Journal of Military Medicine
Spring 2016 ,Volume 18, Issue 1
Pages: 315-322

Evaluation of the antibacterial effects of *Arctium lappa* extracts on *Brucella melitensis 16M* in the animal model and macrophage culture

Nassiri-Semnani Sh[1*]PhD, Gholikhani F[2] MSc, Rahnema M[1] PhD,Shapouri R[2] PhD Alizadeh H[3] MSc,Gassempour H[1]PhD

[1] Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
[2] Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
[3] Young Researchers and Elite Club, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

Abstract

Aims: The aim of this study was to evaluate the antibacterial effects of aqueous and organic extracts of *Arctium lappa* on *Brucella* melitensis 16M in vitro, in macrophage culture and in the animal model.

Methods: In this experimental study aquatic, ethanolic, and acetonic extracts of *Arctium lappa* were prepared. The antibacterial effect of the extracts investigated by agar well diffusion and macrodilutionon methods for determination of MIC and MBC. Then the intramacrophge survival of the *B.melitensis 16M* was studied from the cell culture of Balb/c mice. Also, the antibacterial effect of the extracts were studied in the animal model.

Results: The MIC and MBC of leaves and inflorescences extracts of *Arctium lappa* on *B. melitensis* 16 M were 101 and 116 mg/ml, respectively. The maximum inhibition zone diameter was related to an ethanolic extract. In the macrophage culture and in the animal model, the aquatic extract of inflorescences of *Arctium lappa* was the most effective.

Conclusion: The aquatic and organic extracts of *Arctium lappa* have antibacterial activity against intramacrophage *B. Melitensis 16M*. The aquatic extract has the most effective antimicrobial activity on intramacrophage *B. Melitensis 16M.* These extracts can be useful in the treatment of brucellosis.

Keywords: Antimicrobial, *Brucella melitensis*, *Arctium lappa*, Macrophage

[*]Corresponding author: Nassiri-Semnani Sh., Email: Sh.nasiri92@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحات: ۳۲۲-۳۱۵

اثرات ضد باکتریایی عصاره بابا آدم (*Arctium lappa*) بر بروسلا ملی تنسیس M ۱۶ در مدل حیوانی و کشت داخل ماکروفاژی

شهرزاد نصیری سمنانی[۱]PhD*، فرزانه قلی خانی[۲] MSc، مهدی رهنما[۱]PhD، رضا شاپوری[۲]PhD، حامد علیزاده[۳] MSc، حسن قاسم پور[۱]PhD

[۱] مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
[۳] باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

چکیده

اهداف: هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات عصاره‌های بابا آدم بر بروسلا ملی تنسیس M ۱۶ در شرایط آزمایشگاهی، کشت درون ماکروفاژی و مدل حیوانی می‌باشد

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از تهیه عصاره‌های برگ، گل آذین و ریشه بابا آدم، اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها با روش انتشار چاهکی در آگار و ماکرودایلوشن جهت به دست آوردن MIC و MBC بررسی شد. سپس بقای داخل ماکروفاژی بروسلا ملی تنسیس M ۱۶ با کشت سلولی از ماکروفاژهای صفاقی موش بالب سی و همچنین در مدل حیوانی مطالعه گردید.

یافته‌ها: MIC و MBC عصاره اتانولی برگ و گل آذین بابا آدم بر روی باکتری به ترتیب ۱۰۱ و ۱۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر و بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره اتانولی بود. در مدل حیوانی مشخص گردید که مؤثرترین عصاره علیه سویه‌های مذکور عصاره آبی برگ بابا آدم می‌باشد. در کشت ماکروفاژی و در مدل حیوانی عصاره آبی گل بابا آدم مؤثرترین عصاره بود.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های آبی و آلی باباآدم اثرات ضد میکروبی علیه بروسلا ملی تنسیس درون ماکروفاژی دارند و عصاره آبی بیشترین فعالیت ضد میکروبی بر روی بروسلای داخل ماکروفاژی دارد، لذا این عصاره‌ها در درمان بروسلوز می‌توانند مفید باشند.

کلیدواژه‌ها: ضد میکروبی، بروسلا ملی تنسیس، باباآدم، ماکروفاژ

*نویسنده مسئول: شهرزاد نصیری سمنانی. پست الکترونیک: Sh.nasiri92@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۶ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۸

