



سنتز نانو بیوفیلیم کامپوزیتی با استفاده از عصاره باریجه به منظور درمان بیماری تب لجن در اسب ها

متینه جلائیان مهری^{۱*}، مانیا غفاری محکم^۲، هلیا برزکار^۳، مریم حلوائی^۴

۱- استاد راهنما Matinehjaleaeyan3@gmail.com

۲- دانش آموز دبیرستان فرزنانگان یک تهران Mania.ghf@gmail.com

۳- دانش آموز دبیرستان فرزنانگان یک تهران vaezifereshteh@yahoo.com

۴- استاد مشاور Halvaity1978@gmail.com

خلاصه

بیماری تب لجن یکی از شایع ترین و خطرناک ترین عفونت های پوستی در اسب ها است که معمولاً در مناطق مرطوب و گل آلود شیوع پیدا می کند. عامل اصلی این بیماری، باکتری «درماتوفیلوس کنگولنسیس» است که باعث تب، زخم های چرکی، لنگش و در صورت عدم درمان به موقع، می تواند منجر به مرگ اسب ها شود. درمان های رایج شامل آنتی بیوتیک ها و داروهای شیمیایی هستند که به دلیل عوارض جانبی و احتمال ایجاد مقاومت میکروبی، به ویژه در مناطق با شرایط نامناسب بهداشتی، محدودیت هایی دارند. در این راستا، استفاده از ترکیبات طبیعی و بومی به عنوان جایگزینی مؤثر و کم خطر مطرح شده است. در این پژوهش، عصاره گیاه باریجه، یک گیاه دارویی بومی ایران با خواص ضدباکتریایی و ضدالتهابی برجسته، به عنوان ماده اصلی استفاده شد. این عصاره با پودر مونت موریلونیت ترکیب و نانوکامپوزیتی ضدباکتریایی ساخته شد. اثر این نانوکامپوزیت بر «درماتوفیلوس کنگولنسیس» از طریق آزمایش های MIC و MBC ارزیابی شد و نتایج نشان داد که ترکیب مذکور در غلظت های پایین قادر به مهار و کشتن باکتری است. این نانوکامپوزیت نه تنها از نظر اثربخشی مؤثر است، بلکه به عنوان یک گزینه طبیعی، کم هزینه و ایمن برای درمان تب لجن در اسب ها پیشنهاد می شود. بهره گیری از گیاهان دارویی بومی ایران همراه با فناوری نانو می تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشد و به بهبود سلامت دام ها و کاهش هزینه های درمانی در مناطق مرطوب و کم برخوردار کمک کند.

کلمات کلیدی: اسب، تب لجن، باریجه، نانو بیوفیلیم، عفونت باکتریایی

۱. مقدمه

در ایران، اسب ها از جمله حیوانات مهم و ارزشمندی هستند که در بخش های مختلف اقتصادی، ورزشی و فرهنگی نقش به سزایی دارند. از اسب ها در کشاورزی، حمل و نقل، مسابقات اسب دوانی و حتی در برخی مناطق برای حفظ سنت ها



