ارزیابی اثر ضدمیکروبی نانوذره اکسید مس به همراه عصاره گون و سیر بر روی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در مدل موشی

زهره زمانیان[۱]، الهه تاج‌بخش[۲*]، نازیلا ارباب سلیمانی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

*نویسنده مسئول: ee_tajbakhsh@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۵/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۱۰

چکیده

بیماری سل، ازجمله مشکلات بهداشتی عمده در سراسر جهان است. هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره‌ی سیر و گون حاوی نانوذره اکسید مس بر *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در مدل موشی بود. این مطالعه، در بازه زمانی شش‌ماهه در سال ۱۴۰۱، در شرکت سبلان دارو و آزمایشگاه سل شهرستان نهاوند، انجام شد. پس از عصاره‌گیری و سنتز نانوذرات، حساسیت سویه‌ها نسبت به مخلوط مورد مطالعه با استفاده از حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی، سنجیده شد. پس از اطمینان از القای بیماری، ۲۰ موش‌نژاد ویستار تحت درمان، به مدت ۲۱ روز، مخلوط عصاره‌ی سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس را به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، دریافت کرده و با تست توبرکولین ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که باکتری نسبت به مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذره‌ی اکسید مس حساسیت مطلوبی دارد و در گروه دریافت‌کننده مخلوط عصاره‌های مورد استفاده، در نیمی از موش‌ها، تست توبرکولین منفی گردید. بر اساس یافته‌های حاصله، خاصیت سینرژیستی ترکیب عصاره سیر و گون که حاوی نانوذرات اکسید مس است، اثربخشی امیدوارکننده‌ای در کاهش عفونت سل نشان داد و به‌عنوان یک راهکار بالقوه برای مداخلات ضدسل مطرح می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سل، عصاره سیر، عصاره گون، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، نانوذرات اکسید مس

مقدمه

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، باکتری میله‌ای شکل و از خانواده مایکوباکتریاسه است که عامل بیماری سل در انسان است که با ورود باکتری به نام *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، به دستگاه تنفس ایجاد می‌شود (۱). سل، یک بیماری عفونی بسیار مسری است که انتشار جهانی دارد و به‌راحتی قابل‌انتقال از شخصی به شخص دیگر است. هرچند بسیاری از این عفونت‌ها به‌صورت نهفته هستند، ولی حدود یک‌دهم آن‌ها درنهایت، به سل آشکار تبدیل می‌شوند و اگر بدون معالجه رها شوند بیش از نیمی از آن‌ها، منجر به مرگ می‌شود (۲). تست توبرکولین به‌عنوان یک تست تشخیصی برای سنجش ابتلا به این بیماری مطرح است، اما این تست دارای واکنش‌های متقاطع در افراد آلوده به مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس و افرادی که واکسن BCG دریافت کرده‌اند، می‌باشد، لذا تزریق واکسن فوق در بدو تولد به کودک، تشخیص بیماری را دچار مشکل می‌کند (۴، ۳). *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، توانایی تولید بسیاری از عوامل کلاسیک ایجادکننده عفونت، مانند: توکسین، کپسول و فیمبریه را ندارد و درعین‌حال این باکتری، متفاوت از دیگر باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی است و دارای لیپیدها و گلیکولیپیدهای خاص خود شامل مایکولیک اسید، لیپوآرابینوماناان، تری هالوزدی مایکولات و سولفاتیدها می‌باشد (۵، ۶) با توجه به این‌که این باکتری نه فقط ریه‌ها، بلکه سایر اعضای بدن مانند پوست، حنجره، استخوان، روده و... را مورد هجوم قرار می‌دهد، بیماری

