

مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس علیه آسپرژیلوس فلاووس در شرایط *In vivo*

سمیه راشکی*، طاهره ولدبیگی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۰۵

چکیده

مقدمه: گل‌سنگ از همزیستی بین یک قارچ با یک جلبک یا سیانوباکتری به وجود آمده است. فعالیت‌های زیستی مختلف بعضی گونه‌های گل‌سنگ و ترکیبات آن‌ها از قبیل مواد ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد تومور، ضد التهاب و ضد انگل شناخته شده است. در این مطالعه بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس علیه آسپرژیلوس فلاووس در مدل حیوانی روی رت بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها: ۵۰۰ گرم پروتوپارملیوپسیس مورالیس از کوه‌های کان‌گنبد در استان ایلام جمع‌آوری شد، عصاره متانولی آن با استفاده از سوکسله تهیه گردید. جهت تعیین فعالیت ضد قارچی در شرایط این‌ویوو بعد از ایجاد زخم، سطح زخم با قارچ آسپرژیلوس فلاووس آلوده گردید. بعد از اطمینان از عفونی شدن زخم‌ها، رت‌ها در ۴ زیرگروه تقسیم شدند. گروه کنترل منفی، درمان شده با پماد کلوتریمازول، درمان شده با پماد ۵ درصد عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس و درمان شده با پماد ۱۰ درصد عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس. درمان تا بهبود کامل زخم ادامه یافت. در نهایت درصد بهبود زخم محاسبه گردید.

نتایج: این تحقیق نشان داد که عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس مساحت زخم را در گروه درمان نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد.

نتیجه‌گیری: فعالیت ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس مسئول سرعت بخشیدن به مراحل التیام زخم است.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس فلاووس، پروتوپارملیوپسیس مورالیس، زخم، قارچ، عصاره

مقدمه

ظاهر می‌شود و منبعی برای انتشار عفونت است. ضایعات ایجادشده معمولاً قرمز تا بنفش‌رنگ هستند و پلاک‌های سخت و زخم نکروزه ایجاد می‌کنند که با لایه خشک سیاه‌رنگ پوشیده شده است (۳).

استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم‌زمان بوده است (۴). اگرچه در نیم‌قرن گذشته استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به‌شدت رواج یافت ولی به‌سرعت آثار زیان‌بار آن‌ها بر زندگی انسان سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی گردید. اکثر داروهای شیمیایی که امروزه مصرف می‌شوند اثرات سویی بر روی انسان بر جای می‌گذارند؛ بنابراین طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به‌خصوص گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می‌شوند و در همین حال مواد اولیه موجود در آن‌ها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵، ۶).

امروزه افزایش عفونت‌های قارچی در افراد مبتلا به بیماری‌های و خیم و بیماران با سیستم ایمنی تضعیف‌شده به‌عنوان یکی از عوامل مرگ‌ومیر به‌شمار می‌رود (۱). رشد تکنولوژی و پیشرفت علوم پزشکی و نیز بهبود شرایط اجتماعی و بالا رفتن سطح بهداشت عمومی در جوامع پیشرفته به نحو چشمگیری موجب کنترل بیماری‌های عفونی و خصوصاً قارچی گردیده است (۲).

عفونت‌های قارچی فرصت‌طلب معمولاً در افراد مستعد باعث ایجاد بیماری‌های حاد و کشنده می‌گردد. بیماری‌های قارچی مرتبط با قارچ‌های آسپرژیلوس اصطلاحاً آسپرژیلوزیس نامیده می‌شود. به‌طوری‌که در بعضی افراد به‌صورت ضایعات ایجادشده در محل کاتتر وریدی که پانسمان آلوده داشته‌اند

*نویسنده مسئول: سمیه راشکی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام،
Email: somaye_rashki@yahoo.com
ایلام، ایران

کلید شناسایی استاندارد و همچنین مقایسه با نمونه‌های معتبر در هرباریوم برلین (B) و مونیخ (M) شناسایی گردید. نمونه‌ها پس از شستشو و خشک شدن در سایه، به صورت پودر درآمدند و عصاره متانولی آن‌ها با استفاده از سوکسله تهیه گردید (۱۳).