و مراسمات فرهنگی استفاده می‌شود. این حیوانات نه تنها در زندگی روزمره مردم تأثیر زیادی دارند، بلکه به عنوان یکی از نمادهای ملی و تاریخی نیز شناخته می‌شوند. به همین دلیل، سلامت و مراقبت از اسبها برای صاحبان و دامداران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از تهدیدات جدی که سلامت اسبها را تهدید می‌کند، بیماری‌های عفونی مختلف است که در میان آنها، تب لجن اسب به عنوان یکی از بیماری‌های رایج و خطرناک شناخته می‌شود. این بیماری که عمدتاً توسط باکتری درماتوفیلوس کنگولنسیس ایجاد می‌شود، می‌تواند اثرات جدی بر سلامت اسبها گذاشته و در صورتی که به موقع درمان نشود، به مشکلاتی چون تب، لنگش، زخم‌های پوستی و حتی مرگ منجر گردد [۱]. تب لجن بیشتر در مناطق مرطوب و گل‌آلود شیوع دارد و می‌تواند به سرعت در میان اسبها گسترش یابد. این بیماری علاوه بر تهدید سلامت اسبها، خسارات اقتصادی سنگینی نیز به دامداران و صاحبان اسب وارد می‌کند. برای پیشگیری از تب لجن، مهم‌ترین اقدام جلوگیری از تماس اسبها با محیط‌های مرطوب و آلوده است. رعایت بهداشت در اصطبل‌ها، استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده و درمان‌های دارویی به موقع می‌تواند خطر ابتلا به این بیماری را کاهش دهد. در برخی کشورها، واکسنی برای پیشگیری از تب لجن اسب در دسترس است که به کاهش میزان ابتلا به این بیماری کمک می‌کند. با این حال، استفاده از این واکسن در ایران به‌طور گسترده انجام نمی‌شود و پیشگیری بیشتر به مدیریت محیط و بهداشت اسبها وابسته است. درمان بیماری معمولاً شامل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مراقبت‌های حمایتی است. اگر این بیماری به موقع شناسایی و درمان نشود، می‌تواند آسیب‌های جدی به سلامت اسبها وارد کند و در مواردی باعث مرگ آنها شود [۲]. علاوه بر این، تب لجن می‌تواند باعث کاهش عملکرد اسبها در فعالیت‌های مختلف ورزشی یا کشاورزی گردد و در نهایت خسارات اقتصادی قابل توجهی به همراه داشته باشد. عوامل مختلفی در بروز تب لجن موثر هستند؛ از جمله شرایط مرطوب و گل‌آلود، ضعف سیستم ایمنی اسبها و عدم رعایت بهداشت در اصطبل‌ها. همچنین استرس‌های فیزیکی و روانی می‌توانند خطر ابتلا به این بیماری را افزایش دهند. با توجه به اهمیت این بیماری، انجام تحقیقات علمی می‌تواند به شناسایی بهتر علائم، عوامل خطر و ارائه روش‌های درمانی مؤثر کمک کند. این تحقیقات می‌توانند در نهایت منجر به بهبود روش‌های پیشگیری، کاهش هزینه‌های درمانی و ارتقای سلامت اسبها شوند. در دامپزشکی، درمان عفونت‌های بافت نرم به‌ویژه در اندام‌های حرکتی اسبها همواره چالشی بزرگ برای متخصصین بوده است. پانسمان‌های موضعی موجود که به‌طور سنتی استفاده می‌شوند؛ معمولاً اثرات ضدعفونی‌کننده خوبی نداشته‌اند یا حرکت طبیعی حیوان را محدود کرده‌اند و نیز داروهای شیمیایی ضررهای قابل توجهی دارند؛ به همین منظور در این راستا، استفاده از مواد طبیعی و زیست‌سازگار می‌تواند گامی مهم در بهبود فرایند درمان باشد. گیاه باریجه که از زمانهای قدیم در طب سنتی ایران به‌عنوان دارویی مؤثر شناخته شده است، به‌دلیل خواص ضدباکتریایی و ضدالتهابی‌اش، گزینه‌ای عالی برای درمان این نوع عفونت‌ها به‌شمار می‌رود [۳-۴]. در پژوهش حاضر، آنها با استفاده از عصاره باریجه و ترکیب آن با نانوذرات کیتوزان و مونوموریلونیت، یک نانوبیوفیلم زیست‌تخریب‌پذیر طراحی کرده‌اند که علاوه بر خواص ضدعفونی‌کننده مؤثر، هیچگونه محدودیتی در حرکت طبیعی عضلات اسب ایجاد نکرده است. این نوآوری نه تنها به‌عنوان یک درمان مؤثر در مقابله با تب لجن معرفی شده است، بلکه می‌تواند چشم‌انداز جدیدی در کاربرد پانسمان‌های نانو و گیاهی در دامپزشکی ایجاد کرده باشد. این پژوهش، گامی مهم در راستای بهبود سلامت حیوانات و کاهش استفاده از مواد شیمیایی مضر در درمان‌های دامپزشکی به‌شمار می‌رود.