مقدمه

بروسلوز توسط باکتری‌های جنس بروسلا ایجاد می‌شود که با نام تب مواج، تب مدیترانه‌ای یا تب مالت نیز شناخته می‌شود که یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان بوده و می‌تواند در اثر تماس مستقیم یا غیرمستقیم با حیوانات آلوده یا محصولات آن‌ها به انسان منتقل شود [۱]. علایم بالینی این بیماری غیراختصاصی است و از یک بیماری حاد تب دار تا یک بیماری خفیف و نامشخص بروز می‌نماید. مدت بیماری نیز می‌تواند از چند روز تا چندین سال به درازا بکشد [۲]. شیوع بیماری در سطح جهان مشخص نیست و این ناشی از تفاوت در کیفیت سیستم گزارش دهی و اطلاع رسانی در کشورهای مختلف است. سالانه بیش از نیم میلیون مورد جدید بروسلوز از ۱۰۰ کشور جهان به سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization-WHO) گزارش می‌شود، که قسمت اعظم آن مربوط به کشورهای جهان سوم می‌باشد [۳]. اگرچه برنامه‌های گسترده‌ای برای کنترل این بیماری در بسیاری از کشورها اجرا گردیده ولی تنها در چند کشور این بیماری ریشه کن شده است [۱، ۲]. بروسلاها کوکوباسیل‌های کوچک گرم منفی هستند. چون تا به حال توکسین یا آنزیم‌های سیتولیتیک برای بروسلا شناسایی نشده است این فرضیه مطرح می‌گردد که ویرولانس عوامل این باکتری بیشتر مربوط به قدرت بقای داخل سلولی آن است که هر از چند گاهی باعث باکتریمی و سایر تظاهرات آن می‌شود [۴]. درمان بروسلوز با آنتی‌بیوتیک‌های رایج تنها باعث کاهش درد و عوارض بیماری می‌گردد [۵]. درمان معمول بروسلوز بیشتر ترکیبی از تتراسایکلین خوراکی به همراه استرپتومایسین تزریقی و یا ترکیب ریفامپین خوراکی و تتراسایکلین خوراکی است که به‌جای استرپتومایسین از جنتامایسین هم استفاده می‌شود، با این وجود عود مجدد بیماری در برخی موارد مشاهده می‌گردد. به نظر می‌رسد که فعالیت این داروها علیه بروسلا در داخل سلول‌های میزبان محدود بوده و قادر به ریشه کن کردن کامل عامل بیماری نبوده و هم چنان مشکلات مربوط به کانون‌های خفته عفونت در بدن و بسیاری از موارد مشاهده می‌شود. از این رو با وجود رژیم‌های درمانی چند دارویی، طولانی مدت بودن دوره درمان و شکست‌های درمانی، دانشمندان مجبور به یافتن راه‌های درمانی جدید برای بروسلوزیس شده‌اند [۶، ۷].

باباآدم (*Arctium lappa*) از خانواده Asteraceae گیاهی علفی با برگ‌های بزرگ و ریشه طویل به‌عنوان نوعی از انواع سبزیجات در سرتاسر جهان مورد مصرف خوراکی و دارویی قرار می‌گیرد. ترکیبات شیمیایی فعال و مهم موجود در این گیاه موسیلاژ، اینولین، اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده از جمله: لینولئیک اسید، اولئیک اسید، پالمیتیک اسید، پروپیونیک اسید، میریستیک اسید، استئاریک اسید، ایزووالریک اسید می‌باشد [۸]. باباآدم در طب سنتی در درمان فشار خون بالا، نقرس، تصلب شرایین، هپاتیت استفاده می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که ریشه باباآدم در پاک‌سازی بدن از رادیکال‌های آزاد نقش داشته و هم چنین بر روی کبد اثر حفاظتی دارد. این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی نیز بوده و طی تحقیقاتی در شرایط آزمایشگاهی علیه باکتری‌های گرم منفی اشریشیاکلای، شیگلا فلکسنری و شیگلا سونئی و همچنین ویروس HIV از خود فعالیت قابل توجهی نشان داده است [۹، ۱۰]. هدف از این تحقیق بررسی عصاره‌های آبی- آلی برگ، ریشه و گل آذین‌های باباآدم بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در شرایط آزمایشگاهی، کشت داخل ماکروفاژی و مدل حیوانی می‌باشد.

روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سویه باکتریایی بروسلا ملی تنسیس M ۱۶ از بانک میکروبی مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تهیه شد که قبل از ذخیره سازی در بانک میکروبی تست‌های تأییدی بر روی آن انجام گردیده بود. گیاه باباآدم از حوالی شهرستان زنجان جمع آوری گردید و توسط کارشناسان گیاهی هرباریوم مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان با کد ZAUC00180 مورد تأیید قرار گرفت. گیاه بابا آدم پس از خشک نمودن در شیشه‌های کدر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک تهیه شدند. موش‌های نژاد بالب سی (Balb/c) با سن تقریبی ۶-۸ هفته‌ای و به وزن تقریبی ۵± ۲۵ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و برای سازش با محیط جدید یک هفته در مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان جهت انجام کارهای بعدی نگه داری شد. موش‌ها در طی این مدت با آب و غذای کافی تغذیه می‌شدند. کلیه نکات اخلاقی مربوط به دستورالعمل کار با حیوانات مورد تصویب دانشگاه تربیت مدرس در این مطالعه رعایت گردید.

تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی باباآدم: برگ، ریشه و گل آذین‌های گیاه بابا آدم پس از خشک شدن در سایه با آسیاب برقی پودر و ۱۰۰ گرم از آن جداگانه با آب مقطر، اتانول ۹۵ درصد و استون مطلق به نسبت ۱:۴ وزنی-حجمی مخلوط گردیدند. مخلوط‌های حاصل پس از ۲۴ ساعت با گاز استریل ۴ لایه‌ای صاف و برای جدا کردن ناخالصی‌های موجود در عصاره‌ها، با دور ۲۵۰۰ در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (دستگاه سانتریفوژ یخچال دار مدل ۵۰ ROTIX DA ساخت کمپانی HETTICH) و برای تغلیظ از دستگاه روتاری تقطیر در خلأ استفاده گردید. عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای کارهای بعدی نگه داری شدند [۱۰].