تهیه پماد

برای تهیه پماد از عصاره متانولی خشک‌شده استفاده گردید. پماد در دو غلظت ۵٪ و ۱۰٪ تهیه شد. برای تهیه پماد ۵٪، ۰/۵ گرم عصاره خشک‌شده در ۱ میلی‌لیتر متانول به طور کامل حل شد. در نهایت با ۴ گرم اوسرین (پایه پماد) مخلوط گردید به این ترتیب پماد ۵٪ از عصاره پروتوپارملیوسیس مورالیس به دست آمد. جهت تهیه پماد ۱۰٪، ۱ گرم عصاره خشک‌شده در ۱ میلی‌لیتر متانول حل گردید. سپس با ۹ گرم اوسرین مخلوط گردید (۱۴).

حیوانات

جهت انجام این تحقیق از ۲۰ رت ویستار (در هر گروه ۵ رت) استفاده شد. رت‌ها از دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام تهیه شد و همه مراحل در حیوان‌خانه دانشکده پیرادامپزشکی انجام گرفت. رت‌ها در سیکل نورانی ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و با دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند. سپس با استفاده از داروی بی‌هوشی دی‌کلرواتان بی-هوش شدند و زخمی به طول ۵ سانتی‌متر ایجاد شد (۱۵).

عفونی کردن محل زخم

با استفاده از سوسپانسیون قارچ آسپرژیلوس فلاووس معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^6$ CFU/ml) تهیه شده، محل زخم به قارچ آسپرژیلوس فلاووس آلوده شد. برای اطمینان از رشد میکروارگانیسم‌ها، از سطح زخم کشت تهیه گردید. برای این منظور از محیط کشت سابرو دکستروز آگار استفاده شد. بعد از اطمینان از عفونی شدن محل زخم، رت‌ها به صورت تصادفی در گروه‌هایی به صورت ذیل تقسیم شد.

A- گروه کنترل منفی

B- گروه تحت درمان با کلوتریمازول

C- گروه تحت درمان با پماد ۵٪

D- گروه تحت درمان با پماد ۱۰٪

بعد از تقسیم‌بندی گروه‌ها درمان آغاز شد. درمان به صورت روزانه و در ساعات مشخصی از طول روز انجام شد و تا زمان ترمیم کامل زخم ادامه یافت. برای محاسبه مساحت زخم جهت بررسی مورفومتریک از نرم‌افزار آنالیز تصاویر فرایند التیام زخم

در طی پنج دهه گذشته در زمینه اثرات دارویی گل‌سنگ-های مناطق مختلف جهان پژوهش‌های زیادی صورت گرفته است. گونه‌های آنتی‌میکروبی *Parmelia* به دلیل دارا بودن ترکیباتی نظیر آترانورین، بارباتیک اسید، نورستیک اسید، اسنیک اسید و ولپینیک اسید، در طب سنتی به صورت پماد برای درمان زگیل‌ها و بیماری‌های مجموعه‌ای بکار می‌روند (۷). همچنین جوشانده و عصاره بعضی از گونه‌ها جهت درمان خال-های گوشتی و به عنوان مقوی قلب استفاده می‌شوند (۸). دیفرکتائیک و اسنیک اسید جداسازی شده از *Usnea diffracta* به عنوان مسکن و ضدتب استفاده می‌شود (۹). بسیاری از گل‌سنگ‌ها مانند *Heterodermia obscurata* و *Nephromalae vigatum* دارای آنتراکوئینون بوده و در صنایع رنگرزی و کاغذسازی به کار می‌روند.

