اثرات باکتری کشی عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی بروسلا آبورتوس S۹۹ درون ماکروفاژی

پیمان عبداله‌زاده[۱]، دکتر رضا شاپوری[۲]*، دکتر شهرزاد نصیری سمنانی[۳]

تاریخ دریافت 1392/02/11 تاریخ پذیرش 1392/04/11

چکیده

پیش زمینه و هدف: بروسلوزیس یک بیماری مشترک انسان و دام با گسترش جهانی بوده که توسط بروسلاها ایجاد می‌شود. آن‌ها پاتوژن‌های داخل سلولی اختیاری بوده که در داخل ماکروفاژها و سلول‌های فاگوسیت کننده غیرحرفه‌ای تکثیر می‌یابند. مشاهدات نشان می‌دهند که گیاهان دارویی می‌توانند به طور موفقیت آمیز در درمان بیماری‌های باکتریایی بکار برده شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات باکتری کشی عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی بروسلا آبورتوس S۹۹ درون ماکروفاژی می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی برگ‌های اوکالیپتوس تهیه شدند. سپس اثر عصاره‌ها بر بقای داخل ماکروفاژی بروسلا آبورتوس S۹۹ با کشت سلولی از ماکروفاژهای صفاقی موش Balb/c 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: نتایج نشان دادند که عصاره‌های اوکالیپتوس دارای فعالیت ضدمیکروبی بر روی بروسلا آبورتوس S۹۹ درون ماکروفاژی بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت می‌باشند.

نتیجه گیری: در مجموع نتایج کشت سلولی نشان داد که عصاره‌های اوکالیپتوس دارای فعالیت باکتری کشی بر روی بروسلا آبورتوس S۹۹ درون ماکروفاژی بوده و عصاره اتانولی بیشترین فعالیت ضد میکروبی موثر بر روی بروسلای درون ماکروفاژی دارد.

کلید واژه‌ها: اثرات ضد باکتریایی، بروسلا آبورتوس S۹۹ ، عصاره‌های اوکالیپتوس، کشت سلولی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره پنجم، ص ۳۶۳-۳۵۵، مرداد ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه و پزشکی، تلفن: ۰۲۴۱۴۲۲۱۰۳۰

Email: rezashapoury@yahoo.com

Archive of SID

مقدمه

بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام بوده که در اثر آلودگی با گونه‌های مختلف باکتری بروسلا ایجاد می‌شود. این بیماری انتشار جهانی داشته و باعث ایجاد خسارت‌های اقتصادی جبران ناپذیر در بخش دامداری و نیز در جوامع انسانی می‌گردد (۱). در ایران نیز این بیماری به صورت آندمیک بوده و میزان آن در سال‌های اخیر افزایش داشته است (۲). سازمان جهانی بهداشت (WHO) تعداد موارد جدید بیماری بروسلوز را در هر سال، ۵۰۰ هزار مورد جدید گزارش نموده است و این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلوز انسانی می‌باشد (۳).

بروسلا کوکوباسیل گرم منفی و داخل سلولی اختیاری بوده که در درون ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و در ارگان‌های بدن انسان مثل غدد لنفاوی، کبد، طحال، مغز استخوان و سیستم رتیکولواندوتلیال جایگزین می‌شود (۴). افزایش تعداد باکتری‌ها در بدن میزبان به دلیل توانایی آن‌ها در جلوگیری از ادغام فاگوزوم با لیزوزوم و توانایی تکثیر در داخل ماکروفاژها می‌باشد. بروسلاها بعد از ورود به سلول‌های بدن میزبان وارد سیستم

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، باشگاه پژوهشگران جوان، زنجان، ایران