بررسی اثرات ضد میکروبی باباآدم

روش ماکرودایلوشن برای تعیین MIC و MBC: از کلونی‌های

حاصل از کشت‌های ۳ روزه بروسلا بر روی محیط بروسلا آگار (در این حالت باکتری‌ها در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند) در محیط مولر هینتون براث سوسپانسیونی تهیه و برابر ۰/۵ مک فارلند به طریقه مشاهده چشمی در منبع نور، استاندارد شد. کدورت باکتریایی ۰/۵ مک فارلند را به نسبت ۱:۳۰۰ رقیق نموده تا تعداد باکتری‌ها 5×10^5CFU/ml شود [۵]. MIC (Minimum Lethal Concentration) در حقیقت کم‌ترین بازدارنده از رشد یک ماده ضد میکروبی است که اگر عامل ضد میکروبی از محیط حذف شود باکتری‌ها مجدداً قادر به رشد خواهند بود. MBC (Minimum Bactericidal Concentration) به حداقل غلظت ماده ضدمیکروبی گفته می‌شود که بتواند ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را نابود کند. برای تعیین MIC و MBC انواع عصاره‌ها بر روی بروسلا، ابتدا رقت‌های ۱:۲، ۱:۴ تا ۱:۳۲ عصاره در مولر هینتون براث را تهیه و سپس با افزودن ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی، غلظت‌های نهایی عصاره ۱:۴ تا ۱:۶۴ به دست آمد. لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۰-۷ درصد CO_2 تا ۵ روز گرما گذاری و در هر روز کدورت لوله‌ها بررسی ساب کالچری بر روی مولر هینتون آگار نیز کشت داده شد. این بررسی سه بار تکرار و از کنترل مثبت شامل باکتری در محیط فاقد عصاره برای مقایسه کدورت لوله‌های تست استفاده گردید [۵].

روش انتشار چاهکی در آگار: برای بررسی اثر ضد میکروبی رقت‌های مختلف انواع عصاره‌ها بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M از روش انتشار چاهکی در آگار استفاده شد. پس از آماده سازی پلیت هایی محتوی مولر هینتون آگار و حفر چاهک‌هایی به قطر تقریبی ۵ میلی متر بر روی محیط، از سوسپانسیون میکروبی برابر با ۰/۵ مک فارلند بر روی آن کشت داده شد. سپس چاهک‌ها از رقت‌های ۱:۲، ۱:۴ تا ۱:۳۲ عصاره‌های باباآدم به مقدار ۱۰±۸۰ میکرولیتر پر گردیدند. سپس پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۱۰-۷ درصد CO_2 به مدت ۵ روز انکوبه و سپس هاله عدم رشد باکتری‌ها در اطراف چاهک‌ها اندازه گیری شد [۵].

مدل حیوانی: در این تحقیق ۱۵ سر موش BALB/c ماده بالغ به ۵ گروه ۳ تایی تقسیم شدند. گروه‌های ۱ تا ۴ که ۴ عصاره مؤثر باباآدم که پس از تعیین MIC انتخاب به دست آورده شده بود را دریافت نمودند و ۱ گروه باقی مانده که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و به‌جای عصاره، نرمال سالین استریل به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز اول به هر گروه، باکتری بروسلا از کشت ۴۸ ساعته بروسلا ملی تنسیس ۱۶M با کدورت 5×10^5CFU/ml به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز بعد ۱ میلی لیتر از عصاره‌های آبی و آلی به ۴ گروه و نرمال سالین استریل به گروه‌های شاهد به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از ۷ روز، حیوانات بی‌هوش شده و طحال موش‌ها در شرایط استریل خارج و درون ۱۰ میلی لیتر فسفات بافر سالین استریل هموژنیزه شدند. سپس از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام گرفت. پلیت‌های مذکور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۷٪ دی اکسیدکربن گرمخانه گذاری شدند [۱۱].

کشت داخل ماکروفاژی

جمع آوری ماکروفاژهای صفاقی موش: برای افزایش تعداد ماکروفاژهای داخل صفاقی، ۱ میلی لیتر از محیط تایوگلیکولات ۳٪ w/v به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. ۳ روز بعد موش‌ها توسط اتر کشته و پس از ضد عفونی کردن پوست بدن آن‌ها با الکل ۷۰ درجه سانتی‌گراد در زیر هود بیولوژیک و در شرایط کاملاً استریل توسط سرنگ استریل، ۵ میلی لیتر از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) و ۵ واحد هپارین تزریقی به ازای هر میلی‌لیتر محیط به داخل صفاق موش تزریق و پس از تزریق بدون بیرون کشیدن سرنگ چند مرتبه به صفاق ضربه وارد نموده تا سلول‌ها به‌خوبی در محیط تزریق شده غوطه‌ور شوند. سپس مجدداً محیط کشت به داخل سرنگ کشیده شد و بعد از انتقال به لوله‌های استریل در دور g ×۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصله یک بار با RPMI 1640 هپارینه حاوی ۱۰٪ FCS شستشو شد [۱۲].

تعیین درصد زنده ماندن سلول‌ها: برای تعیین درصد سلول‌های زنده از رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد. در این رنگ آمیزی سلول‌های مرده به رنگ آبی در می‌آیند و سلول‌های زنده تا ۳ دقیقه در برابر نفوذ پذیری رنگ به درون سلول از خود مقاومت نشان می‌دهند. بنابراین شمارش سلول‌ها باید در مدت زمان ۳ دقیقه انجام بگیرد. یک قطره از رنگ را روی لام ریخته و یک قطره از سوسپانسیون سلولی را به آن اضافه و در زیر میکروسکوپ نوری درصد سلول‌های زنده با شمارش و فرمول زیر محاسبه شد [۱۳].