۲. مواد و روش ها

۲-۱ تهیه عصاره هیدروالکلی از صمغ گیاه باریجه

در ابتدا برای تهیه عصاره هیدروالکلی از صمغ گیاه باریجه، ۱۰۰ گرم از صمغ گیاه باریجه در ۲۰۰ سی سی حلال آب مقطر دوبار تقطیر و اتانول ۹۶ درصد با نسبت ۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصد آب مقطر مخلوط شد و به مدت یک ساعت روی همزن مغناطیسی با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس عصاره به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. در مرحله بعد برای حذف ناخالصی ها از عصاره و جدا شدن رسوبات، عصاره به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰ سانتریفیوژ و سپس با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. عصاره به دست آمده در ظرف شیشه ای تیره نگهداری و در یخچال قرار داده شد.

۲-۲ تهیه نانو بیوفیلیم کامپوزیتی با عصاره صمغ گیاه باریجه

در مرحله بعد برای تهیه نانو بیوفیلیم، ۱۰۰ گرم پودر مونت موریلونیت با آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط و در نهایت عصاره تهیه شده به آن اضافه شد. سپس نانوذره کیتوزان حل شده در استیک اسید به نانو سامانه اضافه شد تا خواص عصاره حفظ شود و تغییرات آن به حداقل برسد. این فرآیند به مدت زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از پایان این مرحله، عصاره به دست آمده از مرحله قبل، با محلول آب و اتانول ۹۶ درصد ترکیب می شود و به انکوباتور منتقل می شود تا فرآیند نهایی تشکیل نانو بیوفیلیم تکمیل گردد.

۲-۳ انجام تست رهایش عصاره قرار گرفته شده در نانو بیوفیلیم

در این مرحله تست رهایش عصاره نانوذره شده به منظور بررسی نحوه و میزان آزادسازی ترکیب فعال انجام شد. این آزمایش کمک می کند مشخص شود که نانوذره تا چه اندازه قادر است ترکیبات فعال عصاره را به صورت کنترل شده و در طول زمان آزاد کند. همچنین، شرایط آزمایش طوری طراحی شده که شباهت نسبی به شرایط بدن اسب داشته باشد، تا بتوان نتایج را به کاربردهای درمانی مرتبط کرد. در این آزمایش، فرایند رهایش به مدت ۷ روز مورد بررسی قرار گرفت. در هر روز، سه بار خوانش انجام شد و میانگین این سه مقدار به عنوان خوانش نهایی آن روز ثبت گردید. در روز هفتم برای افزایش دقت، دوبار خوانش مجزا انجام شد. تست رهایش ابتدا بر روی نمونه عصاره فاقد نانوذره کیتوزان و سپس بر روی نمونه حاوی عصاره و نانوذره کیتوزان انجام شد. هدف از این مقایسه، بررسی تأثیر نانوکپسوله سازی با کیتوزان بر میزان و نحوه آزادسازی عصاره بود.



۲-۴ کشت باکتری در محیط کشت

در این مرحله محلول حاوی عصاره و نانو سامانه در دماهای مشخص (۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۲ روز در انکوباتور قرار می گیرد. پس از گذشت دو روز، محلول های مختلف با غلظت های ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ از عصاره و نانو سامانه تهیه می شود. این محلول ها به طور دقیق روی باکتری های کشت شده در محیط کشت مناسب قرار می گیرند.

۲-۵ انجام تست کمترین غلظت مهار کننده (MIC) و تست کمترین غلظت باکتری کش (MBC)

برای ارزیابی اثر ضد میکروبی این ترکیب ها، از آزمایش حداقل غلظت مهار کننده (MIC) استفاده می شود. این آزمایش به منظور تعیین کمترین غلظت از ماده ضد میکروبی است که قادر به مهار رشد باکتری ها می باشد. در این تست، ابتدا کشت خالص میکروارگانیسم ها در محیط های کشت مناسب انجام می شود. پس از آماده سازی کشت، غلظت میکروارگانیسم ها به یک میلیون سلول در میلی لیتر می رسد. سپس، رقت های مختلف از عصاره و نانو سامانه آماده شده به این محیط اضافه می شود و به مدت ۱۸ ساعت در دمای مناسب انکوبه می شود. نتایج این آزمایش بر اساس کدورت محیط کشت و عدم رشد میکروارگانیسم ها گزارش می شود. لوله ای که در آن رشدی مشاهده نمی شود، نشان دهنده حداقل غلظت مهار کننده است. سپس آزمایش حداقل غلظت باکتری کش (MBC) به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی ترکیبات سنتز شده که قادر است به طور کامل فعالیت میکروبی را از بین ببرد؛ انجام شد. برای انجام این آزمایش، پس از اضافه کردن رقت های مختلف عصاره و نانو سامانه به محیط کشت، نمونه ها در پلیت های ۹۶ خانه ای (چاهک) قرار داده می شوند. سپس محیط ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای مناسب انکوبه می شوند. در نهایت، میزان کشندگی باکتری ها از طریق کاهش بیش از ۹۰٪ در تعداد سلول های زنده میکروبی اندازه گیری می شود.