[۲] استادیار، دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران

www.SID.ir

رتیکولواندوتلیال شده و قرارگیری در این مکان باعث ماندگاری و عفونت زایی آن‌ها می‌شود و در واقع جنبه کلیدی عفونت زایی بروسلا، توانایی آن در بقا و تکثیر در فاگوزوم‌های حرفه‌ای و غیرحرفه‌ای است (۹-۵). انتقال بیماری به انسان معمولاً از طریق تماس مستقیم با حیوان آلوده و یا محصولات دامی آلوده به ویژه لبنیات و نیز از طریق استنشاق ارگانیسم می‌باشد (۱۰). علائم بیماری غیراختصاصی بوده و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد. تظاهرات بیماری به صورت یک سندروم تب دار همراه با علائم سیستماتیک شامل لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی‌اشتهایی و کاهش وزن بوده و یا به صورت گرفتاری‌هایی مانند آرتریت، اسپوندیلیت، اندوکاردیت، مننژیت و غیره بروز می‌کند (۱۱). درمان بروسلوز با آنتی‌بیوتیک‌های رایج باعث کاهش درد و علائم بیماری، همچنین کاهش عود مجدد آن و سایر عوارض ثانویه بروسلوز می‌شود. اما به دلیل حضور باکتری‌ها در داخل سلول‌های میزبان، استفاده از داروهایی که قدرت نفوذ به درون سلول‌ها را داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد. در سال ۱۹۸۶ سازمان جهانی بهداشت رژیم دارویی داکسی سایکلین با ریفامپین یا استرپتومایسین را به مدت شش هفته به عنوان رژیم درمان استاندارد بروسلوز پیشنهاد نمود. اما هر کدام از این رژیم‌های درمانی دارای مضراتی می‌باشند؛ از جمله بروز عودهای مجدد و سمیت مخصوصاً در کودکان و زنان باردار. علاوه بر آن دوره طولانی درمان نیز برای بسیاری از بیماران قابل تحمل نمی‌باشد (۱۴-۱۲). لذا وجود مشکلات ذکر شده در رژیم درمانی بروسلوز، ما را بر آن داشت تا داروی گیاهی جدید که توانایی تاثیر بر روی بروسلا حتی در درون ماکروفاژ را دارا باشد معرفی نماییم.

استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های عفونی در سال‌های اخیر روند رو به افزایش پیدا کرده است. استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی جهت درمان بیماری‌های عفونی منجر به ظهور ایزوله‌های مقاوم میکروبی گردیده است. ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی، تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌نماید. گیاهان و ترکیبات آن‌ها شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای توان بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند (۱۵). این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی بسیار کمتر می‌باشد (۱۶). اوکالیپتوس[1] از اعضای خانواده میرتاسه[2] یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بوده که به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی متنوع در عصاره و اسانس خود به طور وسیعی در سراسر جهان در پزشکی سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله آنفلوانزا، اسهال خونی و بیماری‌های پوستی کاربرد داشته است (۱۸،۱۷). زیستگاه طبیعی این گیاه در استرالیا قرار دارد اما امروزه در سراسر جهان از جمله ایران گسترده شده است. مهم‌ترین ترکیب شیمیایی عصاره برگ اوکالیپتوس، او۸-سینئول[3] یا اکالیپتول[4] می‌باشد که این عصاره دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدالتهابی، ضدازدیاد قند خون، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی بوده و روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت از خود فعالیت ضدمیکروبی نشان داده است (۱۹،۱۷). از آنجا که بروسلا آبورتوس یکی از مهم‌ترین گونه‌های بیماری‌زا برای انسان محسوب می‌شود، در تحقیق حاضر از بروسلا آبورتوس S۹۹ استفاده شده است (۲۰). هدف از این بررسی معرفی ماده‌ای است که توانایی نفوذ به داخل سلول‌های میزبان را داشته و باعث حذف باکتری در داخل آن‌ها شود.

مواد و روش‌ها

برگ‌های تازه گیاه اوکالیپتوس از شهرستان اهواز جمع‌آوری و پس از شناسایی توسط گیاه‌شناسان، در سایه خشک گردیدند.

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه تجربی روی ۵ سر موش برای هر گروه آزمون با نژاد Balb/c و سن ۸-۶ هفته‌ای به وزن تقریبی ۵± ۲۵ گرم در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان انجام گرفت (۲۱). 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 توسط آسیاب برقی پودر شدند. ۱۰۰ گرم از پودر گیاهی را با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن نموده و آن را به نسبت ۱:۵ با آب مقطر، اتانول ۹۵درصد و استون مطلق (merck) مخلوط کردیم. مخلوط‌های حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری، سپس توسط گاز استریل ۴ لایه‌ای و قیف صاف گردیدند. 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 ROTIX DA50ساخت کمپانی HETTACHI) شدند. سپس عصاره‌های صاف شده به دستگاه تقطیر در خلأ برای خارج کردن حلال‌های مورد نظر منتقل شدند که در نهایت عصاره‌های غلیظی بدست آمدند. عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی

[1] Eucalyptus globulus
[2] Myrtaceae
[3] 1,8- Cineole
[4] Eucalyptol

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۴۵ میکرونی استریل و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای آزمایشات بعدی (بررسی اثر عصاره‌ها بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا) نگهداری شدند (۲۳،۲۲).

