مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۴، شماره۶ ویژه نامه۳، زمستان ۱۳۹۰؛۶۳-۵۵

ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره اوکالیپتوس *(Eucalyptus globulus)* بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱٦M درون ماکروفاژی

پیمان عبداله زاده[۱]، رضا شاپوری[۲*]، شهرزاد نصیری سمنانی[۳]، حامد علیزاده[۱]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۲- استادیار، دکترای تخصصی باکتری شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۳- استادیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت ۹۰/۷/۱۶، تاریخ پذیرش ۹۰/۱۰/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوزیس توسط بروسلا که یک پاتوژن داخل سلولی اختیاری می‌باشد ایجاد شده که سلول‌های فاگوسیت کننده حرفه‌ای و غیر حرفه‌ای را مورد تهاجم قرار می‌دهد. اوکالیپتوس یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی در پزشکی سنتی در دنیا می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M درون ماکروفاژی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی برگ‌های اوکالیپتوس، اثر عصاره‌ها بر بقای داخل ماکروفاژی بروسلا ملی تنسیس ۱۶Mبا کشت سلولی از ماکروفاژهای صفاقی موش بالب سی مطالعه گردید. به این منظور پس از لیز ماکروفاژها، با تهیه رقت‌های سری و انجام کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار، تعداد کلنی‌های رشد کرده مورد شمارش قرار گرفت.

یافته‌ها: حداکثر فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M درون ماکروفاژی بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت در رقت‌های ۱:۴۰ (۲۱/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره آبی و ۱:۶۴۰ (۱/۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره اتانولی و ۱:۳۲۰ (۲/۵۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره استونی بود.

نتیجه گیری: عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس دارای اثر ضد میکروبی علیه بروسلا ملی تنسیس ۱۶M درون ماکروفاژی هستند و عصاره اتانولی بیشترین فعالیت ضد میکروبی بر روی بروسلای داخل ماکروفاژی دارد، لذا این عصاره‌ها در درمان بروسلوزیس می‌توانند مفید باشند.

واژگان کلیدی: اثرات ضد میکروبی، بروسلا ملی تنسیس ۱۶M، عصاره‌های اوکالیپتوس، کشت سلولی، ماکروفاژ

***نویسنده مسئول:** زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی

Email:rezashapoury@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بروسلوزیس هم چنان که به عنوان تب مواج، تب مدیترانه‌ای یا تب مالت شناخته شده است، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان بوده که می‌تواند در اثر تماس مستقیم یا غیر مستقیم با حیوانات آلوده یا محصولات آنها به انسان منتقل شود(۱). نمای بالینی آن غیر اختصاصی بوده و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد و می‌تواند از یک بیماری حاد تب دار تا یک بیماری خفیف و نامشخص بروز نماید. مدت بیماری نیز می‌تواند از چند روز تا چندین سال به درازا بکشد(۲). میزان بروز بروسلوز انسانی 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 خاص کشورهای جهان سوم است(۳). گرچه برنامه‌های گسترده‌ای برای کنترل این بیماری در بسیاری از کشورها اجرا شده است اما هم چنان مناطقی وجود دارند که بیماری در آنها اندمیک است، به طوری که تنها چند کشور در جهان وجود دارند که این بیماری در آنها ریشه کن شده است(۱، ۲).