سل به دو دسته سل ریوی و سل خارج ریـوی تقسـیم می‌شود. سل خارج ریوی بسته به این‌که کدام عضـو از بدن را درگیر کند، به نام همان عضو یا نامی مرتبط بـا آن شـناخته می‌شـود (۸، ۷). اپیـدمی عفونـت ایـدز موجب افزایش تعداد موارد سل به‌خصوص در آفریقـا و آسـیای جنـوب شـرقی گردیـده اسـت. در بسـیاری از کشورهای صنعتی نیز، موارد سل رو به افـزایش اسـت (۹). در حقیقت، سل مقـاوم بـه دارو، در حـال تبـدیل شدن به یک معضل بهداشتی اسـت و در شـروع قـرن ۲۱، مقاومـت دارویـی بـه‌عنوان یکـی از عوامـل مهـم مرگ‌ومیر در بیماران مسـلول بـه شـمار می‌آیـد (۱۱، ۱۰). گیاهان و مشتقات آن‌ها، از گذشته تاکنون بـرای درمان بیماری‌های عفونی، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اسانس‌ها و عصاره‌های حاصل از گیاهان دارویی ضـمن دارا بـودن ترکیبـات ضـدباکتریایی، ضدسـرطانی و آنتی‌اکسـیدان بـه‌عنوان ترکیبـات دارویـی جدیـد و طبیعـی در زمینـه بهداشـت و درمـان بیماری‌هـا، از اهمیت. خاصی برخوردار می‌باشند. گیـاه گـون بـا نـام علمی *Astragalus tragacantha*، گیاهی چندسـاله از خانواده لگومینوزه[1] دارای چندین سـاقه، بـه ارتفـاع ۱/۵ تـا ۲ متـر اسـت. جـنس*Astragalus*، در ایـران دارای حدود ۸۰۰ گونه گیاه بوته‌ای یـک یـا چندسـاله است که بسیاری از آن‌ها، فقط در ایران یافت می‌شوند و به همراه گونه‌های درمنه، بخش عظیمـی از پوشـش گیـاهی ایـران را تشـکیل می‌دهنـد. ریشـه گـون به‌واسطه‌ی مهار تولید رادیکال‌های آزاد، افزایش سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کـاهش پراکسیداسـیون لیپیدها، دارای اثرات آنتی‌اکسـیدانی اسـت (۱۳، ۱۲). ریشه گون با افزایش اثرات اینترفرون‌ها، افزایش میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgA در ترشحات بینـی، بهبـود پاسـخ مونوسـیت‌هـا و تحریـک تولیـد لنفوسـیت‌هـا، سیستم ایمنی را تحریک می‌کنـد (۱۵، ۱۴). بـه نظـر می‌رسد دوزهای پایین‌تر از ۲۸ گـرم در روز، می‌توانـد سیسـتم ایمنـی را تحریـک و دوزهـای بـالاتر از آن سیستم ایمنی را مهار کند (۱۵). ریشه گون در مـوارد نقص ایمنی می‌تواند عملکرد سیستم ایمنی را حفظ یا بازسازی کند (۱۶، ۱۵). همچنین تجویز داخل وریدی عصاره ریشه گون تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های پیشرو[2] را افزایش می‌دهد (۱۶). سیر گیاهی از راسته مارچوبه‌سانان[3]، از تیره نرگسـیان و زیر تیره پیازیان[4] و سرده‌ی سیر[5] است. این گیـاه در درمان بیماری‌های بسیاری، ازجمله بیماری‌های قلبی، کلسـترول خـون، ورم مفاصـل، تـب، سـرفه و سـردرد اسـتفاده مـی‌شـود (۱۷، ۱۶). در ایـن گیـاه، برخـی از ترکیبات گوگردی وجود دارد کـه مهم‌تـرین جـزء آن، آلیسین نام دارد. این ترکیب عوامل بیماری‌زا را تحـت تـأثیر قـرار داده و باعـث درمـان بیماری‌هـا می‌شـود (۲۰-۱۸). پژوهش‌های مختلف نشـان می‌دهـد کـه در آلیسین ترکیبی به نام تیوسولفونات وجود دارد که بـه پروتئین، متصل شده است (۲۰). نتایج مطالعات نشان داده است که نـانوذرات فلـزی بـه‌ویژه نـانوذرات مـس برخی از تعاملات را بـرای آزاد شـدن یون‌هـای فلـزی دارنـد کـه بـا فرآینـدهای تکثیـر DNA، تشـکیل سـلول‌های جنبشـی، تقسـیم سـلولی و... از میکروارگانیسم‌های خاصی نظیر باکتری‌ها که منجر به اثر ضدمیکروبی می‌شـود، مداخلـه می‌کنـد. مکانیسـم عمل نانوذرات مس به‌وسیله تعامل آنزیم‌ها و گروه‌های سولفیدریل ایجادکننده آسـیب در DNA و بـه دلیـل تولید فشار اکسیداتیو، رخ می‌دهـد. پژوهش‌هـا نشـان داده است که نانوذرات توانایی لازم در مقابله با سـل را دارند (۲۲، ۲۱). درمجموع، می‌توان چنین بیـان نمـود که به دلیل عدم وجود درمان‌های قطعی برای بیمـاری سـل و مقاومت‌هـای روزافـزون ایجـاد شـده توسـط داروهای رایج، لزوم مطالعه در خصـوص یـافتن داروی مناسب درمان‌کننـده بیمـاری سـل بـا منشـأ گیـاهی اهمیت خود را بیش از پیش نمایـان نمـوده اسـت. بـا

1 Leguminoseae

2 Progenitor
3 Asparagales
4 Alliaceae
5 *Allium*

توجه به اثرگذاری سیر، گون و نانوذرات بر باکتری‌ها، یک نانوکامپوزیت تهیه شده از این مواد ممکن است روی بیماری ایجادکننده سل اثرات منفی داشته باشد. لذا این مطالعه باهدف ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره سیر و گون حاوی نانوذره اکسید مس بر روی *مایکوباکتریوم توبر کلوزیس* انجام شد.

روش کار

جمع‌آوری و شناسایی گیاهان

گیاهان مورد استفاده در این تحقیق، از عطاری معتبر تهیه گردیدند و با استفاده از مجموعه کتب فلور گیاهی ایران و نمونه موجود در هرباریوم گیاهان دارویی بخش تحقیقات گیاهان دارویی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان با کد ۸۳۱۳۰۱ مورد شناسایی و تطبیق، قرار گرفتند و پس از اطمینان از صحت انتخاب، خشک شدند. سپس در شرایط سایه در دمای ۲۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد، قسمت‌های ذکر شده هرکدام از گیاهان، جدول (۱)، به‌وسیله آسیاب‌برقی به شکل پودر تبدیل شد (۱).

جدول ۱- مشخصات گیاهان دارویی مورداستفاده در تحقیق

نام فارسی	نام علمی	خانواده	اندام مورداستفاده	نوع عصاره
گون	*Astragalus tragacantha*	Leguminoseae	گل	هیدرو الکلی
سیر	*Allium sativum*	Asparagales	غده	هیدرو الکلی