جداسازی ماکروفاژهای صفاقی از موش‌های ماده Balb/c:

برای افزایش تعداد ماکروفاژهای داخل صفاقی موش‌ها، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محیط تایوگلیکولات ۳درصد w/v (merck) به داخل صفاق موش‌ها تزریق کردیم. 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 پنج میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI 1640 (خریداری شده از شرکت SIGMA)حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی (FCS) و پنج 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 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 شد. رسوب حاصله یک بار با RPMI 1640 هپارینه حاوی ۱۰درصد FCS شستشو گردید (۲۷-۲۴).

بررسی اثر عصاره‌ها بر روی ماکروفاژها:

پس از تهیه ماکروفاژهای صفاقی از موش‌های Balb/c ماده ۸-۶ هفته‌ای، درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو شمارش و تعداد سلول‌های زنده (بی رنگ) و مرده (آبی رنگ) در زیر میکروسکوپ نوری و فرمول مربوطه محاسبه شد. سپس تعداد ماکروفاژها مورد شمارش قرار گرفت و ماکروفاژهای جمع‌آوری شده به میکروپلیت‌های کشت سلولی وارد ($۲/۷\times۱۰^{۳}$ ماکروفاژ در هر چاهک) و به همراه محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵درصد CO_2 گرماگذاری شد 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 شد. بعد از ۲۴ ساعت درصد ماکروفاژهای زنده مجدداً مورد بررسی قرار گرفتند (۲۷-۲۴).

بررسی اثر عصاره‌ها بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا:

پس از جدا سازی ماکروفاژهای صفاقی از موش‌ها و انتقال آن‌ها به میکروپلیت‌های کشت سلولی ($۲/۷\times۱۰^{۳}$ ماکروفاژ در هر چاهک)، به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵درصد CO_2 گرماگذاری شدند. سپس بروسلا آبورتوس S۹۹ به پلیت‌ها اضافه شده تا مقدار باکتری‌ها برابر با ۵×۱۰^{۵}cfu/ml شود. بعد از ۲ ساعت گرماگذاری در شرایط ذکر شده، بلع باکتری‌ها توسط ماکروفاژها با تهیه گسترش از چاهک‌های پلیت بر روی لام و رنگ آمیزی گیمسا بررسی و تایید شد. سپس جنتامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه و یک ساعت در شرایط ذکر شده گرماگذاری شد تا باکتری‌های خارج سلولی حذف شوند. بعد از این مدت زمان برای اطمینان از حذف باکتری‌های خارج سلولی از محیط کشت سلولی بر روی آگار کشت دادیم، 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 سالبن اضافه می‌شود) گرماگذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت، ماکروفاژها لیز و از درون چاهک‌ها جمع‌آوری و کشت داده شدند. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۷-۵٪ CO_2 به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند و تعداد باکتری‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها مورد شمارش قرا گرفتند (۲۷-۲۴).

آنالیز آماری:

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 شد و میانگین آن برای هر گروه لحاظ گردید. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۳ و آزمون آماری One Way ANOVA (Tukey) تحلیل شدند. در این مطالعه$p<0.01$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

نتایج شمارش تعداد ماکروفاژهای صفاقی موش:

