



PROPOLİS VE KURKUMİN EKSTRAKTLARININ TRİCHOPHYTON TÜRLERİ ÜZERİNE ANTİFUNGAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Investigation of Antifungal Effects of Propolis and Curcumin Extracts on Trichophyton Species

Zehra Özlem ÜNAL¹ , Berna ERDAL² 

¹ Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Tekirdağ, TÜRKİYE.

² Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Tekirdağ, TÜRKİYE.

Bu yüksek lisans tez çalışması Trakya Üniversiteler Birliği 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur, 24-26 Ekim, 2019.

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Onay No: 2017/37/03/08).

Öz

Amaç: Dermatofitler arasında yüzeysel mantar enfeksiyonlarına sebep olan en yaygın cins Trichophyton'dur. Bu türlerin tedavisinde antifungal ajanların yetersizliği farklı terapötik ajanların araştırılmasına yol açmıştır. Bu çalışmada 100 Trichophyton türü üzerine kurkumin ve propolis ekstraktlarının antifungal ve sinerjistik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya dahil edilen 100 Trichophyton izolatı üzerine propolis ve kurkuminin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nde belirtilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Sinerjistik etkinin araştırılmasında mikrodilüsyon dama tahtası (checkerboard) yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Biri (%1) saçtan, 91'i (%91) deriden, sekizi (%8) tırnaktan izole edilen toplam 100 Trichophyton izolatının 76'sı (%76) Trichophyton rubrum, 24'ü (%24) Trichophyton mentagrophytes olarak tanımlandı. Trichophyton izolatlarına karşı kurkumin MİK değerleri 5-160 µg/ml, propolis MİK değerleri 0.625-80 µg/ml aralığında tespit edildi. Kurkumin ve propolis kombinasyonunun 80 (%80) Trichophyton izolatı üzerine sinerjistik etkili (FİKİ≤0.5), 20 (%20) Trichophyton izolatı üzerine ise etkisiz (0.5<FİKİ≤2) olduğu bulundu. 59 (%77.6) T. rubrum izolatında ve 21 (%87.5) T. mentagrophytes izolatında sinerjistik etki belirlendi.

Sonuç: Çalışma sonucunda kurkumin ve propolis ekstraktlarının tek başlarına ve kombinasyonlarının T.rubrum ve T.mentagrophytes türleri üzerine antifungal ve sinerjistik etkisi olduğu belirlendi. Bu çalışma Trichophyton türleri üzerine kurkumin ve propolis sinerjistik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışma sonuçlarının ileri çalışmalar ile desteklenmesinin klinisyenlere dermatofitoz tedavisinde alternatif/tamamlayıcı bir seçenek oluşturabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Trichophyton, kurkumin, propolis, MİK, sinerjistik etki.

Abstract

Aim: Trichophyton is the most common genus that causes superficial fungal infections among dermatophytes. The insufficiency of antifungal agents in the treatment of these species has led to the investigation of different therapeutic agents. In this study, it was aimed to investigate the antifungal and synergistic effects of curcumin and propolis extracts on 100 Trichophyton species.

Materials and Methods: The minimum inhibitory concentration (MIC) values of propolis and curcumin on 100 Trichophyton isolates that included in the study were determined by the broth microdilution method specified in the Clinical and Laboratory Standards Institute. Microdilution checkerboard method was used in the investigation of the synergistic effect.

Results: 100 Trichophyton isolate, that one (1%) isolated from the hair, 91 (91%) from the skin, and eight (8%) from the nail, were identified as 76 (76%) Trichophyton rubrum and 24 (24%) Trichophyton mentagrophytes. Curcumin MIC values between 5-160 µg/ml and propolis MIC values between 0.625-80 µg/ml were determined against Trichophyton isolates. It was found that the combination of curcumin and propolis was synergistically effective (FICI≤0.5) on 80 (80%) Trichophyton isolates and ineffective (0.5<FICI≤2) on 20 (20%) Trichophyton isolates. Synergistic effects were determined in 59 (77.6%) T. rubrum isolates and 21 (87.5%) T. mentagrophytes isolates.