عصاره‌گیری

گیاهان سیر و گون به‌صورت جداگانه بعد از خشک شدن در دمای ۲۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور خورشید به‌وسیله آسیاب‌برقی (پارس خزر، ایران) به‌صورت پودر تهیه شدند. ۱۰۰ گرم از پودر تهیه شده هر گیاه، جداگانه الک و در داخل بشر ریخته و به ازای هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. پس از افزودن گاز آرگون، درب بشر بسته و در شیکر (فن‌آوران سهند آذر، ایران)، به مدت ۲۴ ساعت، قرار داده شد. سپس شیشه به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (MG48b LG، کره جنوبی) قرارگرفته و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. رسوبات در ظروف شیشه‌ای قهوه‌ای‌رنگ در یخچال، نگهداری شد. جهت تهیه مخلوط عصاره سیر و عصاره گون، پودر گیاه سیر و گون به نسبت وزنی ۱:۱ مخلوط و ۵۰۰ گرم از مخلوط در یک بشر ۲/۵ لیتری ریخته شد. مقدار ۱۰۰۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۶٪ و حدود ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، به نمونه افزوده شد به‌طوری‌که الکل و آب مقطر کل گیاه خشک را آغشته نمود. پس از هم زدن، درب بشر با سلفون بسته شد و در دستگاه شیکر انکوباتور (FSA، ایران) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه، قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها از دستگاه خارج کرده و بلافاصله به یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، منتقل شدند. پس از ۵ ساعت دوباره به شیکر انکوباتور منتقل کرده و با شرایط قبل قرار

داده شد. پس از ۲۴ ساعت، مجدداً نمونه‌ها را خارج کرده و به یخچال ۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده تا حداکثر استخراج مواد مؤثره وجود داشته باشد. بعد از ۵ ساعت عصاره به‌دست‌آمده، از صافی عبور داده شد تا گیاه خشک و عصاره به‌طور کامل جدا گردد. سپس در دو مرحله (هر بار نصف) عصاره را در دستگاه سوکسله به مقدار ۷۵۰ میلی‌لیتر ریخته و در حرارت ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه حرارت داده شدند تا الکل اضافی از عصاره خارج شده و عصاره خالص در دستگاه باقی بماند. درنهایت از ۵۰۰ گرم ماده خشک، حدود ۶۰ میلی‌لیتر عصاره خالص، به دست آمد.

سنتز نانوذره اکسید مس

به ۴۰۰ میلی‌لیتر مخلوط عصاره سیروگون، ۵/۲ گرم سولفات مس اضافه کرده و به مدت یک ساعت بر روی هیتر مغناطیسی هم زده شد. میزان pH به میزان ۹، رسانده شد. بعد از آن با استفاده از مولتی‌متر (AZ، کره جنوبی)، میزان پتانسیل احیاء اندازه‌گیری شد. سپس محلول، به مدت ۵ دقیقه در توان ۳۶۰ درون مایکروویو (LG، کره جنوبی) قرار گرفت. پس از خارج کردن از مایکروویو، روی ظرف پارافیلم کشیده و جهت خنک شدن به داخل یخچال، انتقال داده شد. در مرحله بعد محلول موردنظر، به مدت ۲۰ دقیقه در توان ۱۰۰۰۰ rpm، سانتریفیوژ (یونیورسال، سهند)، گردیده و رسوبات حاصل جمع‌آوری و به پتریدیش منتقل گردید. سپس پتریدیش جهت خشک شدن کامل رسوبات، به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد داخل آون منتقل شد. پس از خشک شدن کامل رسوبات، جهت داشتن پودر خالص و یکدست، رسوبات را با استفاده از قاشقک از پتریدیش جدا کرده و در داخل هاون چینی عمل پودر کردن انجام شد. سپس پودر تهیه‌شده را به کوره الکتریکی با دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و بعد از ۴ ساعت کوره را خاموش کرده و بعد از ۲۴ ساعت، نانوذرات از داخل کوره برداشته شد. درنهایت نانوذرات موردنظر را، در داخل ظرف درپوش دار مخصوص قرار داده و با پارافیلم سطح آن پوشانده شد.

سویه‌ی باکتریایی

از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، سویه استاندارد H37Rv که توسط باروین در سال ۱۹۰۰ جداسازی و کشت داد شد و در حال حاضر با شماره ۲۵۶۱۸ در ATCC نگهداری می‌شود، استفاده شد. در این مطالعه نیمه تجربی، از این باکتری که به‌صورت کشت تازه بر روی محیط اختصاصی جامد لونشتاین- جانسون گلیسیرین دار تهیه شده از شرکت بهارافشان که به‌عنوان محیط مناسب جهت رشد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* رشد کرده بودند، استفاده شد.

بررسی تأثیر ضدمیکروبی مخلوط عصاره و نانوذرات

جهت تهیه سوسپانسیون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۳- ۲ کلنی از کشت ۴ هفته‌ای این باکتری از محیط لونشتاین- جانسون گلیسیرین‌دار، برداشته شد و به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت میدل بروک[6] (سیگما، امریکا) اضافه گردید. سپس چند گلوله شیشه‌ای داخل آن انداخته و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. در ادامه، سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود گذاشته شد، سپس به لوله‌های آزمایشگاهی منتقل گردید. کدورت حاصله برابر ۱ مک‌فارلند (۳×۱۰^{۸} CFU/ml) بود که ۱۰۰۰ بار با محیط میدل بروک، رقیق شد و سوسپانسیون میکروبی با غلظت نهایی (۳×۱۰^{۵} CFU/ml) به دست آمد. در مرحله بعد، در داخل پلیت ۹۶ خانه، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محیط میدل بروک براث غنی‌شده با OADC[7] ریخته شد و پس از آن مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس با غلظت‌های ۳۹/۰، ۷۸/۰، ۵۶/۱، ۱۲/۳، ۲۵/۶، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد به روش رقت سریالی اضافه گردید. سپس، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر لوله، اضافه و به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۱۰- ۵٪ گاز CO_2) در انکوباتور CO_2 دار قرار گرفت. در مرحله‌ی

