان با کورتیکواستروئیدها، شیمی درمانی سیتوتوکسیک و مصرف بی رویه ی آنتی بیوتیک‌های پردامنه از عوامل خطر مهم آسپرجیلوزیس تهاجمی هستند (۱۵). امروزه به دلیل افزایش مقاومت به داروهای ضد قارچی، استفاده از ترکیبات طبیعی دوباره اهمیت پیدا کرده است. عسل ترکیبی از ۴۰۰ ماده شیمیایی شامل پروتئین، آنزیم، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها، اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها و برخی ترکیبات فرار می‌باشد. عسل دارای خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و تحریک کنندگی سیستم ایمنی است (۱۰،۱۱،۱۸).

Theunissen و همکاران در سال ۲۰۰۱، اثر ضد قارچی سه نمونه عسل آفریقایی علیه کاندیدا آلبیکانس مطالعه کردند. رقت‌های مختلفی از عسل از صفر تا ۲۵٪ در محیط BHI براث تهیه گردید. غلظت‌های بالای عسل موجب کاهش رشد کاندیدا آلبیکانس گردیدند، در حالی که رشد در غلظت های ۲/۵٪ و ۵٪ اپتیمال بود. میزان ممانعت از رشد در بین عسل‌های مختلف متفاوت بود و بیشترین میزان کاهندگی در غلظت ۲۵٪ عسل، ۲۹/۴٪ بود (۱۶).

Khosravi و همکاران در سال ۲۰۰۸، استعداد قارچ کشی عسل های ایرانی (غلظت‌های ۲۰ تا ۶۰٪) را علیه شش گونه بیماریزای کاندیدا مطالعه



نمودار ۱. سنجش میزان نیتریک اکساید در گروه‌های تحت مطالعه با یا بدون تیمار با LPS. (۱: G1/ موش‌های دریافت کننده عسل A، ۲: G2/موش‌های دریافت کننده عسل B، ۳: G3/موش‌های دریافت کننده عسل C، ۴: G3/موش‌های دریافت کننده عسل مخلوط، ۵: گروه کنترل).

کردند. در مطالعه آنها، غلظت‌های بالاتر از ۲۴٪ خاصیت ضدقارچی علیه گونه‌های مورد مطالعه داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که عسل قادر به تحریک ماکروفاژهای صفاقی برای کشتن کنیدی آسپرجیلوس فومیگاتوس می‌باشد(۸). Chepulis در سال ۲۰۰۷، میزان فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها را بعد از تغذیه طولانی مدت با عسل در رت بررسی کرد. او نشان داد که فاگوسیتوز در رت‌های تغذیه شده با عسل به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل است (۵). ماکروفاژها اولین سد دفاعی در برابر آسپرجیلوس می‌باشند. قدرت کشندگی ماکروفاژها نقش مهمی در ایمنی ذاتی علیه آسپرجیلوزیس مهاجم دارد. ماکروفاژهای آلوئولی و صفاقی کنیدی آسپرجیلوس را فاگوسیت کرده و عمل کشتار ۶-۲ ساعت بعد اتفاق می‌افتد. بیمارانی که دارای نقص در قدرت کشندگی ماکروفاژها می‌باشند، مانند بیماری گرانولوماتوز مزمن، بیماران پیوندی و یا تحت درمان با کورتیکواستروئیدها در خطر ابتلا به آسپرجیلوزیس مهاجم هستند (۹،۱۳،۱۴). نتایج ما نیز توانایی عسل را در بهبود قدرت کشندگی ماکروفاژها تأیید کردند.

سنجش میزان نیتریک اکساید در گروه‌های تیمار نشان می‌دهد که عسل A و B تولید نیتریک اکساید را کاهش می‌دهند، در حالی که عسل C و مخلوط تولید نیتریک اکساید را در ماکروفاژهای صفاقی افزایش دادند. نیتریک اکساید توسط آنزیم iNOS در سلول‌های پستانداران و دیگر بافت‌ها تولید می‌شود. نیتریک اکساید با سوپراکسید واکنش داده و پراکسی نیتریت تولید می‌کند. آنتی اکسیدان‌هایی مانند ترکیبات ارگانوسولفور، سلنیوم و کارنوسل تولید NO را در ماکروفاژها کاهش می‌دهند. کاهش تولید NO می‌تواند به دلیل خاصیت ضدالتهابی عسل باشد. در مطالعه‌ای بر روی مدل التهابی در رت، کاهش تولید NO و در نتیجه کاهش التهاب بعد از مصرف خوراکی عسل مشاهده گردید (۱۲).

Kassim و همکاران در سال ۲۰۱۰، نشان دادند که عسل غلظت NO و پروستاگلاندین E2 را در اکسودای بافت التهابی کاهش می‌دهد (۷). این اثر می‌تواند به دلیل حضور ترکیبات پلی فنولیک عسل با خاصیت آنتی اکسیدانی باشد (۱۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت عسل مناطق شمالی و مرکزی دارای فلاونوئیدهایی با خاصیت آنتی اکسیدانی هستند.

با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گیری کرد که عسل دارای خاصیت ضد التهابی بوده و علاوه بر این، می‌تواند با افزایش قدرت کشندگی ماکروفاژها، توانایی آنها را در حذف کنیدی آسپرجیلوس فومیگاتوس افزایش دهد. لیکن مطالعات بیشتری بر روی مدل‌های حیوانی برای بررسی اثرات تحریک کنندگی ایمنی عسل در مواجه با آسپرجیلوزیس مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده و مولفین مراتب قدرانی و تشکر خود را از این معاونت اعلام می‌دارند.