Conclusion: As a result of the study, it was determined that curcumin and propolis extracts by themselves and in combination had antifungal and synergistic effects on T.rubrum and T.mentagrophytes species. This study has the specialty of being the first study which has investigated the synergistic effects of curcumin and propolis on Trichophyton species. It is thought that supporting the results of the study with further studies may create an alternative/complementary option for clinicians in the treatment of dermatophytosis.

Keywords: Trichophyton, curcumin, propolis, MIC, synergistic effect.

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Berna ERDAL

Adres: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 59030 Tekirdağ /TÜRKİYE

E-posta: berdal@nku.edu.tr

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 09.09.2020

Date Accepted / Kabul Tarihi: 03.10.2020

Namık Kemal Tıp Dergisi 2020; 8(3): 515 - 522

GİRİŞ

Dermatofitler, yüzeysel mikozların en önemli etkenidir¹. Canlı hücreye girişi sağlayan keratinofilik proteazlar yaparak hifleri ile deri ve tırnağın stratum korneum tabakasına penetre olan dermatofitler, üç anamorfik türde (*Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton*) sınıflandırılmaktadır². Dermatofitlerde etken olarak izole edilen dermatofit türleri çoğunlukla *Trichophyton* cinsi içinde yer almaktadır. Hayvandan hayvana/insana veya insandan insana bulaşabilirler. Deride kepeklenme, vezikül oluşumu ve iltihaplanmaya, saçlarda kırılma ve dökülmeye, tırnak da şekil ve yapı bozukluğuna neden olan ve tinea adı verilen tipik lezyonlar oluştururlar³.

Dermatofitlerin neden olduğu yüzeysel mantar enfeksiyonlarının tedavisinde çeşitli oral ve topikal antifungal ajanlar kullanılmaktadır. Tedavisi zor olan inatçı enfeksiyonların sayısının giderek artmasına bağlı olarak antifungal ajanlarla tedavi çoğu zaman yetersiz kalabilmektedir⁴. Dermatofitlerin mevcut antifungal ajanlarla tedavisi çoğu zaman yetersiz kalabilmektedir. Antifungal etkisi olan daha iyi terapötik ajanların araştırılması, alternatif olarak umut vaad eden fotodinamik prosedürlerin kullanımına yol açmıştır. Kurkumin ve propolis bu tür uygulamalar için uygun bir madde olabileceği ileri sürülmüş ve araştırmalar bu yönde hız kazanmıştır⁵.

Propolis, bitki salgılarından bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanan yapışkan bir maddedir. Bal arıları propolisi kovan girişini davetsiz misafirlerden korumak ve kovanda istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini önlemek amacıyla kullanılmaktadır⁶. Yapılan klinik çalışmalar propolisin antiinflamatuvar, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özelliğinin olduğunu göstermektedir⁷.

Kurkumin, Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan bir baharatın içeriğinde bulunan ve zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinden izole edilen sarı-turuncu renkli fenolik bir bileşiktir. Geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan kurkuminin pek çok kullanım alanı olduğu bilinmektedir⁸. *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* vb. mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir^{9,10}.

Bu çalışmada; Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 100 *Trichophyton* izolatu üzerine propolis ve kurkuminin hem tek tek hem de kombinasyonlarının antifungal ve sinerjistik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Onay No: 2017/37/03/08).

Trichophyton türleri

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen enfekte saç, deri ve tırnaktan izole edilen ve standart yöntemler ile tanımlanan toplam 100 *Trichophyton* türü çalışmaya dahil edildi. Kontrol suşu olarak *Trichophyton rubrum* suşu (NCPF 0419) kullanıldı.