6 Middle brook7H9 Broth
7 Oleic Acid Albumin Dextrose Catalase

بعدی با توجه به نتایج حاصل برای حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از روش میکروپلیت دایلوشن و میزان حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها به‌صورت دیسک دیفیوژن با استفاده از کشت سطحی روی محیط جامد لونشتاین- جانسون گلیسرین دار به دست آمد؛ به‌طوری‌که برای دقت بیشتر، از چاهک‌های حدواسط در پایان مرحله اندازه‌گیری، بر روی محیط جامد لونشتاین- جانسون گلیسرین دار کشت داده و به مدت ۳ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند (۲۲-۲۴). درنهایت برای تعیین خاصیت سینرژیکی ترکیب عصاره و نانوذره شاخص FIC[8] محاسبه گردید. FIC برای ترکیب A توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC of antibacterial A in combination}}{\text{MIC of antibacterial A alone}}$$

FIC برای ترکیب B نیز با همان فرمول محاسبه شد:

$$\sum FIC = \text{FIC of antibacterial A} + \text{FIC of antibacterial B}$$

شاخص ∑FIC برای شناسایی ماهیت میان‌کنش بین دو ترکیب ضدباکتریایی استفاده شد که این میان‌کنش از نوع سینرژیسمی یا افزایشی یا بی‌تفاوتی یا آنتاگونیسمی است. این شاخص به شرح زیر تفسیر گردید: ≤۱=سینرژیستیک[9]؛ ۱/۰= افزایشی[10]؛ ۲/۰-۱/۱= بی‌تفاوت (عدم‌مداخله)[11]؛ >۲/۰= آنتاگونیستیک[12] (۲۵).

مطالعه‌ی حیوانی

به‌منظور بررسی اثر درمانی مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس، از ۲۰ رأس رت نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی گرم ۲۰ ±۱۸۰ استفاده شد. موش‌ها قبل از شروع مطالعه به مدت هفت روز در محل نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی در شرایط استاندارد، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و چرخه‌ی تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی استفاده شد و در قفس‌هایی نگه‌داری شدند که آب و غذای کافی در اختیار داشته باشند. پس از عادی شدن محیط زندگی حیوانات آزمایشگاهی، موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند که به ترتیب یک گروه شم و یک گروه کنترل منفی و یک گروه که ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش نانوذرات دریافت کردند و یک گروه که ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات را دریافت کردند. از روش کار Clark و همکارانش در سال ۲۰۱۵، به‌منظور القای بیماری به موش‌ها استفاده شد (۲۶). در همین راستا، ۰/۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با غلظت نیم مک‌فارلند، به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. پس از القا با استفاده از تست تشخیصی توبرکولین، از صحت القا بیماری اطمینان حاصل شد. یک گروه ده‌تایی موش، سوسپانسیون *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را به‌صورت داخل صفاقی دریافت نمودند و گروه پنج‌تایی دیگر، سوسپانسیون را دریافت نکردند و گروه پنج‌تایی موش سالم به‌عنوان کنترل منفی بود. ۷ روز پس از تزریق، تست توبرکولین بر روی آن‌ها انجام شد تا صحت انجام روش القا در مطالعه تائید گردد. موش‌های مبتلا به بیماری، در چهار گروه اول که هیچ‌گونه تیمار دارویی دریافت نکردند و روزانه فقط سرم فیزیولوژی دریافت نمودند. گروه دوم پس از اطمینان از القای بیماری روزانه به مدت ۲۱ روز، مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس را به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت خوراکی (گاواژ) دریافت نمودند، گروه سوم پس از اطمینان از القای بیماری روزانه به مدت ۲۱ روز، مخلوط عصاره سیر و عصاره گون حاوی نانوذرات اکسید مس را به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند. علت استفاده هم زمان عصاره به این دلیل بود که در مطالعات انجام‌شده درگذشته عصاره‌های گون و سیر به‌تنهایی انجام‌شده است ولی مصرف هم‌زمان این دو عصاره همراه با نانوذرات در این مطالعه انجام شد، همچنین قبل از انجام مطالعه، تست‌های تک‌تک عصاره‌ها به‌منظور تائید نتایج بررسی‌های مشاهده شده انجام گردید و مطالعه با

8 Fractional Inhibitory Concentration
9 Synergistic
10 Additive
11 Indifferent(non-interactive)
12 Antagonistic

اطمینان از اثربخشی عصاره‌ها به‌صورت انفرادی انجام گردید. پس از ۲۱ روز، حیوانات به‌منظور بررسی تست توبرکولین آماده شده و با استفاده از تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر از PPD (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران) بررسی شدند. این تزریق با سرنگ مخصوص توبرکولین که سطح اریب آن رو به بالا قرار می‌گیرد، به‌صورت اینترادرمال انجام شد. پس از انجام عمل تزریق یک ناحیه‌ی برآمده به قطر ۶ تا ۱۰ میلی‌متر در پوست، به وجود آمد. ۲۴ ساعت پس از تزریق اندازه ناحیه برآمده اندازه‌گیری شد. افزایش قطر و بزرگی و سفتی به معنای سل مثبت یا عدم درمان، کاهش قطر یا کوچک شدن و از بین رفتن به معنای بهبودی سل در نظر گرفته شد. در انتهای مطالعه موش‌ها بر اساس پروتکل استاندارد معدوم‌سازی، معدوم گردیدند. کد اخلاق مطالعه حیوانی از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه: IR.IAU.SHK.RREC ۱۴۰۰.۰۷۳ دریافت گردید. داده‌ها نیز برای نرمال‌سازی، بررسی شدند و ازآنجاکه داده‌ها نرمال نبودند، از آزمون کروسکال والیس برای مقایسه‌ی بین گروه‌ها، استفاده شد.