References

1. Albrecht, E.W., Stegeman, C.A., Tiebosch, A.T., Tegzess, A.M., Van Goor, H. (2002) Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. Am J Transplant. 2: 448-53.
2. Beretta, G., Granata P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Anal Chim Acta. 533: 185-191.
3. Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms: oxidation, inflammation, and genetics. Circulation. 91: 2488-96.
4. Brummer, E., Maqbool, A., Stevens D.A. (2001) In vivo GM-CSF prevents dexamethasone suppression of killing of *Aspergillus fumgatus* conidia by bronchoalveolar macrophages. J Leukoc Biol. 70: 865-72.
5. Chepulis, L.M. (2007) The effects of honey compared with sucrose and a sugar-free diet on neutrophil phagocytosis and lymphocyte numbers after long-term feeding in rats. J Complement Integr Med. 4: 8.
6. Gobert, A.P., Mersey, B.D., Cheng, Y., Blumberg, D.R., Newton, J.C., Wilson, K.T. (2002) Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. J Immunol. 168: 6002 -6.
7. Kassim, M., Achoui, M., Mansor, M., Yusoff, K.M. (2010) The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in nflammatory tissues. Fitoterapia. 81: 1196-1201.
8. Khosravi, A.R., Shokri, H., Katiraee, F., Ziglari, T., Forsi, M. (2008) Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. J Apicult Res. 47: 256-260.
9. Liebmann, B., Gattung, S., Jahn, B., Brakhage, A. (2003) cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene pksP and in defense against killing by macrophages. Mol Genet Genomics. 269: 420-435.
10. Majtán, J., Kovácová,E., Bíliková, K., Šimúth, J. (2006) The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNFα release. Int Immunopharmacol. 6: 269-278.
11. Molan, P.C. (2001) Potential of honey in the treatment of wounds and burns. Am J Clin Dermatol. 2: 13-19.
12. Owoyele, B.V., Adenekan, O.T., Soladoye, A.O. (2011) Effects of honey on inflammation and nitric oxide production in Wistar rats. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 9: 447-52.
13. Park, S.J., Mehrad, B. (2009) Innate immunity to *Aspergillus* species. Clin Microbiol Rev. 22: 535-551.
14. Perkhofer, S., Speth, C., Dierich, M.P., Lass-Flörl, C. (2007) In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing of *Aspergillus* species by mononuclear phagocytes. Mycopathologia. 163: 303-307.
15. Rickerts, V., Just-Nübling, G., Konrad, F., Kern, J., Lambrecht, E., Böhme, A., Jacobi, V., Bialek, R.

(2006) Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 25: 8-13.

16. Theunissen, F., Grobler, S., Gedalia, I. (2001) The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. Apidologie. 32: 371-379.
17. Tonelli, D., Gattavecchia, E., Ghini, S., Porrini, C., Celli, G., Mercuri, A.M. (1990) Honey bees and their products as indicators of environmental radioactive pollution. J Radioanal Nucl Chem. 141: 427-436.
18. Tonks, A.J., Dudley, E., Porter, N., Parton, J., Brazier, J., Smith, E., Tonks, A. (2007) A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. J Leukoc Biol. 82: 1147-1155.
19. Tsikas, D. (2007) Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. J chromatogr. B, Anal Technol Biomed Life Sci. 851: 51.
20. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. (2008) Functional properties of honey, propolis and royal jelly. J Food Sci. 73: R117- R124.
21. Wahdan, H. (1998) Causes of the antimicrobial activity of honey. Infection. 26: 26-31.

Effect of honey on killing power and nitric oxide production in peritoneal macrophage against *Aspergillus fumigatus* in BALB/c mice

Nikaein, D.[1,2], Erfanmanesh, A.[3], Ghorbani Choboghlo, H.[2], Shokri, H.[4], Tootian, Z.[5], Bagheri, H.[6], Khosravi, A.R.[2*]

[1]*Applied Microbiology Research Group, Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Tehran Branch, Tehran-Iran*

[2]*Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Veterinary Biological Products Research Group, Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Tehran Branch, Tehran-Iran*

[4]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Modern Technologies, Amol-Iran*

[5]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[6]*Aquatic Animals Health & Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 6 October 2014, Accepted 15 November 2014)

Abstract:

BACKGROUND: In recent years, immunocompromised patients are at high risk for the development of invasive aspergillosis. Due to the increase of antimicrobial resistance, natural agents with medicinal and immunomodulatory effects has gained more attention. Honey is a natural substance with documented antimicrobial, anti-inflamatory and wound healing effects. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to evaluate the effect of three Iranian kinds of honey on Killing Power and Nitric Oxide Production in Peritoneal Macrophage in BALB/c mice. **METHODS:** Male BALB/c mice were gavaged with three different kinds of honey for a 10-day period. Then the mice were euthanized and their peritoneal macrophages were cultured. Macrophage killing and nitric oxide production was evaluated. **RESULTS:** Our results showed that honey could significantly increase the killing power of macrophage which was significantly higher than in control group ($p<0.05$). Nitric oxide production in groups treated by northern and central honey was lower than the control group, whereas in groups treated by southern and mixed honey nitric oxide production was significantly higher than control group ($p<0.05$). LPS stimuli had no significant effect on neither macrophage killing nor nitric oxide production ($p>0.05$). **CONCLUSIONS:** In conclusion, honey could act as an immunomodulator during *Aspergillus fumigatus* infections.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, honey, macrophage, macrophage killing, nitric oxide

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Results of peritoneal macrophages killing against *Aspergillus fumigatus* conidia (mean±SEM).

Figure 1. Nitric oxide assay in understudy groups with and without LPS treatment. (1:G1/mice receiving honey A, 2:G2/mice receiving honey B, 3:G3/mice receiving honey C, 4:G4/mice receiving mixed honey, 5: Control).

***Corresponding author's email: khosravi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117099, Fax: 021-66933222**