Ekstraktların hazırlanması

Hindistan kökenli toz haldeki 0.1814 g/ml kurkumin örneğinin 200 µl 0.5 M NaOH + 800 µl PBS (GibcoLife Technologies, USA) içerisinde çözünmesi sağlandı. Elde edilen çözelti 0.22 µM (Minisart®

NML SyringeFilter, Germany) filtreden geçirildi. *Apis mellifera carnica* arı kolonisinden toplanarak kurutulan propolis (Edirne, Türkiye) havanda ezildikten sonra %70'lik ethanol (Merck, USA) ile 3 gün oda sıcaklığında etrafı ışık görmeyecek şekilde kapatılıp çalkalamalı etüvde çözünmeye bırakıldı. Daha sonra Whatman® Grade 1 Kalitatif Filtre Kağıdı (Sigma-Aldrich, Germany) ile süzöldükten sonra liyofilizatörde (Alpha 2-4 LD Plus Christ/18573) kurutularak toz haline getirildi. Stok çözelti 320 µg/ml olacak şekilde %70'lik ethanolde çözdüröldükten sonra 0.22 µM filtreden (Minisart® NML SyringeFilter, Germany) geçirildi. Kurkumin için 5-2560 µg/ml, propolis için ise 0.625-320 µg/ml aralığında hazırlanan konsantrasyonlar antifungal aktivite çalışmalarında kullanıldı¹¹.

Antifungal aktivitenin belirlenmesi

Trichophyton izolatlarının antifungal duyarlılık testleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] M38-A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı¹². Her kuyucuğa RPMI-1640 besiyerinden (L-glutaminli, bikarbonatsız) (Sigma, ABD) 100 µL eklendi. Daha sonra kurkumin (5-2560 µg/ml) ve propolis (0.625-320µg/ml) için hazırlanan stok konsantrasyonlarından mikropoplakların 1. kuyucuğuna 100 µl eklenerek seri dilüsyonları yapıldı. 11. kuyucuğa ise 100 µL besiyeri ile 100 µL inokulum (üreme kontrolü), 12. kuyucuğa ise sadece 200 µL besiyeri (sterilite kontrolü) eklendi. Üzeri kapatılarak kullanılıncaya kadar -70°C'de saklandı.

İnokulumun hazırlanması

Stok inokulum süspansiyonları 30°C'de 4-5 gün patates dekstroza agarda büyütölen dermatofit kolonilerinden hazırlandı. Olgun kolonilerin üzerine 2 ml % 0.9'luk sodyum klorür (Koçak Farma, Türkiye) eklenerek steril öze yardımı ile nazıkçe konidiaların kazınması sağlandı. Mantar yapılarının olduğu sıvı kısım pastör pipeti ile çekilerek steril tüpe aktarıldı. 20 dakika oda ısısında hif yapılarının çökmesi beklendikten sonra süpernatant kısmı alınarak başka bir steril tüpe aktarıldı. Tüp 15 saniye vortekslendi. Üzerine 2 ml RPMI-1640 besiyeri eklendi. Hazırlanan örneklerden 10 µl alınarak thoma lamında konidia sayımları yapıldı. Son inokulum miktarı 0.4-5x10⁴ konidia/ml olacak şekilde RPMI-1640 ile seyreltildi (1:50).

100 µl dilüe ekstrakt süspansiyonu bulunan mikropoplakın 1-10 kuyucuğuna 100 µl dilüe inokulum süspansiyonu eklendi. 35°C'de 4-5 gün inkübe edildi ve sonuçlar görsel olarak değerlendirildi. Görsel değerlendirmeye ek olarak üremenin görölmediği kuyucuklardan Sabouraud dekstroza agar (SDA) besiyerine ekimler yapıldı. Ekilen koloniler 24-48 saat sonra değerlendirildi. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuktaki üreme, kontrol kuyucuğuyla karşılaştırıldı. Üremenin görölmediği en düşük ekstrakt konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri olarak kabul edildi.

Kurkumin ve propolis için MİK değeri üreme kontrol kuyucuğu ile karşılaştırıldığında, %100 mantar büyümesini inhibe eden minimum konsantrasyon olarak kabul edildi. Kontrol suşu olarak *Trichophyton rubrum* suşu (NCPF 0419) kullanıldı.