بروسلاها کوکوباسیل‌های کوچک گرم منفی بوده که ترجیحاً توسط ماکروفاژها فاگوسیتوز شده و تکثیر می‌شوند. چون تا به حال توکسین یا آنزیم‌های سیتولیتیک برای بروسلا شناسایی نشده است این فرضیه مطرح می‌شود 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 آنتی بیوتیک‌های رایج باعث کاهش درد، کاهش علایم و کاهش عود بیماری و سایر عوارض آن می‌شود اما به دلیل حضور باکتری‌ها در داخل سلول‌های میزبان استفاده از داروهایی که قدرت نفوذ به داخل سلول‌ها را دارند ضروری به نظر می‌رسد(۵). در درمان بروسلوز برای جلوگیری از بروز مقاومت و عود مجدد از ترکیب دو دارو استفاده می‌شود. درمان معمول بروسلوز ترکیبی از تتراسایکلین خوراکی به همراه استرپتومایسین تزریقی و یا ترکیب ریفامپین خوراکی و تتراسایکلین خوراکی است که به جای استرپتومایسین از جنتامایسین هم استفاده می‌شود، اما با این وجود عود مجدد بیماری در برخی موارد مشاهده می‌شود. از آن جایی که مصرف تتراسایکلین‌ها برای کودکان، نوزادان و جنین همراه با عوارض می‌باشند، در زنان باردار و نوزادان باید تری متوپریم-سولفا متوکسازول را جایگزین داکسی سایکلین نمود. به نظر می‌رسد که فعالیت این داروها علیه بروسلا در داخل سلول‌های میزبان محدود بوده و قادر به ریشه کن کردن کامل عامل بیماری نمی‌باشند. هم چنین با وجود آنتی بیوتیک‌های مذکور 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 را مجبور به یافتن راه‌های درمانی جدید برای بروسلوزیس نموده است(۸-۶).

اوکالیپتوس از جمله گیاهان دارویی است که از خواص ضد میکروبی وسیعی برخوردار است. این گیاه متعلق به خانواده میرتاسه بوده که زیستگاه طبیعی آن در استرالیا قرار دارد اما امروزه در سراسر جهان از جمله ایران گسترده شده است. برگ‌های این گیاه به علت دارا بودن ترکیبات شیمیایی مختلف، دارای فعالیت‌های بیولوژیکی وسیع از جمله خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی می‌باشند. مهم‌ترین ترکیب شیمیایی برگ‌های اوکالیپتوس، ۱و۸-سینئول یا اوکالیپتول است که در پزشکی

Archive of SID

www.SID.ir

مصرف دارویی دارد. عصاره برگ‌های این گیاه روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری، سالمونلا پاراتیفی، اشریشیا کلی، باسیلوس سرئوس و نیز قارچ کاندیدا آلبیکنس فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده است، به طوری که از اوکالیپتوس برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند آنفلوانزا، تونسیلیت، اسهال خونی و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود(۹، ۱۰). هدف از این تحقیق بررسی عصاره‌های آبی و آلی برگ‌های اوکالیپتوس به عنوان ماده‌ای که توانایی نفوذ به داخل سلول‌های میزبان را داشته و باعث حذف باکتری در داخل آنها شود، می‌باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، سویه باکتریایی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M از بانک میکروبی مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تهیه گردید. برگ‌های تازه گیاه اوکالیپتوس از حوالی شهرستان اهواز جمع‌آوری و تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک تهیه شدند.

این مطالعه روی ۵ سر موش نژاد بالب سی (Balb/c) با سن ۸-۶ هفته‌ای به وزن تقریبی ۵±۲۵ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور ایران در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش حیوانات به مدت ۳ هفته جهت سازگاری با محیط در آزمایشگاه قرار گرفتند و در طی این مدت با آب و غذای کافی تغذیه می‌شدند. کلیه نکات مربوط به دستورالعمل کار با حیوانات در این مطالعه رعایت شد.

تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی برگ‌های اوکالیپتوس

برگ‌های گیاه اوکالیپتوس 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 (نسبت۵:۱) 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 سانتی گراد سانتریفوژ (دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار مدل ROTIX DA50 ساخت کمپانی HETTICH) و برای تغلیظ از دستگاه تقطیر در خلا استفاده و عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد برای کارهای بعدی نگهداری شدند(۱۱، ۱۲).