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{تعداد سلول زنده‌های}}{\text{تعداد سلول زنده‌های + تعداد سلول مرده‌های}} \times ۱۰۰$$

شمارش ماکروفاژها: برای به دست آوردن میانگین تعداد ماکروفاژها در هر میلی لیتر محیط شمارش ماکروفاژها انجام شد. برای شمارش از پیپت شمارش گلبول‌های سفید استفاده شد. تا عدد یک پیپت را از سوسپانسیون سلولی پر نموده و بقیه با محلول نوترال رد پر گردید که در این حالت میزان رقت ۱:۲۰ خواهد بود. پس از ۱۰ دقیقه پیپت را به‌آرامی تکان داده و بعد از دور ریختن چند قطره اول، یک قطره را در گوشه لامل روی لام توما قرار داده و برای شمارش از قسمت شمارش گلبول قرمز استفاده و پنج خانه که شامل ۴ خانه در گوشه و خانه وسطی را مورد شمارش قرار داده و با فرمول زیر تعداد سلول‌ها محاسبه گردید [۴].

$$X = \frac{\text{تعداد سلول‌های شمارش شده} \times ۱۰^۶}{۲۰}$$

بررسی اثر عصاره‌ها بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا: پس از جدا سازی ماکروفاژهای صفاقی ($۲/۷\times۱۰^{۳}$ ماکروفاژ در هر چاهک) و انتقال به میکروپلیت‌های کشت سلولی به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد گرما گذاری شدند. سپس باکتری بروسلا ملی تنسیس M ۱۶ به پلیت‌ها اضافه شد تا مقدار باکتری‌ها برابر با ۵×۱۰^{۵} CFU/ml شود. بعد از ۲ ساعت گرما گذاری در شرایط ذکر شده، بلع باکتری‌ها توسط ماکروفاژها با تهیه گسترش از چاهک‌های پلیت بر روی لام و رنگ آمیزی گیمسا بررسی و تأیید گردید. برای حذف باکتری‌های خارج سلولی جنتامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به چاهک‌ها اضافه و یک ساعت در شرایط ذکر شده گرماگذاری گردید. پس از حذف باکتری‌های خارج سلولی از محیط کشت سلولی بر روی آگار کشت و بعد از تعویض محیط کشت سلولی به‌آرامی به همراه رقت‌های عصاره‌ها با کنترل مثبت (چاهک فاقد عصاره که به‌جای عصاره به آن نرمال سالین اضافه می‌شود) گرماگذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، ماکروفاژها لیز و از درون چاهک‌ها جمع آوری و کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با ۷-۵ درصد CO2 به مدت ۵ روز گرماگذاری و پس از این مدت تعداد باکتری‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها مورد شمارش قرار گرفته شد [۱۴، ۱۵]. در انتها درصد ماکروفاژهای زنده در ۲۴ ساعت بعد از مواجهه با رقت‌های مختلف عصاره‌ها و تعداد کلونی‌های رشد کرده باکتری‌ها بعد از لیز ماکروفاژها برای هر چاهک جداگانه محاسبه و میانگین آن برای هر گروه به کمک نرم افزار SPSS و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند. سطح معنی دار بودن یافته‌ها P<۰/۰۱ تلقی گردید.

تحلیل آماری:

به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل، تست کروسکال والیس در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمون P< ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

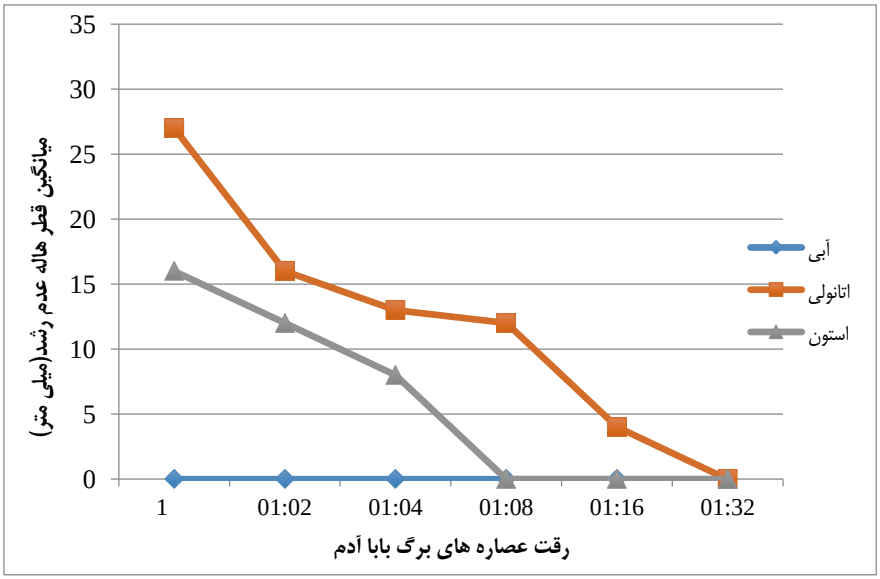
MIC و MBC مؤثرترین MIC و MBC بر روی بروسلا آبورتوس M ۱۶ عصاره اتانلی برگ و گل آذین بابا آدم است (جدول ۱).

انتشار چاهکی در آگار نتایج نشان می‌دهند که میزان اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها با کاهش غلظت آن‌ها به طرز معنی داری کاهش می‌یابد و اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی نسبت به عصاره استونی و آبی برگ بیشتر بوده و اثر ضد میکروبی عصاره‌های آلی نسبت به عصاره آبی برگ به‌طور معنی داری بیشتر است (نمودار ۱).