Dama tahtası (Checkerboard) sinerji testi

Her bir *Trichophyton* izolatı için kurkumin ve propolis ekstraktlarının kombine etkilerinin araştırılmasında dama tahtası (Checkerboard) yöntemi kullanıldı. 96 kuyucuklu U tabanlı mikropoplaklarda çalışılan bu testte besiyeri olarak RPMI-1640 kullanıldı. Ekstraktların konsantrasyonları MİK değeri dördü katı konsantrasyon olacak şekilde hazırlandı. Mikropoplakların dikey sırasına kurkumin, yatay sırasına ise propolis eklendi. Kuyucuklara her bir ekstraktan 50 µl eklenerek toplamda her bir kuyucukta 100 µl ekstrakt kombinasyonu olması sağlandı. Her bir kuyucuğa 5x10⁵ cfu/ml

mantar süspansiyonundan 100 µl ilave edildi. 11. kuyucuklar üreme kontrolü, 12. kuyucuklar sterilite kontrolü olarak kullanıldı. Hazırlanan mikrop plaklar 35°C'de 2-3 gün etüvde inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar görsel olarak değerlendirildi. Bu deney her bir *Trichophyton* izolatı için 3 kez tekrar edildi.

Sonuçların yorumlanması için önce her iki ekstraktın ayrı ayrı Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu (FİK) hesaplandı. Buna göre FİKA= (A maddesinin kombinasyondaki MİK değeri/A maddesinin tek başına MİK değeri), FİKB= (B maddesinin kombinasyondaki MİK değeri/B maddesinin tek başına MİK değeri) formüllerine göre FİK değerleri bulundu. FİKA ile FİKB toplanarak FİK indeksi (FİKİ) hesaplandı. Çıkan değerde; FİKİ ≤ 0.5 ise sinerjistik etki, 0.5 < FİKİ ≤ 2 ise indifferans etki, FİKİ > 2 ise antagonistik etki olarak yorumlandı¹³.

BULGULAR

100 *Trichophyton* izolatının biri saçtan, 91'i deriden, sekizi tırnaktan izole edilmiştir. İzole edilen *Trichophyton* izolatlarının 76'sı *Trichophyton rubrum*, 24'ü *Trichophyton mentagrophytes* olarak tanımlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. *Trichophyton* türlerinin izole edildikleri bölgelere göre dağılımı

İzolat	Saç n (%)	Deri n (%)	Tırnak n (%)	Toplam
<i>Trichophyton rubrum</i>	1 (%1)	69 (%69)	6 (%6)	76 (%76)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	22 (%22)	2 (%2)	24 (%24)
Toplam	1 (%1)	91 (%91)	8 (%8)	100 (%100)

Bu çalışmada 100 *Trichophyton* izolatı üzerine kurkumin ve propolis ekstraktlarının tek başlarına ve kombine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada test edilen *Trichophyton* izolatlarına karşı kurkumin MİK değerleri 5-160 µg/ml aralığında elde edilirken, propolis MİK aralığı 0.625-80 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Kurkumin ve propolis MİK değerlerinin türlere göre dağılımı

EKSTRAKT	TÜR	MİK Değerleri (µg/mL)									TOPLAM
		160	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	
KURKUMİN	<i>T. rubrum</i> (n)	15	19	16	12	10	4	-	-	-	76
	<i>T. mentagrophytes</i> (n)	3	7	7	5	2	-	-	-	-	24
PROPOLİS	<i>T. rubrum</i> (n)	-	3	10	18	17	16	6	4	2	76
	<i>T. mentagrophytes</i> (n)	-	1	2	9	5	4	2	-	1	24