۲-۶ تست تکثیر و زنده مانی سلولی

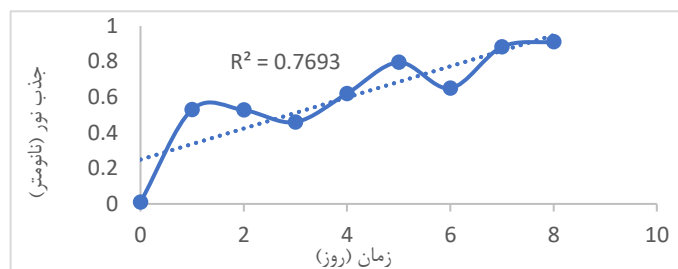
برای انجام تست تکثیر و زنده مانی سلولی، محصول تهیه شده از مرحله قبل توسط نور UV استریل می شود. سلول های فیبروبلاست پوستی در محیط کشت با بیست درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی سیلین و استروپتومایسین ضد عفونی می شود. بعد از اینکه چگالی سلول ها به میزان ده به توان پنج سلول رسید، سلول ها تریپسینه شده و به روی محصول منتقل می شوند. محصول در انکوباتور با غلظت سه درصد کربن دی اکسید نگهداری می شود. محیط کشت روزانه عوض و رفتار سلول های موجود بر روی محصول توسط میکروسکوپ الکترونی بررسی می شود. در مرحله بعد، سمیت محصول برای سلول ها با آزمون MTT تعیین شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول MTT بر روی چاهک ها ریخته شده و در انکوباتور به مدت ۵ ساعت قرار گرفته می شود. سپس بعد از دور ریختن محلول MTT دی متیل سولفوکسید (DMSO) به مدت ۵ دقیقه روی سلول ها ریخته شد و میزان جذب نوری نمونه ها توسط دستگاه خوانش الایزا خوانده و گزارش شد.



۳. نتایج و بحث

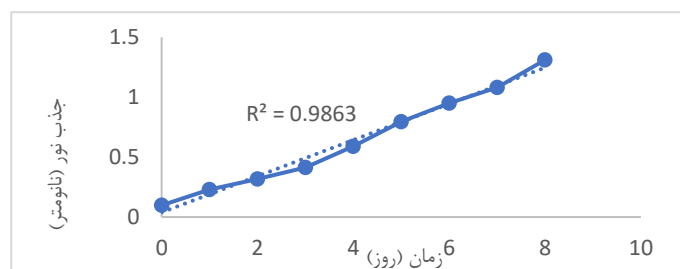
۳-۱ نتایج تست رهایش عصاره از نانو بیوفیلیم

بر اساس آزمایش های انجام شده، در مرحله ی اول تست رهایش، آزمایش بر روی نمونه ای فاقد نانوذره ی کیتوزان، به مدت ۷ روز و ۸ بار خوانش صورت گرفت (نمودار ۱). در این آزمایش، مقدار ماده ی آزاد شده به صورت روزانه اندازه گیری و ضریب همبستگی بین زمان و مقدار رهایش که از روی میزان جذب نوری نمونه ها، مشخص شده بود، محاسبه شد. در تست های رهایش، ضریب همبستگی شاخصی آماری برای سنجش میزان تطابق داده های تجربی با مدل ریاضی رهایش دارو است. هرچه این ضریب به عدد ۱ نزدیک تر باشد، نشان دهنده ی همبستگی قوی تر و انطباق بهتر داده ها با مدل مورد نظر است. همانطور که نتایج نشان می دهد، مشاهده می شود که با گذشت زمان، ضریب همبستگی افزایش یافته و به عدد ۱ نزدیک تر شده است. این روند بیانگر آن است که رفتار رهایش ماده در نمونه ی فاقد نانوذره، به مرور منظم تر و قابل پیش بینی تر شده است. با این حال، همان طور که در نمودار ۱ مشخص است، منحنی رهایش نوسانات قابل توجهی را نشان می دهد که می تواند ناشی از نبود ساختار نانوذرات باشد.