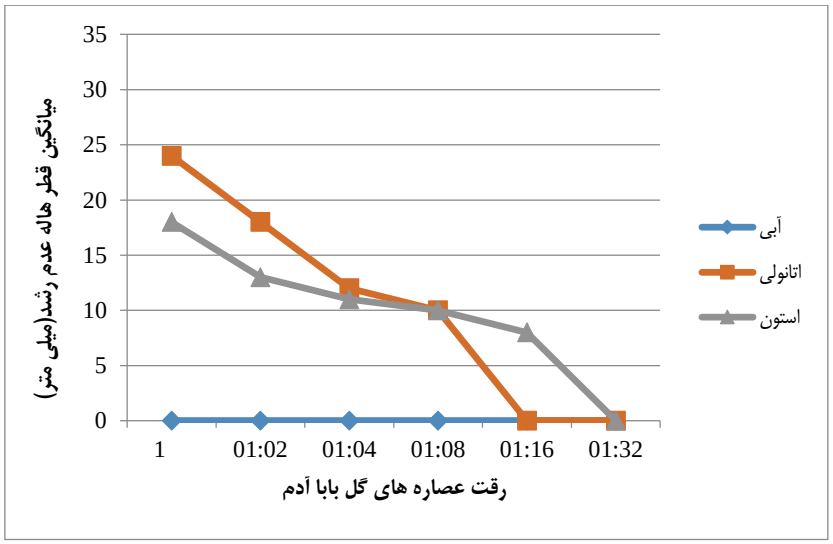
در بررسی اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی گل بابا آدم بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M مشخص گردید که عصاره آبی در این مورد نیز بی‌تأثیر بوده ولی عصاره‌های اتانولی و استونی اثر مهاری بر رشد باکتری داشته است و تأثیر عصاره اتانولی در سطح معنی P≤۰/۰۵ بیشتر است (نمودار ۲).

جدول ۱. MIC و MBC عصاره‌های باباآدم بر روی بروسلا آبورتوس ۱۶M بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

اندام گیاه / عصاره (mg/ml)	برگ			گل آذین			دانه		
	آبی	اتانولی	استنی	آبی	اتانلی	استنی	آبی	اتانلی	استنی
MIC	۵۴۲	۱۰۱/۸۷۵	۱۰۹/۵	۲۵۹	۱۱۶/۲۵	۲۰۰	۲۵۹	۲۲۲	۴۱۹
MBC	۵۴۲	۲۰۳	۲۱۹	۵۱۹/۵	۲۳۲/۵	۴۰۰	۲۵۹	۲۲۲	۴۱۹



نمودار ۱. قطر هاله عدم رشد سویه ملی تنسیس ۱۶M تحت تیمار با عصاره‌های آبی و آلی برگ باباآدم بر حسب میلی متر



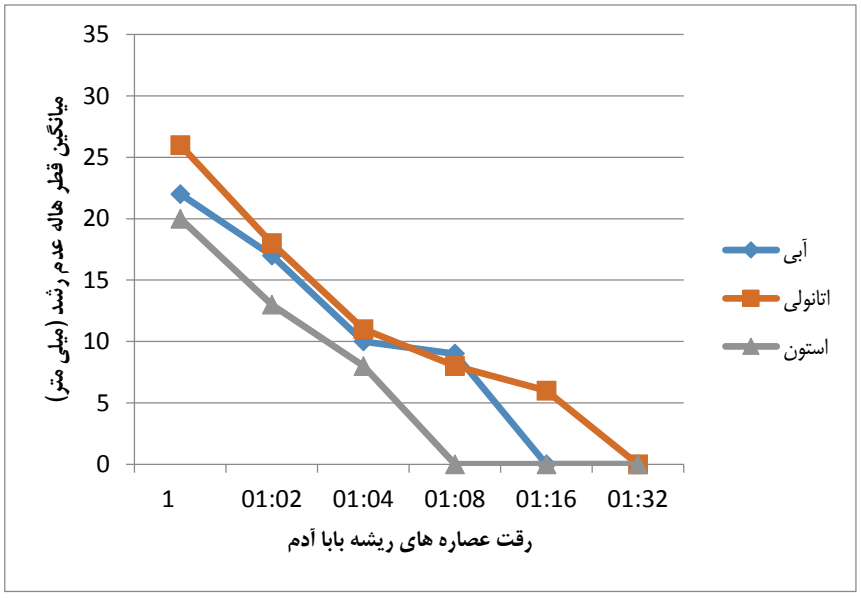
نمودار ۲. قطر هاله عدم رشد سویه ملی تنسیس ۱۶M تحت تیمار با عصاره‌های آبی و آلی گل باباآدم بر حسب میلی متر

در بررسی اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی ریشه بابا آدم بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M مشخص نمود که بر خلاف نتایج قبلی، عصاره آبی ریشه همانند عصاره‌های آلی اثر مهاری بر رشد بروسلا داشته است (نمودار ۳).

مدل حیوانی با توجه به نتایج مشخص گردید که مؤثرترین عصاره در مدل حیوانی علیه سویه مذکور عصاره آبی برگ بابا آدم می‌باشد.

آنالیز آماری نتایج به دست آمده در سطح احتمال P<۰/۰۵ نشان می‌دهد که اختلاف معنی داری بین کلیه گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود دارد (جدول ۲).