Checkerboard yöntemi ile yapılan sinerjistik etki çalışmasında kullanılan kurkumin için 5-640 µg/ml, propolis için 0.625-320 µg/ml dilüsyon aralığı belirlenmiştir. Çalışma sonunda MİK değerlerini belirleyebilmek için kuyucuklardan SDA besiyerine ekimler yapılmıştır. Ekilen koloniler 24-48 saat sonra değerlendirilmiştir. Sinerjistik etki sonrası kurkumin MİK değerleri 5-40 µg/ml, propolis MİK değerleri 0.625-20 µg/ml aralığında bulunmuştur. Her bir kuyucuktaki izolat için FİKİ değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Kurkumin ve propolis kombinasyonunun 80 (%80) *Trichophyton* izolatı üzerine sinerjistik etkili (FİKİ≤0.5), 20 (%20) *Trichophyton* izolatı üzerine ise etkisiz (0.5<FİKİ≤2) olduğu tespit edilmiştir. 59 (%77.6) *T. rubrum* izolatında ve 21 (%87.5) *T. mentagrophytes* izolatında sinerjistik etki belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Türler'e göre elde edilen FİKİ değerleri

Türler	FİKİ≤0.5	0.5<FİKİ≤2	FİKİ>2	TOPLAM
<i>T.rubrum</i> (n)	59	17	-	76
<i>T.mentagrophytes</i> (n)	21	3	-	24
Toplam	80	20	-	100
FİKİ ≤ 0.5 ise sinerji, 0.5 < FİKİ ≤ 2 ise etkisiz (indiferans) FİKİ > 2 ise antagonist				

Kontrol olarak kullanılan *Trichophyton rubrum* (NCPF 0419) suşunun kurkumin ve propolis için MİK değerleri sırasıyla 80 µg/ml ve 20 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Sinerjistik etki sonrası kurkumin MİK değeri 10 µg/ml, propolis MİK değeri ise 5 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışma sonunda kurkumin ve propolis ekstraktlarının kombinasyonlarının *Trichophyton rubrum* standart suşu üzerine sinerjistik etkili (FİKİ≤0.5) olduğu saptanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. *Trichophyton rubrum* (NCPF 0419) MİK değerleri

	SİNERJİSTİK ÇALIŞMA ÖNCESİ MİK DEĞERLERİ		SİNERJİSTİK ÇALIŞMA SONRASI MİK DEĞERLERİ		
	KURKUMİN	PROPOLİS	KURKUMİN	PROPOLİS	FİKİ
<i>T. rubrum</i> (NCPF 0419)	80 µg/mL	20 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	≤ 0.5

FİKİ değeri ≤ 0.5 ise sinerji

TARTIŞMA

Dermatofit enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilaçların sınırlı olması ve bazı durumlarda bu tedavilerin başarısız olması nedeniyle, son yıllarda yeni terapötik kaynaklar araştırılmaya başlanmış ve doğal ürünlerin kullanıldığı tedaviler ön plana çıkmaya başlamıştır. *Trichophyton* türleri üzerine farklı doğal bileşiklerin antifungal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur^{14,15}.

Doğal ürünlerden biri olan propolis, bal arıları tarafından toplanan farklı bitki eksüdatlarının reçineli bir karışımıdır. Propolis günümüzde gıda takviyesi olarak ve halk hekimliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır¹⁴.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Kayseri'den toplanan propolisin, *T.rubrum* (n:25) ve *T.mentagrophytes* (n:4) olmak üzere toplam 29 dermatofit suşuna karşı *in vitro* aktiviteleri terbinafin, itraconazol, ketokonazol ve flukonazol ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda sistemik antifungaller arasında terbinafinin diğer antifungaller ile kıyaslandığında bu türler üzerine daha etkili olduğu, propolis ekstraktlarının düşük MİK değerlerinde *T.rubrum* ve *T.mentagrophytes* üzerine antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Araştırmacılar dermatofitoz tedavisinde propolisin klinik açıdan değerlendirilmesi için ileri çalışmaların yapılması gerektiğini vurgulamışlardır¹¹.

Agüero ve arkadaşları Arjantin (Tucuman eyaleti) kökenli propolis ekstraktlarının çeşitli dermatofitler ve maya türleri üzerine *in vitro* antifungal aktivitesini mikrodilüsyon yöntemi kullanarak araştırmışlar ve propolis MİK değerlerini 16-125 µg/ml arasında bulmuşlardır. Duyarlılığı en yüksek türlerin *Microsporum gypseum*, *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* olduğunu belirlemişlerdir¹⁶. Aynı araştırmacıların yaptığı başka bir çalışmada, MİK değerleri 31.25-125 µg/ml arasında bulunan Arjantin Andean propolisinin dermatofitler ve mayalar üzerine inhibe edici etki gösterdiği saptanmıştır. Çalışma sonunda Arjantin Andean propolisinin terapötik potansiyele sahip değerli bir doğal ürün olduğunu ifade etmişlerdir¹⁷.