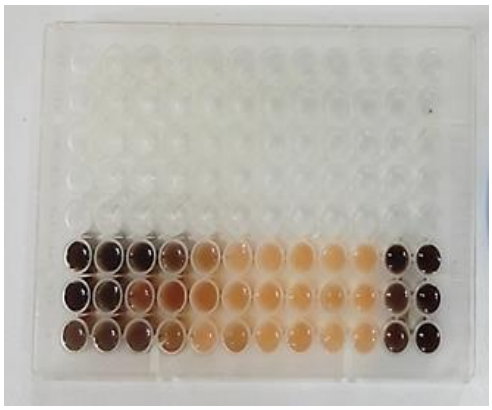
نتایج

نتایج حاصل از آزمون میکروبی

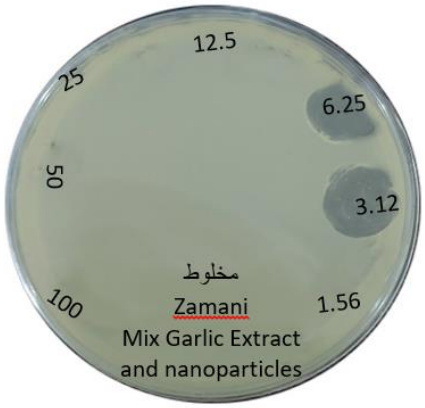
نتایج حاصل از آزمون میکروبی در جدول (۲)، نشان داده شده است.

جدول ۲- حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها به‌صورت دیسک دیفیوژن و روش میکروپلیت دایلوشن و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس

باکتری	گوده	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	کلرامفنیکل با غلظت ۳۰ میکروگرم	
														قطر ۲۱۰ میلی‌متر	
	آزمون	٪ ۱۰۰	٪ ۵۰	٪ ۲۵	٪ ۱۲/۵	٪ ۶/۲۵	٪ ۳/۱۲	٪ ۱/۵۶	٪ ۷۸	٪ ۳۹	شاهد باکتری	شاهد محیط	شاهد عصاره	حساس	محدوده
H37Rv M. tuberculosis	حداقل غلظت مهارکنندگی	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-		حساس
	حداقل غلظت کشندگی	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-		حساس
	اندازه قطر هاله (میلی‌متر)	۰	۰	۰	۰	۴۰	۶۰	-	-	-	-	-	-	-	-



شکل ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس به روش میکروپلیت دایلوشن



شکل ۲- حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها به‌صورت دیسک دیفیوژن

ابتدا با روش میکروپلیت دایلوشن حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس و حداقل کشندگی عصاره به‌صورت دیسک دیفیوژن (MBC) عصاره سیر و گون حاوی نانوذره اکسید مس هرکدام به‌تنهایی بررسی شد که نتایج نشان داد مقدار MIC و MBC برای عصاره به ترتیب برابر با ۵۰ و ۱۰۰ درصد بود. از طرفی مقدار MIC و MBC برای نانوذره اکسید مس به ترتیب برابر با ۲۵ و ۲۵ درصد بود. مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی با روش میکروپلیت دایلوشن (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری به‌صورت دیسک دیفیوژن (MBC) مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذره اکسید مس علیه باکتری مورد آزمایش در جدول (۲)، نشان داده‌شده است. نتایج حاصله نشان می‌دهد که باکتری نسبت به مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذره‌ی اکسید مس در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد نسبت به عصاره مورد مطالعه حساسیت زیادی را نشان می‌دهند. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس ممانعت از رشد به روش چاهک تائیدکننده نتایج حاصل از آزمون MIC می‌باشد (اشکال ۱ و ۲). برای شاخص $\sum FIC$ ، ۰/۷۵ به دست آمد که بر اساس تعریف بیان‌شده در بخش روش کار، مخلوط این دو ترکیب دارای خاصیت سینرژیستیک هستند.

بررسی صحت روش القا بیماری

نتایج بررسی صحت روش القا بیماری، نشان داد که استفاده از روش القای سل بر روش موش‌های آزمایشگاهی به‌درستی انجام گردیده و استفاده از تست تشخیصی توبرکولین کاملاً کارآمد است (جدول ۳).

جدول ۳- بررسی توبرکولین در موش‌های دریافت‌کننده سوسپانسیون باکتریایی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*

شماره موش	توبرکولین	
	گروه بیمار	گروه سالم
۱	+	-
۲	+	-
۳	+	-
۴	+	-
۵	+	-

جدول ۴- بررسی توبرکولین در موش‌های بیمار دریافت‌کننده مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش

شماره موش	توبرکولین
۱	+
۲	-
۳	+
۴	+
۵	+
ارزش معنی‌داری	۰/۸۵۹

نتایج حاصل از این مطالعه در جدول (۴)، نشان داد که استفاده از مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش اثر مهاری برای بیماری سل القا شده در موش از خود نشان نداد، بنابراین از مطالعه، حذف گردیدند.

جدول ۵- بررسی اثر درمانی مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش

شماره موش	توبرکولین
۱	-
۲	-
۳	+
۴	+
۵	-
ارزش معنی‌داری	۰/۰۱۲۵

گروه دریافت‌کننده مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلو کرم وزن بدن موش در جدول (۵)٪ بیش از نیمی از موش‌های مورد مطالعه در این تحقیق تست توبرکولین آن‌ها، منفی گردید و این امر نشان‌دهنده اثر مهاری استفاده از مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش شده است (P =۰/۰۱۲۵).