شمارش تعداد ماکروفاژهای صفاقی موش پس از جداسازی ماکروفاژهای صفاقی از موش، میانگین کلی محاسبه شده برای تعداد ماکروفاژها ۲/۶ ×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد.



نمودار ۳. قطر هاله عدم رشد سویه ملی تنسیس ۱۶M تحت تیمار با عصاره‌های آبی و آلی ریشه باباآدم بر حسب میلی متر

جدول ۲. میانگین اثر عصاره‌های باباآدم بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در مدل حیوانی بر روی تعداد باکتری‌های رشد یافته از طحال موش‌های آلوده

اندام	نوع عصاره گیاهی	تعداد باکتری بروسلا ملی تنسیس M16
برگ	آبی	۷×۱۰^۴*
برگ	استونی	۸/۸×۱۰^۴*
گل	آبی	۴/۲×۱۰^۵*
ریشه	آبی	۴×۱۰^۵*
کنترل	نرمال سالین	۸/۶×۱۰^۱۴

* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با P<۰/۰۵

بررسی اثر عصاره‌های باباآدم بر روی ماکروفاژها: نتایج این بررسی نشان می‌دهد که به‌جز رقت ۱:۲ عصاره‌ها بقیه رقت‌ها اثر مهاری بر روی ماکروفاژهای صفاقی را ندارند (جدول ۳).

کشت داخل ماکروفاژی بروسلا: بررسی آماری این نتایج در سطح احتمال P<۰/۰۵ نشان می‌دهد که اختلاف معنی داری بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود دارد و مابین عصاره‌های مختلف مؤثرترین عصاره در بقای درون ماکروفاژی بروسلا عصاره‌های آبی گل بابا آدم (۲۵٪) می‌باشند (جدول ۴).

جدول ۳. مقایسه میانگین و انحراف معیار درصد ماکروفاژهای زنده در زمان صفر و ۲۴ ساعت بعد از تماس با عصاره‌های باباآدم

رقت عصاره	عصاره آبی ریشه	عصاره آبی گل	عصاره استونی برگ	عصاره آبی برگ
بدون عصاره در زمان صفر	۸۲±۷	۸۲±۱	۸۴±۲	۸۱±۶
کنترل (بدون عصاره) ۲۴ ساعت بعد	۷۸±۶	۷۹±۲	۷۷±۲	۷۷±۵
۱:۲ عصاره ۲۴ ساعت بعد	۳۸±۵*	۲۱±۳*	۲۳±۲*	۲۵±۳*
۱:۴ عصاره ۲۴ ساعت بعد	۷۵±۷	۷۸±۴	۷۵±۲	۷۲±۳
۱:۸ عصاره ۲۴ ساعت بعد	۷۶±۳	۷۸±۱	۷۶±۲	۷۴±۴
۱:۱۶ عصاره ۲۴ ساعت بعد	۷۷±۲	۷۸±۵	۷۶±۵	۷۶±۳

* نشان دهنده اختلاف معنی دار با سایر رقت‌های عصاره‌ها با P<۰/۰۵

جدول ۴. میانگین و انحراف معیار تعداد باکتری بروسلا درون ماکروفاژی رشد کرده بر روی محیط آگاردار بعد از لیز ماکروفاژها بر حسب CFU/ml بعد از تیمار با عصاره‌های باباآدم

رقت / عصاره	کنترل	۱:۴	۱:۸	۱:۱۶
اتانولی دانه	(۴۵±۲)×۱۰^۴	* (۱۴±۲)×۱۰^۲	* (۲۸±۱)×۱۰^۳	* (۴۱±۲)×۱۰^۴
اتانلی گل آذین	(۴۶±۱)×۱۰^۴	* (۲۶±۲)×۱۰^۳	* (۴۷±۲)×۱۰^۳	* (۴۴±۱)×۱۰^۴
اتانولی برگ	(۴۶±۲)×۱۰^۴	* (۲۷±۲)×۱۰^۳	* (۳۶±۱)×۱۰^۳	* (۲۳±۲)×۱۰^۴
استنی برگ	(۴۰±۴)×۱۰^۴	* (۲۰±۱)×۱۰^۳	* (۳۲±۲)×۱۰^۳	* (۱۷±۲)×۱۰^۴

* نشان دهنده اختلاف معنی دار با سایر رقت‌های عصاره‌ها با P<۰/۰۵

بحث

با توجه به مشکلات و بالا بودن میزان بروسلوز در ایران، یافتن مواد جدید ضد میکروبی که بتواند بر بروسلای درون فاگوسیتی اثر کند و اثرات ناخواسته را نداشته باشد، ضروری به نظر می‌رسد. گیاه باباآدم یکی از گیاهان دارویی شناخته شده‌ای است که در طب سنتی مورد توجه بوده و با داشتن خواص ضد قارچی، درمان کننده نقرس، فشار خون، تصلب شرایین، هپاتیت و درمان ناهنجاری‌های التهابی، مورد مصرف قرار می‌گرفته است [۱۶]. نتایج MIC و MBC عصاره‌های باباآدم با روش ماکرودایلوشن در محیط کشت مولر هینتون براث نشان می‌دهد که در غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی- آلی رشد و تکثیر بروسلا ملی تنسیس ۱۶M مهار می‌شود. در مورد نتایج MIC مشخص شده که مواد با خاصیت ضد میکروبی در برگ نسبت به گل و ریشه این گیاه، بیشتر یافت می‌گردند ولی با مقایسه سه عصاره در هر سه اندام مورد مشاهده گردیده که MIC عصاره‌های آبی کمتر از عصاره‌های آلی می‌باشد که خود می‌تواند به این معنا باشد که حلال آبی نسبت به حلال‌های آلی در اندام‌های مختلف گیاه باباآدم قابلیت جداسازی کمتری داشته و ترکیبات مؤثره ضد میکروبی در این گیاه بیشتر چربی دوست هستند. عصاره آبی ریشه بابا آدم نیز بر رشد بروسلا اثر مهاری خوبی اعمال کرده است، عصاره استونی نیز چنین اثر مهاری از خود نشان داده و عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و استونی ریشه بابا آدم اثر قوی‌تری در مهار بروسلا از خود نشان داده است.