Trichophyton rubrum, *T.tonsurans* ve *T.mentagrophytes* türleri üzerine Brezilya yeşil ve kırmızı propolisinin alkollü ekstraktlarının *in vitro* antifungal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, yeşil propolisin antifungal aktivitesinin 64-1024 µg/ml, kırmızı propolisin ise 8-1024 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, incelenen üç *Trichophyton* türü için kırmızı propolis ekstraktının antifungal

aktivitesinin yeşil propolis ekstraktından daha etkili olduğu bulunmuştur. *Trichophyton* türlerinden *T.rubrum*'un propolis ekstraktlarına daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma sonuçları, yeşil ve kırmızı propolisin alkollü ekstraktlarının *Trichophyton* türlerinin neden olduğu dermatofitozların tedavisinde alternatif bir seçenek olarak uygulanabilir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir¹⁸.

Falcão ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada Portekiz'in Bragança (A1) ve Leiria (A2) eyaleti olmak üzere iki farklı Portekiz propolisi ile *Populusx Canadensis* ve *Cistus ladanifer* bitkilerinin etanolik ekstraktlarının antiprotozoal, antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini araştırmışlar ve sonuçta popolis etanolik ekstraktlarının daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Her iki propolis örneğinin de benzer antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve en yüksek antimikrobiyal aktivitenin *T.rubrum*'a (A1 IC₅₀: 14.5±1.2 µg/ml, A2 IC₅₀: 11.0±0.9 µg/ml) karşı, en düşük aktivitenin ise *Aspergillus fumigatus*'a (A1 ve A2 IC₅₀: >64.0 µg/ml) karşı olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar karmaşık bir kimyasal bileşime sahip olan propolisin aktif bileşenlerinin tanımlanarak mikroorganizmalara karşı etkinliklerinin ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır¹⁵.

Monzote ve arkadaşlarının kahverengi, kırmızı ve sarı gibi farklı kimyasal yapılarda olan 20 Küba propolis ekstraktının antibakteriyel, antifungal ve antiprotozoal özelliklerini değerlendirdikleri bir çalışmada, bu ekstraktların düşük µg/ml konsantrasyonlarda *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ve *T.rubrum* B68183 standart suşlarının büyümesini inhibe ettiğini ancak *Escherichia coli* ATCC 8739 ve *Candida albicans* B59630 standart suşlarına karşı etkili olmadığını belirlemişlerdir¹⁹.

Onikomikoz hastalarından izole edilen *T.rubrum* (n:29), *T.mentagrophytes* (n:13), *T.verrucosum* (n:2) ve *T.interdigitale* (n:1) olmak üzere toplam 45 izolat üzerine propolis ekstraktının antifungal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, tüm izolatların MİK değerleri düşük bulunmuştur [*T.rubrum* (n:29) MİK₅₀: 0.088 µg/ml, *Trichophyton* spp. (n:16) MİK₅₀: 0.044 µg/ml]. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar onikomikozun topikal tedavisinde propolis ekstraktı uygulamasının daha detaylı çalışmalar ile değerlendirmesinin önemini vurgulamıştır¹⁵.

Curcuma longa L. (Zingiberaceae familyası) ve polifenolik bileşiği olan kurkumin, yaygın geleneksel kullanımları ve düşük yan etkileri nedeniyle çeşitli antimikrobiyal araştırmalarda çalışılan bir başka doğal bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır²⁰. Literatürde kurkuminin *Trichophyton* türleri üzerine fotokimyasal inhibisyonunu araştıran çalışmalar güncelliğini korumasına rağmen, *Trichophyton* türleri üzerine kurkuminin antifungal aktivitesinin araştırıldığı sadece birkaç çalışma bulunmaktadır^{21,22,23}.