جدا سازی ماکروفاژهای صفاقی از موش های ماده بالب سی

برای افزایش تعداد ماکروفاژهای داخل صفاقی موش‌ها، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محیط تایوگلیکولات ۳ درصد وزنی-حجمی به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. ۳ روز بعد موش‌ها توسط اتر کشته شده و پس از ضد عفونی پوست بدن آنها با الکل ۷۰ درجه در زیر هود بیولوژیک و در شرایط کاملاً استریل، توسط سرنگ ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و ۵ واحد هپارین تزریقی به ازای هر میلی‌لیتر محیط به داخل صفاق موش‌ها تزریق و پس از تزریق بدون بیرون کشیدن سرنگ چند مرتبه به صفاق موش ضربه وارد کرده تا سلول‌ها به خوبی در محیط تزریق شده غوطه ور شوند. سپس مجدداً محیط کشت به داخل سرنگ کشیده و بعد از انتقال به لوله‌های استریل در دور g ×۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصله یک بار با RPMI 1640 هپارینه حاوی ۱۰ درصد FCS شستشو گردید(۴، ۱۵-۱۳).

بررسی اثر عصاره ها بر روی ماکروفاژها

پس از تهیه ماکروفاژهای صفاقی موش‌های ماده بالب سی ۸-۶ هفته‌ای در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

درصد سرم جنین گاوی (FCS) و ۵ واحد هپارین به ازای هر میلی‌لیتر محیط پس از شستشو و سانتریفوژ، درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو شمارش و تعداد سلول‌های زنده (بی‌رنگ) و مرده (آبی رنگ) در زیر میکروسکوپ نوری و فرمول مربوطه (۱۰۰×نسبت تعداد سلول‌های زنده به کل سلول) محاسبه شد. پس از شمارش تعداد ماکروفاژها، ماکروفاژهای جمع‌آوری شده به میکروپلیت‌های کشت سلولی وارد ($۲/۷\times۱۰^{۳}$ ماکروفاژ در هر چاهک) و به همراه محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 گرماگذاری شدند تا ماکروفاژها به جدار پلیت بچسبند، سپس رقت‌هایی از عصاره‌های گیاه مورد نظر (۱:۲۰، ۱:۴۰، ۱:۸۰ و ۱:۱۶۰) به پلیت‌ها وارد و در همان شرایط ذکر شده گرماگذاری و بعد از ۲۴ ساعت درصد ماکروفاژهای زنده مجدداً مورد بررسی قرار گرفتند(۴، ۱۵-۱۳).

بررسی اثر عصاره ها بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا

پس از جدا سازی ماکروفاژهای صفاقی و انتقال به میکروپلیت‌های کشت سلولی ($۲/۷\times۱۰^{۳}$ ماکروفاژ در هر چاهک)، به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 گرماگذاری شدند. سپس بروسلا ملی تنسیس ۱۶M به پلیت‌ها اضافه شده تا مقدار باکتری‌ها برابر با ۵×۱۰^{۵} Cfu/ml (باکتری در هر میلی‌لیتر) شود. بعد از ۲ ساعت گرماگذاری در شرایط ذکر شده، بلع باکتری‌ها توسط ماکروفاژها با تهیه گسترش از چاهک های پلیت بر روی لام و رنگ آمیزی گیمسا بررسی و تایید گردید. برای حذف باکتری‌های خارج سلولی جنتامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه و یک ساعت در شرایط ذکر شده گرماگذاری و سپس از حذف باکتری‌های خارج سلولی از محیط کشت سلولی بر روی آگار کشت و سپس محیط کشت سلولی به آرامی تعویض شده و به همراه رقت‌های عصاره‌ها (۱:۴۰ تا ۱:۵۱۲۰) با کنترل مثبت (چاهک فاقد عصاره که به جای عصاره به آن نرمال سالین اضافه می‌شود) گرماگذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، ماکروفاژها لیز و از درون چاهک‌ها جمع‌آوری و کشت داده شدند. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی گراد با ۷-۵ درصد CO_2 به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند و تعداد باکتری‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها مورد شمارش قرا گرفته شد(۴، ۱۵-۱۳).