ویانا و همکاران در سال ۲۰۰۵ با روش انتشار در آگار بر روی اثرات ضد باکتریایی برگ گیاه باباآدم گزارش نمود که عصاره آبی این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های یافت شده در عفونت‌های حفره میانی دندان از جمله انتروکوکوس فکالیس و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. نتایج حاصل از آن نشان دهنده فعالیت ضد باکتریایی خوب عصاره آبی گیاه بابا آدم می‌باشد که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر که اثر خوب عصاره‌های آبی گیاه بابا آدم را نشان می‌دهد، مطابقت دارد ولی برخلاف نتایج این پژوهش، عصاره آبی برگ اثر ضد باکتریایی در مدل حیوانی، ماکرودایلوشن و کشت ماکروفاژ نتایج قابل توجهی داشته و در روش انتشار چاهکی مؤثر نبوده است [۱۰]. طی مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۰ توسط عبدالله زاده و همکاران در مورد فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های اوکالیپتوس انجام شد مشخص گردید که این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه بروسلا ملی تنسیس ۱۶M و بروسلا آبورتوس S۹۹ می‌باشد. در این مطالعه مشخص شد که عصاره اتانولی این گیاه مؤثرتر از عصاره‌های آبی و استونی این گیاه است که این نتیجه با یافته‌های ما مطابقت نشان می‌دهد [۱۷]. در اکثر موارد مشخص شده که حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقابل ترکیبات ضد باکتریایی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر است که ممکن است به خاطر وجود غشای خارجی در ساختمان دیواره سلولی‌شان باشد. اثر مواد ضد میکروبی در غلظت کشنده ممکن است مستقیماً بر غشاء (نفوذپذیری و ساختار غشا)

یا بر متابولیسم سلول باشد. هم چنین به نظر می‌رسد مقاومت سلول‌های باکتریایی بستگی به‌سرعت و میزان حل شدن مواد ضد باکتریایی در بخش لیپیدی غشاء سلولی دارد. اگرچه این مسئله نمی‌تواند توضیح کاملی برای شرح اختلاف در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی باشد به همین علت اختلاف در آب گریزی سطح سلول نیز به‌عنوان یک عامل مؤثر پیشنهاد گردیده است. اما در برخی مطالعات به حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقابل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دست یافته‌اند [۱۸].

در بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های در شرایط In vivo مشخص گردید که اختلاف معنی داری بین گروه‌های آزمون با گروه کنترل وجود داشته و از میان انواع عصاره‌های آبی – آلی عصاره‌های آبی و استونی برگ بابا آدم اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها دارا هستند. با توجه به این نتایج مشخص می‌شود کمترین MIC مربوط به عصاره استونی برگ بابا آدم بود که این نتایج با نتایج شرایط In vivo هم خوانی دارد. مهدوی و همکاران نیز در مطالعات خود نشان دادند که عصاره اتانولی و استونی رازک و کاکوتی کوهی مؤثرترین عصاره علیه سالمونلا تیفی در مدل حیوانی می‌باشند [۱۹]، که این نتیجه با نتایج ما در مورد در مورد گیاه بابا آدم اندکی تفاوت دیده می‌شود و عصاره آبی برگ بابا آدم مؤثرترین عصاره این گیاه علیه بروسلا در مدل حیوانی می‌باشد که احتمالاً این امر به دلیل ویژگی‌های خاص گیاه بابا آدم و حل شدن بهتر مواد ضد باکتریایی آن در آب می‌باشد.

در بررسی اثر عصاره‌ها بر روی ماکروفاژها اطلاعات نشان می‌دهند که عصاره‌ها در رقت ۵۰٪ اثر مهاری زیادی را بر روی سلول‌ها از خود نشان می‌دهند و در حقیقت به دلیل زیاد بودن غلظت عصاره‌ها درصد زیادی از ماکروفاژها بعد از ۲۴ ساعت از بین می‌روند. در رقت‌های ۲۵–۶٪ این اثر مهاری مشاهده نمی‌شود و در حقیقت این بررسی مشخص کرد که ما می‌توانیم از رقت‌های ۲۵٪ و رقیق‌تر از آن برای انجام تحقیق اصلی خود (بررسی اثر عصاره بر بقای داخل ماکروفاژهای بروسلا) استفاده نماییم. هم چنین این یافته‌ها نشان دادند که در رقت‌های MIC و MBC عصاره‌ها بر روی باکتری بر روی ماکروفاژها اثر مهاری ندارند و می‌توان از رقت‌های MIC و MBC حتی در حالتی که باکتری در داخل ماکروفاژ است استفاده کرد. شاپوری و همکاران نیز نشان دادند که عصاره کلروفرمی سیر در رقت‌های کم‌تر از ۵٪ اثر منفی بر روی ماکروفاژها ندارد [۲۰].