بحث

استیوز و همکاران در سال ۲۰۲۰ عنوان کردند، سل همچنان عامل اصلی مرگ ناشی از یک عامل عفونت در سراسر جهان است. *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از کند رشدترین باکتری‌های با زندگی آزاد محسوب می‌شود. برای ظهور کلنی آن هفته‌ها وقت لازم است. پوشش ضخیم و چندلایه اختصاصی در مایکوباکتریوم‌ها، به‌عنوان یک سد تقریباً نفوذناپذیر، در مقابل عوامل متعدد بخصوص ترکیبات آب‌دوست، اکسیژن و نمک‌های معدنی می‌باشد و نقش مهمی در مقاومت باکتری نسبت به اسیدها، بازها و آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. لذا استفاده از عوامل متعدد به‌منظور غلبه بر نفوذناپذیری، این دیواره می‌تواند در افزایش حساسیت سویه‌های مقاوم به داروی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* نقش مهمی داشته باشد مطالعه اثر آنتی‌بیوتیک و یا عصاره گیاهی بر مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به دلیل کندی رشد آن بسیار مشکل و زمان‌بر است و به همین دلیل کار مطالعاتی محدودی در این زمینه صورت گرفته است؛ اما در مورد سایر باکتری‌ها، مطالعات متعددی وجود دارد و تغییرات مورفولوژیک ناشی از مجاورت سلول‌های باکتریایی با غلظت‌های پایین‌تر یا مساوی با حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها، مورد توجه محققین بوده است. بیماری سل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی قرن حاضر می‌باشد که توانائی درگیر نمودن کلیه ارگان‌های بدن را دارد ولی ریه‌ها بیشتر به سل مبتلا می‌شوند. از سال ۱۹۸۲ همه پزشکان دنیا معتقد بودند که این بیماری تا سال ۲۰۰۰، کنترل و بحث آن فقط محدود به کتب پزشکی خواهد بود (۲۷)، ولی این امید ده سال بیشتر طول نکشید، به‌طوری‌که در سال ۱۹۹۳ این بیماری از طرف سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان یک فوریت جهانی اعلام گردید. بروز ۱۰ میلیون مورد جدید سل و درمان تنها دوسوم از آن‌ها که متأسفانه در بیش از ۵۰ درصد موارد درمان ناقص بوده (۱۶)، عمق فاجعه را در این سال‌ها نشان می‌دهد. بروز سه همه‌گیری از این بیماری در دو دهه اخیر، دور نمای کنترل این بیماری را در آینده نزدیک بسیار مبهم نشان می‌دهد. ایجاد همه‌گیری بیماری ایدز و متعاقب آن سل مقاوم به دارو، جهان کنونی را با تمام پیشرفت‌های عظیم در علم پزشکی ازنظر کنترل بیماری سل، بیش از یک قرن به عقب برگردانده است. امروزه در دنیا، هرساله بیش از ۸ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند و تاکنون یک‌سوم مردم جهان بدون آن‌که احساس بیماری کنند به میکروب این بیماری آلوده شده‌اند (۲۸). مطالعات مختلفی بر روی بیماری سل و روش‌های درمانی آن انجام شده است، در مطالعه انجام شده توسط ایمانی و همکارانش در سال ۱۳۸۱ با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره کلروفرمی سیر بر *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مورد

بررسی قرار گرفت. به همین منظور از سویه استاندارد H37RV و جدایه‌های بیماران ریوی مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی مسیح دانشوری تهران (سویه حساس به چهار دارو- سویه مقاوم به چهار دارو- سویه مقاوم به دو دارو و سویه مقاوم به یک دارو) استفاده شد. فعالیت ضدمیکروبی در شرایط آزمایشگاهی به روش بررسی حداقل غلظت بازدارندگی عصاره کلروفرمی سیر بر روی مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش سنجیده شد. نتایج حاکی از آن بود که رقت ۱:۱۲۸ یا غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌متر عصاره کلروفرمی سیر در محیط میدل بروک 7H10 آگار از رشد جدایه‌های مورد آزمایش و سویه استاندارد جلوگیری می‌کند. نتیجه نهائی این‌که عصاره کلروفرمی سیر بر روی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، اثر مهاری دارد (۲۸). همچنین این محققین در سال ۸۷ به تغییرات مورفولوژیک حاصل از سیر، بر روی همان باکتری پرداختند. در این مطالعه آزمایشگاهی، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه استاندارد H37RV و سویه‌های جدا شده از بیماران با غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی سیر در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط مایع میدل بروک براث H9 7 و محیط لون اشتاین جانسون، کشت داده شد. تغییرات شکلی باکتری در مطالعه میکروسکوپی بر روی مورفولوژی باکتری و در مطالعه ماکروسکوپی شکل ظاهری، قوام و سطح کلنی ایجادشده در محیط لون اشتاین جانسون بررسی شد. نتایج مربوط به اثرات نانوذره اکسید مس سبز سنتز شده بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد که می‌توان به مطالعه مکا و همکاران در سال ۲۰۲۱، اشاره کرد، آن‌ها در پژوهش خود عنوان کردند، مطالعات محدودی وجود دارد که رادیکال‌های آزاد یا وضعیت آنتی‌اکسیدانی را قبل و بعد از درمان ضد سل مورد تجزیه‌وتحلیل و مقایسه قرار داده باشد. مجاورت عصاره کلروفرمی سیر با باکتری موجب تبدیل کلنی باکتری از شکل خشن با سطح گل‌کلمی به حالت صاف و موکوئیدی شد. در مطالعه میکروسکوپی تحقیق حاضر، در زمان‌های مختلف تغییرات شکلی باکتری از باسیل به کوکسی به‌خوبی مشهود بود. همچنین مشخص شد که در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت غلظت ۰/۶۷ mg/ml از عصاره سیر با سویه حساس استاندارد H37RV و سویه‌های کلینیکی مقاوم به دارو جداشده از بیماران اثر مهاری دارد. این مطالعه نشان داد که ازنظر تغییرات مورفولوژی، باسیل سل در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج و کنترل منفی باعث تبدیل باکتری از حالت باسیلی به کوکوباسیل و تغییر کلنی از ظاهری خشن به صاف شده و میزان رشد را کاهش می‌دهد (۲۹). همچنین در مطالعه انجام شده توسط پنگ و همکاران در سال، ۲۰۰۵ باهدف بررسی تأثیر عصاره ریشه گون بر فاگوسیتوز ماکروفاژی علیه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* انجام گردید، مشاهده شد که در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۶، ۱/۵، ۴ گرم در لیتر، تزریق ریشه گون ظرفیت فاگوسیتوز ماکروفاژی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را افزایش می‌دهد. در غلظت ۱/۵ گرم در لیتر، بیشترین اثر معنی‌دار را می‌توان مشاهده نمود. گون می‌تواند ظرفیت فاگوسیتوز ماکروفاژی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را افزایش دهد و این مکانیسم دو جهته است. گون می‌تواند فاگوسیتوز ماکروفاژی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را در غلظت‌های بسیار بالا، مهار کند (۲۹). نتایج مطالعات ذکرشده هم‌سو با مطالعه‌ی حاضر، می‌باشد و تائیدکننده نتایج این مطالعه می‌باشد. از سوی دیگر، نتایج مطالعات مختلف نیز نشان داده است که نانوذرات دارای فعالیت ضدباکتریایی می‌باشند ازجمله مهم‌ترین این پژوهش‌ها، مطالعه انجام شده در سال، ۲۰۲۰ توسط ربیعی و همکاران می‌باشد که به کاربردهای نانوذرات اکسید مس اشاره شده (۲۱) و به‌ویژه فعالیت ضد مایکوباکتریومی آن نیز مورد بحث و بررسی قرارگرفته و نتایج مثبت این نانوذره بر روی عامل بیماری سل عنوان مشاهده گردید. تجویز نانوذرات اکسید مس اثرات مهاری قابل‌توجهی بر پیشرفت سل در موش‌ها نشان داد که با ارزیابی‌های ایمنی و اثر ضدباکتریایی تأیید شد. قابل‌ذکر است، دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس سبز سنتز شده، کاهش