تحقیقات در مورد کاربرد تجاری و سنتی گل‌سنگ‌ها در هند نشان می‌دهد که ۳۸ گونه مختلف به صورت تجاری به فروش می‌رسند. در اروپا *Cetraria islandica* در درمان بیماری‌های مختلف دستگاه تنفسی و زکام کاربرد دارد (۱۰). بیسواس در سال ۱۹۹۲ گزارش کرده است که گونه گل‌سنگ *Lobaria pulmonaria* در ناحیه Sikkim برای درمان آسم، اگرما، بیماری‌های تنفسی و خونریزی استفاده می‌شود. همچنین آکلانی و یوپرتی در سال ۱۹۹۲ گزارش کرده‌اند که *Heterodermia diademata* در کشور هند برای محافظت زخم-ها و بریدگی‌ها از عفونت کاربرد دارد (۱۱، ۱۲). باین‌حال در زمینه کاربرد دارویی گل‌سنگ‌ها در ایران و همچنین خواص ضد قارچی عصاره موردنظر در شرایط این‌ویوو (ترمیم زخم) در دنیا مطالعه مؤثری صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق به بررسی اثرات دارویی گل‌سنگ‌های بومی ایران بخصوص خواص ترمیم زخمی عفونی در مدل حیوانی پرداخته شده است. به این امید که زمینه مناسبی جهت پژوهش در این راستا در کشور فراهم آورده شود. بدیهی است که نتایج مثبت حاصل از این مطالعه و با توجه به عوارض جانبی کمتر و اثرات ضد میکروبی نیاز به مطالعات گسترده‌تری در مورد کاربرد اثرات دارویی این گونه روی انسان دارد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

۵۰۰ گرم گل‌سنگ پروتوپارملیوسیس مورالیس از کوه‌های کان‌گنبد در استان ایلام جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از

شد؛ اما برخلاف گروه کنترل از روز هفتم تا سیزدهم روند کاهشی وجود داشت و مساحت زخم کاهش یافت (نمودار ۱، B). همچنین درصد بهبود زخم در روز پانزدهم در این گروه ۲۴ درصد بود که نسبت به گروه کنترل در روز سیزدهم اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد مشاهده شد (نمودار ۲). در گروه تحت درمان با پماد ۵ درصد روند التیام زخم از وضعیت بهتری نسبت به دو گروه کنترل و تحت درمان با پماد کلوتریمازول برخوردار بود به طوری که از روز سوم تا پنجم روند افزایشی در سطح زخم مشاهده شد؛ اما از روز پنجم تا سیزدهم مساحت زخم کاهش یافت (نمودار ۱، C) و در روز پانزدهم درصد بهبود زخم ۶۵ درصد بود که نسبت به دو گروه قبل اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد داشت (نمودار ۲). در گروه تحت درمان با پماد ۱۰ درصد عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس روند التیام زخم نسبت به گروه های ذکر شده در بالا بسیار سریع تر بود. (نمودار ۱، D) چنانچه درصد بهبود زخم در روز پانزدهم ۱۰۰ درصد بود و زخم به طور کامل ترمیم شد.

Motic Images 20001.2 استفاده شد. درصد بهبودی زخم طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۶).

$$\text{درصد بهبودی زخم} = \frac{\text{سطح زخم در روز A} - \text{سطح زخم در روز اول}}{\text{سطح زخم در روز اول}} \times 100$$

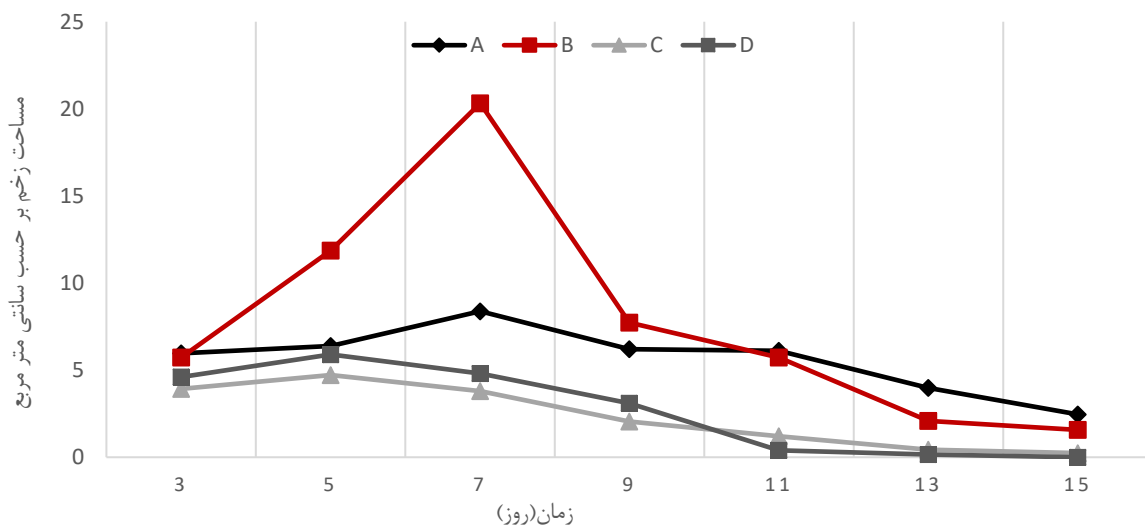
A: روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱

آنالیز آماری داده ها

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 21 مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس برای مقایسه نتایج از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون توکی (Tukey) استفاده شد و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند. اختلافات بین داده ها با در نظر گرفتن $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تحلیل تصاویر نشان داد که در گروه کنترل از روز سوم تا یازدهم افزایش چشم گیری در سطح زخم مشاهده شد



نمودار ۱- روند بهبود زخم در گروه های کنترل (A)، تحت درمان با پماد کلوتریمازول (B)، تحت درمان با پماد ۵ درصد عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس (C) و تحت درمان با پماد ۱۰ درصد عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس (D).

بحث و نتیجه گیری

از دیرباز مشخص شده است که متابولیت های ثانویه گلشن ها دارای فعالیت های زیستی و دارویی متعدد شامل اثرات ضد قارچی، ضد التهابی و ضد توموری هستند. با این وجود اسنیک اسید یکی از ترکیبات دارویی مهم است که اولین بار در

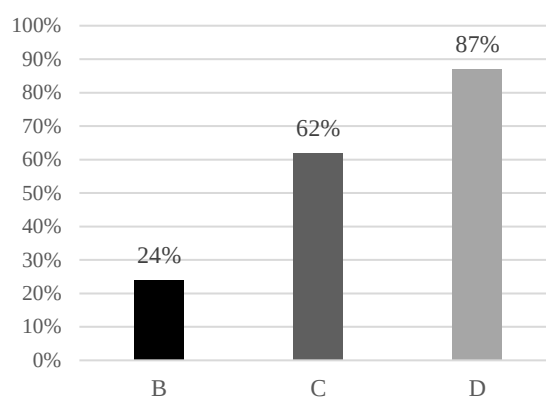
(نمودار ۱، A) به طوری که تا روز پانزدهم درصد بهبودی زخم صفر بود و هیچ گونه بهبودی صورت نگرفت (نمودار ۲). در این گروه پلاک های سخت و زخم نکروزه ایجاد شد که با لایه خشک سیاه رنگ پوشیده شد که به آن اسکروتیوم گفته می شود (شکل ۱). در گروه تحت درمان با پماد کلوتریمازول از روز سوم تا روز هفتم افزایش چشم گیری در سطح زخم مشاهده

پروتوپارملیوپسیس مورالیس سبب از بین بردن قارچ آسپرژیلوس فلاووس در سطح زخم شد و در مدت زمان (۱۳ روز) زخم به طور کامل التیام گردید.