نتایج مشخص می‌کند که اثر عصاره‌ها بر کاهش بقای درون ماکروفاژی بروسلا و مابین عصاره‌های مختلف مؤثرترین عصاره در بقای درون ماکروفاژی بروسلا عصاره‌های آبی گل باباآدم (۲۵٪) می‌باشند. بنابراین مؤثر بودن عصاره‌ها بر بروسلا در حالت درون ماکروفاژی با این تحقیق تأیید می‌شود.

شاپوری و همکاران اثر عصاره کلروفرمی سیر را بر روی فعالیت ماکروفاژی صفاقی موش Balb/c مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که آلیسین موجود در سیر در رقت‌های مشخص باعث حذف بروسلاهای داخل ماکروفاژی می‌شود. آن‌ها هم چنین نشان دادند که ترکیبات موجود در سیر باعث تحریک و افزایش عملکرد لنفوسیت‌های T – می‌شود [۶]. در سال ۱۳۹۰ عبدالله زاده و همکاران اثر عصاره‌های اوکالیپتوس را بر روی بقای درون ماکروفاژی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M و بروسلا آبورتوس S۹۹ مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات آن‌ها نیز نشان داد که عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی برگ اکالیپتوس در رقت‌های مختلف باعث کاهش چشمگیر بروسلاهای درون ماکروفاژی می‌شود که این نتایج با نتایج ما مطابقت نشان می‌دهند [۱۷]. پیشنهاد می‌شود محققان در آینده اثرات جانبی و سو عصاره‌های بابا آدم را در مدل حیوانی بررسی نمایند تا بتوان از عوارض جانبی احتمالی این عصاره‌ها آگاهی حاصل نمود.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این بررسی نشان داد که عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی استخراج شده از باباآدم در هر سه شرایط In vitro، In vivo و Cell culture دارای فعالیت ضد باکتریایی و باکتری کشی علیه بروسلا می‌باشند. عصاره آبی آن دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بر علیه بروسلا نشان داده است.

تقدیر و تشکر: نویسندگان در پایان از زحمات و همکاری‌های مسئولین مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Godfroid J, Kasbohrer A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):135-45.
2. Moreno E. Brucellosis in Central America. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):31-8.
3. World Health Organization. Brucellosis Fact sheet N173 [internet]. 1997.
4. Gorvel JP, Moreno E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):281-97.
5. Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE, Garcia-Rodriguez JA, Montes Martinez I. In vitro activities of five new antimicrobial agents against Brucella melitensis. Int J Antimicrob Agents. 1999;12(2):185-6.
6. Murray PR. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002. 826 p.
7. Solera J, Espinosa A, Martinez-Alfaro E, Sanchez L, Geijo P, Navarro E, et al. Treatment of human

brucellosis with doxycycline and gentamicin. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(1):80-4.
8. Kemper J. The Longwood herbal task force: Burdock (Arctium lappa) Clinical Information Summary [internet]. 1999 [updated 21 Sep 1999; cited 11 Jun 2016]. Available from: http://www.longwoodherbal.org/burdock/burdock.cis.pdf.
9. Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. Evaluation of the immunostimulatory activity of Ziziphora tenuior extracts. Comp Clin Path. 2009;19(5):459-63.
10. Pereira JV, Bergamo DC, Pereira JO, Franca Sde C, Pietro RC, Silva-Sousa YT. Antimicrobial activity of Arctium lappa constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. Braz Dent J. 2005;16(3):192-6.
11. Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host immune response against Brucella abortus: what the mouse model has revealed about control of infection. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):367-82.
12. Sun YH, Den Hartigh AB, Santos RL, Adams LG, Tsolis RM. virB-Mediated survival of Brucella abortus in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages. Infect Immun. 2002;70(9):4826-32.
13. Naroeni A, Porte F. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of Brucella suis in murine macrophages. Infect Immun. 2002;70(3):1640-4.
14. Neves RDF, Moreno SRF, Rebello BM, Caldas LQDA, Fonseca ADSD, Bernardo-Filho M, et al. Effect of an Arctium lappa (burdock) extract on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the morphology of the red blood cells. Braz Arch Biol Techn. 2007;50(spe):167-74.
15. Pei J, Turse JE, Ficht TA. Evidence of Brucella abortus OPS dictating uptake and restricting NF-kappaB activation in murine macrophages. Microbes Infect. 2008;10(6):582-90.
16. Abdolahzade P, Shapouri R, Nasiri Semnani Sh. Antibacterial effects of Eucalyptus globules extracts on Brucella melitensis M16 and Brucella abortus S99 In vitro and In vivo. J Ardabil Univ Med Sci. 2011;11(3):218-27. Persian.
17. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Lakshmana Perumalsamy P. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. J Ethnopharmacol. 2001;74(3):217-20.
18. Alizadeh H, Rahnema M, Semnani SN, Hajizadeh N. Detection of compounds and antibacterial effect of Quince (Cydonia oblongaMiller) extracts in vitro and in vivo. J Biologically Active Prod From Nat. 2013;3(5-6):303-9.
19. Shapoury R, Satari M, Zoheyr M. Antimicrobial effect of choloroformic extract of Garlic (Allicin) on brucella melitensis (Rev 1) & brucella abortus (S19). Daneshvar Med. 2004;12(53):21-4. Persian.
20. Shapouri R, Rahnema M. Evaluation of antimicrobial effect of hops extracts on intramacrophages Brucella abortus and B. melitensis. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(1):S51-S8.