نمودار ۱: جذب نور نمونه بر حسب زمان برای تست رهایش در نمونه فاقد نانوذره کیتوزان

در مرحله ی دوم تست رهایش، نمونه ی حاوی نانوذره ی کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت. مشابه مرحله ی قبل، فرایند رهایش طی ۷ روز و ۸ بار خوانش انجام شد (نمودار ۲).



نمودار ۲: جذب نور نمونه بر حسب زمان برای تست رهایش در نمونه فاقد نانوذره کیتوزان



نتایج به دست آمده نشان داد که نوسانات منحنی رهایش نسبت به مرحله‌ی اول به مراتب کمتر شده و روند تغییرات یکنواخت‌تر و منظم‌تر بوده است. در این مرحله، ضریب همبستگی برابر با $0/98$ به دست آمد که عددی بسیار نزدیک به ۱ است. این موضوع نشان می‌دهد که استفاده از نانوذره‌ی کیتوزان باعث افزایش تطابق داده‌های تجربی با مدل نظری شده و فرآیند رهایش کنترل شده‌تر و قابل پیش‌بینی‌تری را فراهم کرده است. در نتیجه، می‌توان گفت که حضور نانوذره‌ی کیتوزان عملکرد بهتری را نسبت به نمونه‌ی فاقد آن نشان داده و موجب بهبود نظم در رهایش ماده‌ی مؤثره شده است. همچنین نتایج به دست آمده نشان داد بعد از مدت ۷ روز عصاره به مدت ۷۳ درصد در محیط آزاد شده و تاثیر به سزایی بر روی روند کار درمانی داشته است (جدول ۱).

جدول ۱: میزان رهایش عصاره از نانو بیوفیلیم بر حسب درصد در زمان ۷ روز

زمان (روز)	رهایش عصاره از نانو بیوفیلیم بر حسب درصد
۱	۲۲
۲	۳۴
۳	۳۸
۵	۶۳
۷	۷۳

۲-۲ نتایج تست‌های حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده

نتایج تست های حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده برای نمونه‌ی نانو بیوفیلیم سنتز شده حاوی عصاره صمغ گیاه باریجه، پس از گذشت ۳ روز از قرارگیری بر روی سوش قارچی، به صورت درصدی محاسبه شد. کمترین غلظت مهار کنندگی (MIC) برابر $60/24$ درصد و میزان کمترین غلظت باکتری کش (MBC) برابر با $62/23$ درصد به دست آمد. نتایج نشان داد که هنگامی که عصاره در نانوذره کیتوزان قرار میگیرد و بر روی میکروآرگانسیم تاثیر داده می شود تاثیر آنتی باکتریالی عصاره بر روی سوش میکروبی تا حدود ۶۳ درصد افزایش می یابد نسبت به حالتی که عصاره تنها فقط حدود $6/5$ درصد بر روی سوش میکروبی تاثیر داشت.

۳-۳ نتایج تست تکثیر و زنده مانى سلولى

بررسی درصد زنده مانى سلولى در نمونه‌های مختلف نشان دهنده‌ی تفاوت‌های معناداری میان گروه‌های آزمایشی بود. در گروه کنترل، درصد زنده مانى سلول‌ها برابر با حدود ۵۸ گزارش شد که به عنوان پایه‌ی مقایسه در نظر گرفته شد. در نمونه‌ی حاوی بیوفیلیم بدون عصاره، درصد زنده مانى افزایش یافت که بیانگر بهبود نسبی زیست‌سازگاری مواد پایه بیوفیلیم نسبت به گروه کنترل است. بیشترین درصد زنده مانى سلولى در نمونه‌ی حاوی بیوفیلیم با باکتری و عصاره‌ی نانوشده به صورت بیوفیلیم مشاهده شد؛ به طوری که مقدار آن به ۶۸ درصد رسید. این افزایش قابل توجه در میزان زنده مانى سلولى