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 لحاظ گردید. داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ و آزمون آماری آنوا با آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند. در این مطالعه p کمتر از ۰/۰۱ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته ها

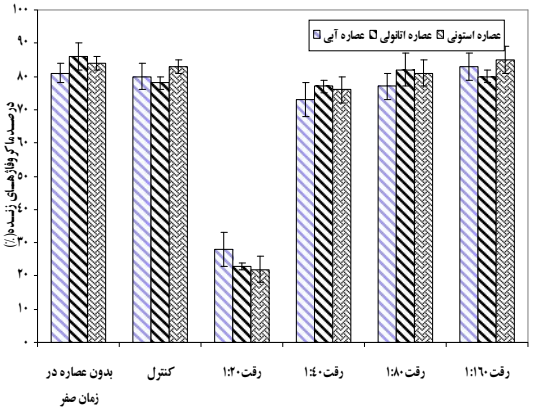
پس از جدا سازی ماکروفاژهای صفاقی از موش‌ها به طور متوسط ۱۰ نمونه مورد شمارش قرار گرفته و میانگین کلی محاسبه شده برای تعداد ماکروفاژ ها $۲/۷\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر بود.

جهت بررسی اثر عصاره های تهیه شده بر روی ماکروفاژها، پس از تهیه رقت‌های مختلف عصاره‌ها به همراه ماکروفاژ در پلیت و انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد سلول‌های زنده شمارش شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که به جز رقت ۱:۲۰ عصاره‌ها، بقیه رقت‌ها اثر مهاری بر روی ماکروفاژهای نداشته و در نتیجه می‌توان از این رقت‌ها برای

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی اثر عصاره‌ها بر روی بروسلا در داخل ماکروفاژ استفاده کرد(نمودار۱).



نمودار۱. مقایسه میانگین و انحراف معیار درصد ماکروفاژهای زنده در زمان صفر و ۲۴ ساعت بعد از تماس با عصاره های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس

نتایج بررسی اثر عصاره ها بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا

پس از تهیه ماکروفاژها، رقت‌های عصاره‌ها، تلقیح باکتری‌ها و انجام سایر مراحل کار، تعداد باکتری‌های درون ماکروفاژی بعد از لیز ماکروفاژها و کشت بر روی محیط آگاردار مورد شمارش قرار گرفت. نتایج مشخص نمود که بیشترین فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M درون ماکروفاژی بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت در رقت‌های ۱:۴۰ (۲۱/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره آبی و ۱:۶۴۰ (۱/۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره اتانولی و ۱:۳۲۰ (۲/۵۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره استونی بودند. بررسی آماری در سطح احتمال $p<۰/۰۱$ اختلاف معنی‌داری بین تمام گروه‌های آزمون و گروه کنترل نشان می‌دهد(جدول ۱).

جدول۱. میانگین و انحراف معیار تعداد بروسلا ملی تنسیس 16M درون ماکروفاژی رشد کرده بر روی محیط آگاردار بعد از لیز ماکروفاژ ها بر حسب CFU/ml بعد از تیمار با عصاره های آبی و آلی اوکالیپتوس (مقدار تلقیح اولیه ۵×۱۰^{۵} CFU/ml)

دقت / عصاره	کنترل	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰
عصاره آبی	$(۴۴\pm۱)\times۱۰^{۴}$	$(۱۶\pm۲)\times۱۰^{۲}$ *	$(۱۱\pm۳)\times۱۰^{۳}$ *	$(۳۰\pm۱)\times۱۰^{۳}$ *	$(۴۰\pm۱)\times۱۰^{۳}$ *
عصاره اتانولی	$(۳۹\pm۵)\times۱۰^{۴}$	۵۰۰±۱۰۰*	۷۰۰±۵۰*	$(۲۸\pm۱)\times۱۰^{۲}$ *	$(۱۳\pm۱)\times۱۰^{۳}$ *
عصاره استونی	$(۴۰\pm۵)\times۱۰^{۴}$	۴۰۰±۵۰*	$(۱۴\pm۱)\times۱۰^{۲}$ *	$(۲۹\pm۳)\times۱۰^{۲}$ *	$(۴۵\pm۱)\times۱۰^{۲}$ *

* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p<۰/۰۱$

بحث

بروسلا یک باکتری داخل سلولی اختیاری بوده که توانایی بقا و تکثیر در داخل ماکروفاژهای میزبان را دارا می‌باشد، به طوری که ماکروفاژها برای بقا و تکثیر سویه‌های بروسلا طی بیماری بروسلوزیس اهمیت به سزایی دارند، به همین علت در مقابل آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان بروسلوز مقاومت نشان می‌دهند، لذا داروهای جدید باید توانایی ورود به سلول‌های میزبان را داشته و بتوانند باکتری را در داخل ماکروفاژ از بین ببرند(۱۳، ۱۶).

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی انواع عصاره‌های استخراج شده از گیاه دارویی اوکالیپتوس بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M که منجربه بروز تب مالت در انسان می شود ارزیابی گردید و مشخص شد که از میان عصاره‌های استخراج شده از گیاه دارویی اوکالیپتوس، عصاره اتانولی دارای بیشترین اثر مهاری بر روی بروسلای درون ماکروفاژی در کشت سلولی می‌باشد. برای حصول اطمینان از عدم مهار کنندگی انواع عصاره‌ها بر روی

Archive of SID

www.SID.ir

ماکروفاژها، ابتدا اقدام به بررسی اثر عصاره‌ها بر میزان زنده ماندن ماکروفاژها در ۲۴ ساعت بعد از تماس آنها با رقت‌های مختلف عصاره‌ها کردیم(نمودار ۱). نتایج مشخص نمودند که رقت‌های MIC (Minimum Inhibition Concentration) و MBC (Minimum Bactericidal Concentration) عصاره‌ها بر روی ماکروفاژها فاقد اثر ات سمی می‌باشند و تنها در رقت ۱:۲۰ هر سه عصاره اثر مهاری بر روی ماکروفاژها وجود دارد و در رقت‌های پایین‌تر این اثر مهاری مشاهده نمی‌شود و می‌توانیم در این رقت‌ها اثر ضد میکروبی عصاره‌ها را بر بروسلای درون ماکروفاژی بررسی نماییم.

در بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها بر بروسلا ملی تنسیس ۱۶M درون ماکروفاژی مشخص شد که این عصاره‌ها توانایی از بین بردن باکتری‌ها را در داخل ماکروفاژها دارند به طوری که نتایج جدول ۱ که مربوط به اثر عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی بقاء درون ماکروفاژی سویه 16M است نشان می‌دهد که در رقت ۱:۴۰ عصاره آبی که همان رقت MBC می‌باشد تعداد قابل توجهی از باکتری‌ها پس از مدت زمان ۲۴ ساعت از بین رفته‌اند. در رقت ۱:۸۰ که در حقیقت رقت MIC عصاره آبی است نیز مقدار قابل توجهی از باکتری‌ها پس از مدت زمان ۲۴ ساعت نابود شده‌اند ولی در رقت‌های بعدی با کاهش غلظت عصاره، میزان رشد باکتری افزایش یافته است. هم‌چنین نتایج این جدول نشان می‌دهد که در رقت ۱:۶۴۰ عصاره اتانولی تعداد خیلی کمی از باکتری توانسته‌اند زنده مانده و رشد کنند. در رقت ۱:۱۲۸۰ که همان رقت MBC است تعداد قابل توجهی از باکتری‌ها پس از مدت زمان ۲۴ ساعت نابود شده‌اند. در رقت ۱:۲۵۶۰ که در حقیقت رقت MIC عصاره اتانولی است نیز تعداد زیادی از باکتری‌ها پس از مدت زمان ۲۴ ساعت از بین رفته‌اند. هم‌چنین مشخص می‌شود که در رقت ۱:۳۲۰ عصاره استونی تعداد خیلی کمی از باکتری‌ها رشد کرده‌اند. در رقت ۱:۶۴۰ و ۱:۱۲۸۰ که به ترتیب رقت‌های MBC و MIC عصاره هستند تعداد قابل توجهی از باکتری‌ها پس از مدت زمان ۲۴ ساعت نابود شده‌اند ولی در رقت ۱:۲۵۶۰ و با کاهش غلظت عصاره تعداد بیشتری از باکتری‌ها نسبت به رقت‌های قبلی توانسته اند رشد کنند.