لازم به ذکر است که بسیاری از متابولیت‌های گلسنگی به دلیل داشتن فعالیت ضد قارچی در داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به عنوان مثال متیل هائوماتومات جداسازی شده از *Stereocaulon ramulosum*، آنتراکوئینون پاریتین جداسازی شده از *Caloplaca cerina*، ولپینیک اسید و (+) - (-) - اسنیک اسید در گونه *Alectoria ochroleuca* دارای خواص ضد قارچی قابل توجهی هستند (۲۱ و ۲۲). همچنین متیل *Everniastrum cirrhatum* جهت درمان عفونت‌های قارچی انسانی که به آنتی‌بیوتیک‌های پلی آن و آزلو مانند آمفوتریسین B، نیاستاتین و کلوتریمازول مقاوم هستند، بسیار مؤثر است (۲۳). عصاره گونه‌های *Protousnea poeppigii* و *Usnea rigida* که دارای ترکیبات دیواریکاتیک اسید، ایزودیواریکاتیک اسید، اسنیک اسید و ۵- رسوارسینل می‌باشند و همچنین عصاره‌های *Evernia prunastri* (با بیشترین تأثیر روی مخمرها) و *Hypogymnia physodes* (با بیشترین تأثیر روی قارچ‌های میله‌ای) خواص ضد قارچی منحصربه‌فردی دارند (۲۴). اسنیک اسید، هائوماتومیک اسید و مشتقات فنلی تک حلقه‌ای که در بسیاری از گلسنگ‌ها یافت می‌شوند اثر بازدارندگی روی رشد کپک *Neurospora crassa* دارند (۲۵) همچنین از این ترکیب در عصاره‌های *P. cirrhatum*، *Eevernia prunastri* و *H. physodes* و همچنین گونه‌های دارای اورنیک اسید از جمله مواد ضد قارچی مهم محسوب می‌شوند (۲۶).

لازم به ذکر است که آفلاتوکسین B₁ (AFB₁) سم تولیدشده توسط گونه‌های مختلف *Aspergillus* است که سبب کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و در نتیجه سبب استرس‌های اکسیداتیو و صدمات ژنتیکی می‌شود. با این حال کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها پس از تیمار با (۱ AFB) ممکن است به دلیل غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و CAT اولین خط دفاعی علیه (ROS) باشد (۲۷).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در ترمیم زخم ایفا می‌کنند. اسید اسکوربیک یک آنتی‌اکسیدان سنتزی است که فاکتور اساسی برای سنتز کلاژن محسوب می‌شود و همچنین سبب تقویت کردن عملکرد نوتروفیل‌ها،



نمودار ۲- درصد بهبود زخم در روز پانزدهم پس از ایجاد زخم در گروه‌های تحت درمان با پماد کلوتریمازول (B)، تحت درمان با پماد ۵ درصد عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس (C) و تحت درمان با پماد ۱۰ درصد عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس (D)، لازم به ذکر است در گروه کنترل از روز سوم تا سیزدهم بهبودی صورت نگرفته است.



شکل ۱- تشکیل اسکروتیوم در گروه کنترل

سال ۱۸۴۴ شناسایی شد. تحقیقات صورت گرفته بر روی این ترکیب نقش ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی این ترکیب را اثبات می‌کند (۱۷، ۱۸ و ۱۹). لازم به ذکر است با توجه به مطالعات قبلی صورت گرفته بر روی ترکیبات مؤثر عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس مشخص شد اسنیک اسید یکی از ترکیبات مؤثر این عصاره است (۲۰).

در زمینه فعالیت ضد قارچی پروتوپارملیوپسیس مورالیس در شرایط این‌ویوو (ترمیم زخم) در دنیا تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است. همچنین نتایج مطالعه حاضر در شرایط این‌ویوو (ترمیم زخم) نشان داد که عصاره متانولی

را به حالت اول (نزدیک مقدار شاهد) برمی گرداند. این مسئله نشان دهنده نقش حفاظتی *D. intestiniforme* است. به کار بردن هم زمان AFB₁ و عصاره این گلشنک (در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ μm) در مقایسه با تیمار AFB₁ به تنهایی سبب کاهش قابل توجهی در مقدار SCEs سلول می گردد (۲۷).

باین وجود مطالعات زیادی امکان زدودن و یا جلوگیری از تشکیل رادیکال های آزاد در عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس را اثبات کرده است (۲۰)؛ بنابراین اثر عصاره پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر سرعت بخشیدن به فرایند التیام زخم آلوده به آسپرژیلوس فلاووس را می توان به فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد قارچی عصاره متانولی ناشی از وجود اسنیک اسید نسبت داد.