نشان می‌دهد که حضور هم‌زمان عصاره‌ی نانوشده و باکتری در ساختار بیوفیلم، اثر مثبتی بر حفظ بقای سلول‌ها دارد و احتمالاً از طریق بهبود ویژگی‌های زیست‌سازگاری و فراهم‌سازی محیطی مناسب‌تر برای رشد سلولی عمل کرده است (جدول ۲). نتایج نشان می‌دهد ترکیب نهایی با عصاره بر روی سلول‌های پوست اسب سمیتی نداشته و بر روند درمان سلول‌های آسیب دیده فیبروبلاست پوستی تا حدود ۷۰ درصد ترمیم داشته است.

جدول ۲: نتایج تست تکثیر و زنده‌مانی سلولی

درصد زنده‌مانی سلولی	نمونه‌های مورد آزمایش
58 ± 3.22	گروه کنترل
61 ± 3.66	بیوفیلم بدون عصاره
68 ± 5.33	نانو بیوفیلم با عصاره

۴. نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که نانوکامپوزیت ترکیب‌شده از عصاره گیاه باریجه و پودر مونت‌موریلونیت قادر به مهار و نابودی باکتری درماتوفیلوس کنگولنسیس در غلظت‌های پایین است. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که این نانوکامپوزیت می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مؤثر و ایمن برای درمان بیماری تب لجن در اسب‌ها عمل کند. استفاده از ترکیب مواد طبیعی بومی، به‌ویژه در زمینه درمان بیماری‌های دامی، علاوه بر اثربخشی درمانی بالا، مزایای اقتصادی قابل‌توجهی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب در مناطق کم‌برخوردار و مرطوب که دسترسی به داروهای شیمیایی محدود است، مطرح شود. هم‌چنین این تحقیق تأکید می‌کند که استفاده از منابع طبیعی بومی به‌ویژه در ترکیب با فناوری نانو می‌تواند راه‌حل‌های نوآورانه و مقرون‌به‌صرفه‌ای برای درمان بیماری‌ها فراهم کند و در عین حال هزینه‌ها و عوارض جانبی ناشی از استفاده از داروهای شیمیایی را کاهش دهد. از این رو، یافته‌های این پژوهش می‌تواند به‌عنوان مبنای تحقیقات و کاربردهای آتی در درمان بیماری‌های مشابه در دام‌ها و سایر حیوانات مورد استفاده قرار گیرد.



۵. قدردانی و سپاس

در راستای انجام این پژوهش از والدین محترم که ما را در این مسیر تشویق و یاری نمودند تشکر می نمایم. هم چنین برای زحمات فراوان و راهنمایی های بی دریغ دبیر راهنما سرکار خانم جلائیان و سرکار خانم حلویی و همراهی کادر پژوهشی دبیرستان دخترانه فرزنانگان یک تهران بی نهایت سپاسگزار هستیم.

۶. منابع

- [۱]. محمود فمی زاغرمی؛ سروش مقدم جعفری؛ محمدصادق موسوی؛ انوش سفیدگری، مروری بر درماتوفیلوزیس دامی در ایران و اهمیت بهداشت عمومی، یازدهمین کنگره دانشجویان دامپزشکی ایران، ۱۳۹۶.
- [۲]. غلامرضا هاشمی تبار، تهیه و ارزیابی آنتی ژن نو ترکیب (Recombinant) علیه بیماری درماتوفیلوز در گوسفند، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، ۱۳۸۱.
- [۳]. فاطمه فلاح، مهرداد عظیمی، اثر آنتی مایکوباکتریال عصاره باریجه، همایش ملی گیاهان دارویی، ۱۳۸۹.
- [۴]. جعفر محمدزاده میلانی؛ زهرا امام جمعه؛ محمد صفری؛ منوچهر حامدی، بهینه سازی شرایط استخراج صمغ از گیاه باریجه (*Ferula galbaniflua*)، مجله علوم کشاورزی ایران، دوره ۳۸، شماره ۲، آذر ۱۳۸۶.