Curcuma longa L.'den izole edilen zerdeçal yağı ve kurkuminin 15 dermatofit, dört patojenik küf ve altı maya izolatı üzerine antifungal etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada kobaylarda *Trichophyton* kaynaklı dermatofitozlarda zerdeçal yağının inhibe edici etkisi de araştırılmıştır. Çalışma sonunda 15 dermatofit izolatının tümünün 1:40-1:320 seyreltmelerde zerdeçal yağı tarafından inhibe edildiği ancak dermatofitlerin hiçbir izolatının kurkumin tarafından inhibe edilmediği gösterilmiştir. Deney hayvanlarında *T.rubrum* ile dermatofitoz oluşumunun 7. gününde zerdeçal yağı uygulanmış ve 6-7 gün sonra oluşan lezyonların kaybolduğu gözlenmiştir²¹.

Wuthi-udomlert ve arkadaşları kurkuminin antifungal etkisini araştırdıkları çalışmalarında, *Curcuma longa*'dan izole edilen yağın (MİK: 7.2 mg/ml) dermatofitlere karşı antifungal etki gösterdiğini belirlemişlerdir²². Khattak ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada da, *Curcuma longa*'nın etanolik ekstraktlarının *T.longifusus*'a karşı antifungal etkiye (%65) sahip olduğu gösterilmiştir²⁴.

Bu çalışmada *Trichophyton* izolatlarına karşı kurkumin MİK değerleri 5-160 µg/ml aralığında elde edilirken, propolis MİK aralığı 0.625-80 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Propolis MİK değerleri hem *T.rubrum* hem de *T.mentagrophytes* için 0.625-80 µg/ml aralığında bulunmuştur. Kurkuminin *T.rubrum* ve *T.mentagrophytes* için MİK aralığı ise sırasıyla 5-160 µg/ml ve 10-160 µg/ml olarak saptanmıştır. Sonuçlar propolisin kurkumine kıyasla daha iyi antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum *Trichophyton* türleri üzerine antifungal etkinlik araştırmalarında literatürde kurkumine kıyasla propolise ait daha çok sayıda çalışmaya rastlanılmasını açıklar niteliktedir.

Bu çalışmanın ikincil amacı olarak propolis ve kurkuminin sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Literatüre bakıldığında bu iki ekstraktın birlikteliğinin dermatofitler üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamak ile birlikte propolis ve kurkumin ekstraktlarının antifungal ajanlar ile kombinasyonlarının mayalar üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur^{25,26}

Bizim çalışmamızda kurkumin ve propolis ekstraktlarının kombinasyonlarının *Trichophyton rubrum* (NCPF 0419) standart suşu üzerine sinerjistik etkili (FİKİ ≤0.5) olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kurkumin ve propolis kombinasyonunun 80 *Trichophyton* izolatı üzerine sinerjistik etkili (FİKİ≤0.5), 20 *Trichophyton* izolatı üzerine ise etkisiz (0.5<FİKİ≤2) olduğu tespit edilmiştir. 59 *T.rubrum* izolatında ve 21 *T.mentagrophytes* izolatında sinerjistik etki belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında sinerjistik etki gösteren propolis ve kurkuminin *Trichophyton* türleri üzerine iyi bir antifungal aktivite göstereceği sonucuna varılabilir.