تشکر و قدردانی

از زحمات جناب آقای مهندس هوشمند فر که زمینه را جهت پژوهش کلینیک دامپزشکی دانشگاه ایلام فراهم نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

افزایش آنژیوژنز و بیشتر کردن فعالیت آنتی اکسیدانی می شود. باین وجود فعالیت نوتروفیل ها و ماکروفاژها سبب تولید رادیکال های آزاد می شود که یکی از عوامل مهم در تنظیم متابولیسم زخم محسوب می شود (۲۸، ۲۹).

گلشنک ها منابع غنی از آنتی اکسیدان های طبیعی می باشند، ترکیبات فنلی از جمله متابولیت های ثانویه گلشنک محسوب می شود. این ترکیبات، ترکیباتی با وزن مولکولی زیاد هستند که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و مهار کردن رادیکال های آزاد می باشند. همچنین باعث رسوب عناصر مانند آهن می شوند. ویژگی های آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از قدرت احیاکنندگی و ساختار شیمیایی که آن ها را قادر به خنثی کردن رادیکال های آزاد، تشکیل کمپلکس یون های فلزی و خاموش کردن مولکول های سه گانه می سازد، است (۳۰). علاوه بر ترکیبات فنلی اثرات آنتی اکسیدانی متیل ارسلینات، آترانورین، اورسلینیک اسید و لکانوریک اسید نیز در گلشنک ها اثبات شده است. طبق مطالعات گذشته عصاره *Dermatocarpon intestiniforme* به طور قابل توجهی سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان (SOD و CAT) در اریتروسیت ها در غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ μm می شود. کشت های تیمار شده با عصاره علیه AFB₁ سطح این آنزیم ها

References

1. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-Acquired Candidemia: The attributable mortality and excess length of stay. Arch Intern Med. 1988; 148(12):2642-2645.
2. Sarkar P, Ballantyne S. Management of diabetic leg ulcer. Postgrad Med J. 2000; 76(901):674-682.
3. Mandell G, Bennet J, Dolin R. Cellulitis and soft tissue infection. Principles and Practice of infectious diseases. Sixth edition. Pennsylvania: Churchill living stone; 2005, 1046- 1047.
4. Chen X, Wu Z, Yin J. Effects of four species of herbs on immune function of Carassius auratus gibelio. J Fish Sci China. 2003; 10:36-40.
5. Asuzu IU, Onu OU. Anti-ulcer activity of the ethanolic extract of Combretum dolichopetalum root. J ethnopharmacol. 1990; 28(1):27-32.
6. Boisnic S. Healing effect of spray containing Rhealba oat colloidal extract in an in vitro reconstitution model of skin. Tissue React. 2005; 27(3): 83-89.
7. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. Int. Immunopharmacol. 2006; 6(3): 317-333.
8. Sochting U. Lichens of Bhutan: Biodiversity and Use. Copenhagen: Botanical Institute, Department of Mycology, University of Copenhagen; 1999, 1-30.
9. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of Usnea diffracta. Plant Med. 1995; 61(2): 113-115.
10. Gulcin I, Oktay M, Kufrevioglu OI, et al. Determination of antioxidant activity of lichen Cetraria islandica (L) Ach. Journal of Ethnopharmacology. 2002; 79(3): 325-329.
11. Carl W, Emrich LS. Management of oral mucositis during local radiation and systemic Chemotherapy. J. Prosthet. Dent. 1991; 66(3): 361-369.