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهند که تمامی عصاره‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری مذکور می‌باشند به طوری که در بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با روش Well Diffusion agar مشخص شد که در رقت‌های ۱:۱۰ تا ۱:۱۶۰ عصاره‌ها قطر هاله‌های عدم رشد بیشتر از ۸ میلی‌متر بوده و این مقادیر در بالاترین میزان خود به ۳۰ میلی‌متر می‌رسند. هم‌چنین در بررسی میزان MIC و MBC عصاره‌ها مشخص شد که MIC و MBC عصاره آبی در رقت ۱:۸۰ و ۱:۴۰، عصاره اتانولی در رقت ۱:۲۵۶۰ و ۱:۱۲۸۰ و عصاره استونی در رقت ۱:۱۲۸۰ و ۱:۶۴۰ می‌باشد که این مقادیر نشان دهنده اثرات ضد میکروبی قوی عصاره‌های اوکالیپتوس علیه بروسلا ملی تنسیس ۱۶M می‌باشند. هم‌چنین در بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها در مدل حیوانی مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود دارد به طوری که در غلظت MBC عصاره‌ها، تعداد قابل توجهی از باکتری‌های طحالی از بین رفته بودند(۱۷).

لنفوسیت‌های-T و ماکروفاژها مهم‌ترین سلول‌های ایمنی دخیل در نابودی بروسلا در بدن میزبان محسوب می‌شوند. ماکروفاژها با فاگوسیتوز باکتری سعی در از بین بردن بیماری دارند و لنفوسیت‌های-T با ترشح

Archive of SID

www.SID.ir

سایتوکاین‌ها باعث فعال سازی و افزایش قدرت ماکروفاژها می‌شوند(۱۸). تا به حال مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی باکتری‌های داخل سلولی مانند بروسلا انجام نشده است و برای اولین بار نشان دادیم که عصاره‌های اوکالیپتوس دارای اثر ضد باکتریایی علیه بروسلای درون ماکروفاژی می‌باشند و رقت‌های MBC، MIC و Sub-MIC تمام عصاره‌ها اثر قابل توجهی در از بین بردن باکتری‌ها در داخل ماکروفاژ دارا می‌باشند. لذا عصاره‌های تهیه شده توانایی نفوذ به سلول‌های یوکاریوتی و سلول‌های ایمنی را جهت از بین بردن میکروب‌ها دارند.

در مطالعه‌ای که توسط ویگو و همکاران انجام گرفت مشخص شد که عصاره‌های اوکالیپتوس در تمامی غلظت‌های استفاده شده فاقد اثر توکسیک بر روی سلول‌های ماکروفاژی موش هستند اما نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌ها در غلظت‌های بالا دارای اثر توکسیک بر روی ماکروفاژها بوده و با کاهش غلظت عصاره‌ها این اثر مهاری کاهش می‌یابد. آنها در مطالعات خود نشان دادند که عصاره‌های این گیاه به طور قابل توجهی باعث از بین رفتن رادیکال‌های NO و مهار بیان ژن‌های iNOS می‌شود(۱۹). با توجه به نتایج می‌توان اذعان داشت که ترکیبات موجود در عصاره‌های اوکالیپتوس علاوه بر اثر ضد میکروبی بر روی بروسلا، در فعال نمودن سلول‌های فاگوسیت کننده بروسلا برای از بین بردن باکتری نیز نقش دارند. در تحقیق دیگری سرافینو و همکاران اثر ترکیبات اوکالیپتوس را بر روی سلول‌های MDMs (monocyte derived macrophage) انسان بررسی کردند. ایشان نتیجه گرفتند که اوکالیپتوس باعث تحریک و افزایش قدرت فاگوسیتوزی سلول‌های سیستم ایمنی در انسان می‌شوند(۲۰). در مطالعه دیگری شاپوری و همکاران اثر عصاره کلروفرمی سیر را بر روی فعالیت ماکروفاژی صفاقی موش بالب سی 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 که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد(۲۱). هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان دادند که عصاره‌های گیاه رازک در رقت‌های MBC و MIC باعث حذف تعداد قابل توجهی از باکتری‌های بروسلا در داخل ماکروفاژها می‌شوند(۲۲).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج تحقیق حاضر مشخص می‌شود که عصاره‌های اوکالیپتوس توانایی از بین بردن بروسلا را در داخل ماکروفاژ دارا می‌باشند، لذا با توجه به مشکلات و محدودیت‌های ذکر شده در مورد رژیم‌های دارویی در درمان این بیماری، استفاده از این گیاه و عصاره‌های آن در درمان بروسلوزیس می‌تواند مفید باشد. البته برای قضاوت کلی باید مطالعات جامع‌تر نیز انجام گیرد که این مطالعات اهداف آتی این تحقیق می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان در پایان از زحمات و همکاری‌های مسئولین مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان نهایت تشکر و قدردانی را دارند. این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی می‌باشد.