شدید استرس اکسیداتیو ناشی از سل و آسیب ریه را نشان داد. درنتیجه، تجویز نانوذرات اکسید مس سنتز شده با روش سبز، اثربخشی امیدوارکننده‌ای را در کاهش عفونت سل نشان داد و یک راه بالقوه برای مداخلات ضدسل را ارائه کرد. این مطالعه بر روی موش‌ها انجام شد و نمی‌توان از نتایج آن برای انسان‌ها استفاده کرد که یک محدودیت عمده است.

نتیجه‌گیری

خاصیت سینرژیستی مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس به‌منظور تائید مطالعات میکروبی از مطالعه بر روی موش استفاده شد که نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از مخلوط موردمطالعه در این تحقیق در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، اثر مهاری برای بیماری سل القا شده در موش از خود نشان نداد، بنابراین از مطالعه حذف گردید. در مقابل در گروه دریافت‌کننده مخلوط عصاره‌های مورد استفاده در این تحقیق نیمی از موش‌های مورد مطالعه در این تحقیق تست توبرکولین آن‌ها منفی گردید که این نشان‌دهنده اثر مهاری استفاده از مخلوط موردنظر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش می‌باشد. خاصیت سینرژیستی مخلوط عصاره سیر و گون حاوی نانوذرات اکسید مس اثربخشی امیدوارکننده‌ای را در کاهش عفونت سل نشان داد و یک راه بالقوه برای مداخلات ضد سل را ارائه کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از زحمات خانم دکتر زهرا رضوی و خانم سارا صدر و پرسنل ازمایشگاه سینای شهرستان همدان، تقدیر و تشکر به عمل می آورند.

References

1. Wei M, Zhao Y, Qian Z, Yang B, Xi J, Wei J, et al. Pneumonia caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes and infection. 2020;22(6-7):278-84.
2. Venturini E, Remaschi G, Berti E, Montagnani C, Galli L, de Martino M, et al. What steps do we need to take to improve diagnosis of tuberculosis in children? Expert review of anti-infective therapy. 2015;13(7):907-22.
3. Moradi J, Mosavari N, Ebrahimi M, Arefpajohi R, Tebianian M. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis early secreted antigenic target 6 recombinant protein as a diagnostic marker in skin test. Osong public health and research perspectives. 2015;6(1):34-8.
4. Song F, Sun X, Wang X, Nai Y, Liu Z. Early diagnosis of tuberculous meningitis by an indirect ELISA protocol based on the detection of the antigen ESAT-6 in cerebrospinal fluid. Irish journal of medical science. 2014;183:85-8.
5. Tahmasebi P, Farnia P, Sheikholslami F, Velayati A. Rapid identification of extensively and extremely drug resistant tuberculosis from multidrug resistant strains; using PCR-RFLP and PCR-SSCP. Iranian journal of Microbiology. 2012;4(4):165.
6. Hosseini E. Effect of aalcoholic extract of hop flowers on serum level pituitary-thyroid hormones in adult male rats. Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014;1(4):425-31.
7. Jahromy MH, Khakpour S, Najafi A. Antibacterial effects of Humulus lupulus L. extract on topical staphylococcal infection in BALB/c Mice cornea. International Journal of Infectious Diseases. 2010;14:e335.
8. Sefidgar SAA, Taghizadeh Armaki M, Pournajaf A, Ardebili A, Omidi S, Abdian Asl A. Evaluation of antimicrobial activity of alcoholic and aqueous extracts from common hop (*Humulus lupulus*) and oak (*Quercus castaneifolia*). Journal of Arak University of Medical Sciences. 2015;17(12):39-46.
9. Kermanshahi R, Esfahani B, Serkani J, Asghari G, Babaie A. The study of antibacterial effect of Humulus lupulus on some of Gram positive & Gram negative bacteria. Journal of Medicinal Plants. 2009;8(30):92-164.
10.Fleischmann R, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and