12. Rauf A, Latif A, Rehman S, Afaq SH. In vitro antimicrobial screening of extract of *Usnealongissima* lichen. *Int J Appl Biol Pharm technol*. 2011; 2(2): 14-18.
13. Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S. Antimicrobial activity of an extract and anthraquinones from *Caloplaca schaereri*. *Lichenologist*. 2002; 34(1): 83-85.
14. Gupta N, Jain UK. Investigation of wound healing activity of methanolic extract of stem bark of *Mimusop elenglinn*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011; 8(2): 98-103.
15. Manoj GS, Murugan K. Wound healing activity of methanolic and aqueous extracts of *Plagiochila beddomei* steph thallus in rat model. *Indian J. Biol*. 2012; 50(8): 551-558.
16. Walker HL, Mason AD. A standard animal burn. *J. Trauma*. 1969; 8(6): 1049-1051.
17. Lauterwein M, Oethinger M, BeIsner K, Peters T, Marre R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid and against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995; 39(11):2541-2543.
18. Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*. 2002; 89(4): 137-146.
19. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*. 1999; 86(12):559-570.
20. Valadbeigi T, Rashki S. GC-MS analysis and anticancer effect against MCF-7 and HT-29 cell lines and antioxidant, antimicrobial and wound healing activities of plant-derived compounds. *J Bas Res Med Sci*. 2015; 2(4):1-11.
21. Hickey BJ, Lumsden AJ, Cole ALJ, Walker JRL. Antibiotic compounds from New Zealand plants: *Methylhaematommate*, anti-fungal agent from *Stereocaulonra mulosum*. *New Zealand Natural Sciences*. 1990; 1749-53.
22. Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S, Milosev M. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia*. 2005;76(2):244-6.
23. Khanuja SPS, Kumar TRS, Gupta VK, Chand P, Garg A, Shrivastava SK, et al. Antimicrobial and anticancer properties of methyl β -orcinolcarboxylate from lichen (*Everniastrum cirrhatum*). United States Patent Application. US20070099993 A1.
24. Galloway DJ. Austral lichenology: 1690-2008. *New Zealand Journal of Botany*. 2008; 46 (4), 433-521.
25. Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S, Milošev M. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia*. 2005; 76(2): 244-246.
26. Shahi SK, Patra M, Dikshit A, Upreti DK. *Parmelia cirrhatum*: a potential source of broad spectrum natural antifungal. *Phytother Res*. 2003; 17(4): 399 -400.
27. Güleray A, Aslan A, Elif, K, Sarioglul L, Alpsoy S. Protective activity of the methanol extract of *Usnea Longissima* against oxidative damage and genotoxicity caused by aflatoxin B1 in vitro. *Turk J Med Sci*. 2011; 41(6): 1043-1049.
28. Martin, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276 (5309):75- 81.
29. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med*. 1999; 341(10): 738-746.
30. Pokorný J. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant components. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2007; 109(6): 629-642.



Original Article

In Vivo Screening Antifungal Activity of Methanolic Extract of *Protoparmeliopsis muralis* against *Aspergillus flavus*

Rashki S*, Valadbeigi T

Department of Biology, Faculty of Basic Science Ilam University, Ilam, Iran

Received: 15 May 2016

Accepted: 25 Dec 2016

Abstract

Background & Objective: Lichens are the result of the symbiosis of fungi and algae or a cyanobacterium. Various biological activities of some lichen and their components such as: antifungal, anti-bacterial, anti-tumor, anti-inflammatory, antiprotozoal substances are known. In the present study, antifungal activity of methanolic extract of *Protoparmeliopsis muralis* against *Aspergillus flavus* is investigated on rats.

Materials & Methods: 500 g of *Protoparmeliopsis muralis* was collected from KaneGonbad mountains in Ilam province, the methanol extract was prepared by soxhle. In order to determine the antifungal activity in in vivo conditions, a wound was created and infected with *Aspergillus flavus*. Having infected the wound, the researchers divided the rats into 4 subgroups: negative control group, treated with Kotrimoksazol, %5 ointment extract methanolic *P. muralis*, and with %10 ointment extract methanolic *P. muralis*. Treatment continued until complete healing of the wound. Finally, the percentage of wound healing was calculated.

Results: The result of the present study demonstrated that methanolic extract of *P. muralis* decreased the area of wound in the treatment group compared to the control group.

Conclusion: The antifungal and antioxidant activity of the extract of *Protoparmeliopsis muralis* accelerated the wound healing process.

Keywords: *Aspergillus flavus*, fungi, *Protoparmeliopsis muralis*, wound, extract

* Corresponding author: Somaye Rashki, Department of Biology, Faculty of Basic Science Ilam University, Ilam, Iran
Email: somaye_rashki@yahoo.com