منابع

1. Godfroid J, Käsbohrer A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):135-45.

Archive of SID

www.SID.ir

2. Moreno E. Brucellosis in Central America. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):31-8.
3. World Health Organization. Fact sheet N173, July 1997. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
4. Gorvel JP, Moreno E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):281-97.
5. Trujillano-Martín I, García-Sánchez E, Fresnadillo MJ, García-Sánchez JE, García-Rodríguez JA, Montes Martínez I. In vitro activities of five new antimicrobial agents against Brucella melitensis. Int J Antimicrob Agents. 1999;12(2):185-6.
6.Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
7. Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2003;7(3):173-82.
8. Solera J, Espinosa A, Martínez-Alfaro E, Sánchez L, Geijo P, Navarro E, et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline and gentamicin. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41(1):80-4.
9. Oyedeji A, Ekundayo O, Olawore O, Adeniyi B, Koenig W. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. Fitoterapia. 1999; 70(5): 526-8.
10. Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of Eucalyptus globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine. 2010; 17(13): 1061-6.
11. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol. 2001;74(2):113-23.
12. Mohsen Nezhad F, Zeigham H, Mota A, Sattari M, Yadegar A. Antibacterial activity of Eucalyptus extracts on methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Research Journal of Biological Sciences. 2009;4(8):905-8.
13. Oliveira SC, Soeurt N, Splitter G. Molecular and cellular interactions between Brucella abortus antigens and host immune responses. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):417-24.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Abdolahzade P, Shapouri R, Nasiri Semnani S. Antibacterial Effects of Eucalyptus globulus Extracts on Brucella melitensis M16 and Brucella abortus S99 In Vitro and In Vivo. J Ardabil Univ Med Sci. 2011;11(3):218-27.
18. Rittig MG, Alvarez-Martinez MT, Porte F, Liautard JP, Rouot B. Intracellular survival of Brucella spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. Infect Immun. 2001;69(6):3995-4006.
19. Vigo E, Cepeda A, Gualillo O, Perez-Fernandez R. In-vitro anti-inflammatory effect of Eucalyptus globulus and Thymus vulgaris: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. J Pharm Pharmacol. 2004; 56(2): 257-63.
20. Serafino A, Sinibaldi Vallebona P, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, et al. Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. BMC Immunol. 2008;9:17.
21. Shapoury R, Satari M, Zoheyr M. Antimicrobial effect of choloroformic extract of Garlic (Allicin) on brucella melitensis (Rev 1) & brucella abortus (S19). Daneshvar Medicine. 2004;12(53):21-4.
22. Shapouri R, Rahnema M. Evaluation of antimicrobial effect of hops extracts on intramacrophages Brucella abortus and B. melitensis. Jundishapur Journal of Microbiology. 2011;4(1):S51-S8.

Archive of SID

www.SID.ir