19.Arzanlou M, Bohlooli S. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. Food chemistry. 2010;120(1):179-83.
20.Elmowalid GA, Abd El-Hamid MI, Abd El-Wahab AM, Atta M, Abd El-Naser G, Attia AM. Garlic and ginger extracts modulated broiler chicks innate immune responses and enhanced multidrug resistant *Escherichia coli* O78 clearance. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2019;66:101334.
21.Rabiee N, Bagherzadeh M, Kiani M, Ghadiri AM, Etessamifar F, Jaberizadeh AH, et al. Biosynthesis of copper oxide nanoparticles with potential biomedical applications. International Journal of Nanomedicine. 2020:3983-99.
22.Serkani JE, Isfahani BN, Safaei HG, Kermanshahi RK, Asghari G. Evaluation of the effect of *Humulus lupulus* alcoholic extract on rifampin-sensitive and resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Research in pharmaceutical sciences. 2012;7(4):235.
23.Chimponda T, Mukanganyama S. Antimycobacterial activities of selected medicinal plants from Zimbabwe against *Mycobacterium aurum* and *Corynebacterium glutamicum*. Trop Biomed. 2010;27(3):595-610.
24.Wei X-R, Chen X-K, Li Y-J. Effects of Astragalus injection on chemokines, renal function and humoral immunity in patients with pulmonary tuberculosis. Journal of Hainan Medical College. 2019;25(8):41-4.
25.Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meis JF, Punt NC, Mouton JW. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(3):702-7.
26.Clark R, Sanders C, Pakiz C, Hostetter M. Aminoglycoside resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates with an unusual disk diffusion antibiogram. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1988;32(5):689-92.
27.Olsen AW, van Pinxteren LA, Okkels LM, Rasmussen PB, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of laboratory strains. Journal of bacteriology. 2002;184(19):5479-90.
11.Jassal M, Bishai WR. Extensively drug-resistant tuberculosis. The Lancet infectious diseases. 2009;9(1):19-30.
12.Feyzabadi Z, Aliasl F, Qaraaty M, Aliasl J. Medicinal terms effective in the treatment of insomnia in traditional Iranian medicine. Journal of medical-scientific research history. 2015;7(23):51-68.
13.Feyzabadi Z, Aliasl F, Qaraaty M, Aliasl J. Medicinal terms effective in the treatment of insomnia in Iranian traditional medicine. Journal of medical-scientific research history. 2022;7(23):51-68.
14.MA X, al. e. American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium, Astragalus Root, Astragalus membranaceus & Astragalus membranaceus var. mongholicus, Analytical, Quality Control, and Therapeutic Monograph American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium, Astragalus Root, Astragalus membranaceus & Astragalus membranaceus var. mongholicus, Analytical, Quality Control, and Therapeutic Monograph. 1999.
15.Sun V, Hersh EM, Talpaz M, Lee SL, Wong W, Loo TL, et al. Immune restoration and/or augmentation of local graft versus host reaction by traditional Chinese medicinal herbs. Cancer. 1983;52(1):70-3.
16.Chu D-T, Wong W, Mavligit G. Immunotherapy with Chinese medicinal herbs. II. Reversal of cyclophosphamide-induced immune suppression by administration of fractionated *Astragalus membranaceus* in vivo. Journal of clinical & laboratory immunology. 1988;25(3):125-9.
17.Hacıseferoğulları H, Özcan M, Demir F, Çalışır S. Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). Journal of food engineering. 2005;68(4):463-9.
18.Mehrnia MA, Noshad M. Antimicrobial effect of garlic essential oil on a number of food-borne pathogens and determination of its chemical composition and antioxidant potential. Journal of food science and technology (Iran). 2019;16(91):17-29.

antigen 85b and esat-6. Infection and immunity. 2001;69(5):2773-8.
28.Imanifouladi A, Sattari M, Ghazisaiedi K. Effect of Garlic Extract on Mycobacterium tuberculosis. Avicenna Journal of Clinical Medicine. 2002; 9(3):14.
29.Peng G, Runling Z, Yanling L, Lei S. Effect of Astragalus root injection on macrophagal phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of the Fourth Military Medical University. 2005;26(10):894-6.

Evaluation of the antimicrobial effects of copper oxide nanoparticles combined with Astragalus and Garlic extracts on *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model

Zohreh Zamanian[1], Elahe Tajbakhsh[2]*, Nazila Arbabsoleimani[3]
1- Ph.D. Student, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
*Corresponding Author: ee_tajbakhsh@yahoo.com
Received: 10/08/2024, Accepted: 31/08/2024

Abstract
Tuberculosis (TB) is an infectious disease and one of the major global health concerns. The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial effect of garlic and astragalus extracts containing copper oxide nanoparticles on *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model. This study was conducted over a six-month period in 2022 at Sebalan Darou Company and the Tuberculosis Laboratory in Nahavand city, Iran. After extraction and nanoparticle synthesis, the susceptibility of the strains to the studied mixture was measured using minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). After ensuring the induction of the disease, 20 Wistar rats were treated for 21 days with a mixture of garlic and astragalus extracts containing copper oxide nanoparticles at a dose of 25 mg/kg of body weight, and they were evaluated using the tuberculin test. The results showed that the bacteria exhibited good sensitivity to the garlic and astragalus extract mixture containing copper oxide nanoparticles, and in half of the mice that received the mixture, the tuberculin test was negative. Based on the findings, the synergistic effect of the garlic and astragalus extracts containing copper oxide nanoparticles demonstrated promising efficacy in reducing TB infection and was proposed as a potential approach for anti-TB interventions.

Keywords: Garlic extract, Astragalus extract, Copper oxide nanoparticles, *Mycobacterium tuberculosis*