SONUÇ

Sonuç olarak; *Trichopyton* türleri üzerine kurkumin ve propolis ekstraktının antifungal etkiye sahip olduğu ve bu ekstraktların kombinasyonlarının *T.rubrum* ve *T.mentagrophytes* üzerinde sinerjistik etkileri olduğu söylenebilir. *Trichopyton* türlerinin neden olduğu inatçı dermatofitoz olgularında bu iki ekstraktın antifungal tedaviye destek olabileceğini gösterebilmek için yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ek olarak bu çalışmanın literatürde kurkumin ve propolis sinerjistik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olması sebebiyle yapılacak ileri çalışmalar ile araştırmamızda elde edilen sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Hayette MP, Sacheli R. Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. Current Fungal Infection Reports. 2015;9(3):164–179.
- Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, Dupin N, Puel A, Lortholary O, et al. Severe Dermatophytosis and Acquired or Innate Immunodeficiency: A Review. J Fungi (Basel). 2016;2(1):4.
- Yoshikawa FSY, Gonçalves FL, Almeida SR. IL-1 signaling inhibits *Trichophyton rubrum* conidia development and modulates the IL-17 response in vivo. Virulence. 2015;6(5):449–457.
- Ananta K, Kabir S, Anuradha C. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. Fungal Genet Bio. 2019;132:103255.
- Brasch J, Freitag-Wolf S, Beck-Jendroschek V, Huber M. Inhibition of dermatophytes by photodynamic treatment with curcumin. Medical Mycology. 2017;55(7):754–762.
- ALP H. Effects of Propolis on Immune System. ANADOLU, J. of AARI. 2018;28(2):99–104.
- Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial Properties of Propolis. Molecules. 2019;24(11):2047.
- Yalçın AS, Yılmaz AM, Altundağ EM, Koçtürk S. Kurkumin, Kuersetin ve Çay Kateçinlerinin Anti-Kanser Etkileri. Marmara Pharmaceutical Journal. 2017;21:19-29.
- Yun DG, Lee DG. Antibacterial activity of curcumin via apoptosis-like response in *Escherichia coli*. Microbiol Biotechnol. 2016;100(12):5505-14.
- Neyestani Z, Ebrahimi SA, Ghazaghi A, Jalili A, Sahebkar A, Rahimi HA. Review of Anti-Bacterial Activities of Curcumin against *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2019;29(5):377-385.
- Koc AN, Silici S, Ayangil D, Ferahbaş A, Cankaya S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. Mycoses. 2005;48(3):205-10.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard-Second Edition. CLSI Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA. 2018.
- Tamura T, Asahara M, Yamamoto M, Yamaura M, Matsumura M, Goto K, et al. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. Microbiol Immunol. 2014;58(1):1-8.

14. Veiga FF, Gadelha MC, da Silva MRT, Costa MI, Kischkel B, de Castro-Hoshino LD, et al. Propolis Extract for Onychomycosis Topical Treatment: From Bench to Clinic. *Front Microbiol.* 2018;9:779.
15. Falcão SI, Vale N, Cos P, Gomes P, Freire C, Maes L, et al. In vitro evaluation of Portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity. *Phytother Res.* 2014;28(3):437-43.
16. Agüero MB, Gonzalez M, Lima B, Svetaz L, Sánchez M, Zacchino S, et al. Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58(1):194-201.
17. Agüero MB, Svetaz L, Sánchez M, Luna L, Lima B, López ML, et al. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):1970-8.
18. Siqueira ABS, Gomes BS, Cambuim I, Maia R, Abreu S, Souza-Motta CM, et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Letters in Applied Microbiology.* 2009;48:90-96.
19. Monzote L, Cuesta-Rubio O, Fernandez MC, Hernandez IM, Fraga J, Pérez K, et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(8):978-984.
20. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International.* 2014;Article ID 186864, 12 pages.
21. Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol.* 1995;49(3):163-9.
22. Wuthğ-Udomlert M, Grğsanapan W, Luanratana O, Cağçhompoo W. Antifungal activity of *Curcuma longa* grown in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000;1:178-82.
23. Moon-Riley KC, Copeland JL, Metz GAS, Currie CL. The biological impacts of Indigenous residential school attendance on the next generation. *SSM-Population Health.* 2019;7:100343.
24. Khattak S, Ur-Rehman S, Shah H, Ahmad W, Ahmad M. Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. *Fitoterapia.* 2005;76(2):254-7.
25. Sharma M, Manoharlal R, Negi AS, Prasad R. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. *FEMS Yeast Res.* 2010;10(5):570-8.
26. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines (Basel).* 2018;5(1):2.

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Onay No: 2017/37/03/08).