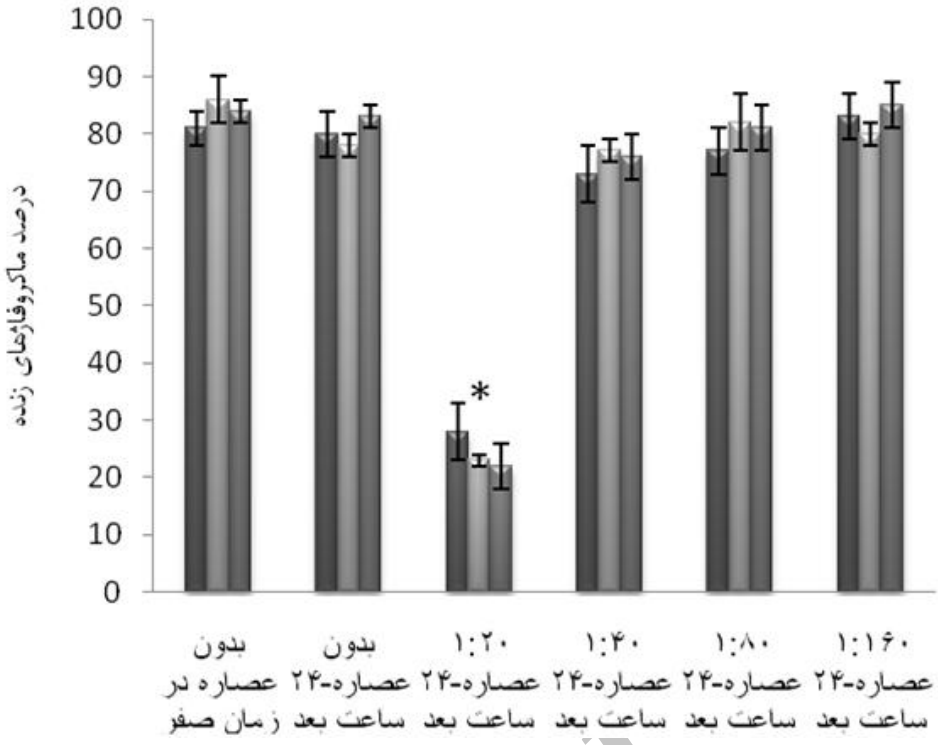
پس از جداسازی ماکروفاژهای صفاقی از موش‌ها، میانگین کلی محاسبه شده برای تعداد ماکروفاژها $۲/۷\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتایج بررسی اثر عصاره‌ها بر روی ماکروفاژها:

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که به جز رقت ۱:۲۰ عصاره‌ها، بقیه رقت‌ها اثر مهاری بر روی ماکروفاژها ندارند و می‌توان از این رقت‌ها برای بررسی اثر عصاره‌ها بر روی بروسلا در داخل ماکروفاژ استفاده کرد (نمودار ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره (۱): مقایسه میانگین و انحراف از معیار درصد ماکروفاژهای زنده در زمان صفر و ۲۴ ساعت بعد از تماس با عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با سایر رقت‌های عصاره‌ها با $p<0.01$

نتایج بررسی اثر عصاره‌ها 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 مولر هینتون آگار مورد شمارش قرار گرفت. نتایج نشان دادند که عصاره‌های اوکالیپتوس دارای فعالیت باکتری کشی بر روی بروسلا آبورتوس S۹۹ در داخل ماکروفاژ بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت می‌باشند. بطوریکه در غلظت‌های بالای هر سه عصاره فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها بیشتر است. بررسی آماری این نتایج با استفاده از آزمون آماری Tukey با سطح احتمال $p<0.01$ نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تمام گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود دارد (جدول ۱).

جدول شماره (۱): میانگین و انحراف از معیار تعداد بروسلا آبورتوس S۹۹ درون ماکروفاژی رشد کرده بر روی محیط مولر هینتون آگار بعد از لیز ماکروفاژها بر حسب CFU/ml بعد از تیمار با عصاره‌های آبی و آلی اوکالیپتوس (مقدار تلقیح اولیه CFU/ml ۱۰۵ × ۵)

رقت عصاره Mg/ml / عصاره	کنترل	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰	۱:۶۴۰	۱:۱۲۸۰	۱:۲۵۶۰	۱:۵۱۲۰
عصاره آبی	(۴۲±۲)×۱۰۴	* (۲۰±۱)×۱۰۲	* (۸۰±۲)×۱۰۲	* (۳۵±۲)×۱۰۳	* (۴۹±۲)×۱۰۳	-	-	-	-
عصاره اتانولی	(۳۹±۳)×۱۰۴	-	-	-	-	* (۶±۰.۶)×۱۰۲	* (۱۱±۱)×۱۰۲	* (۲۰±۱)×۱۰۲	* (۱۳±۲)×۱۰۳
عصاره استونی	(۴۵±۵)×۱۰۴	-	-	-	* (۴±۰.۵)×۱۰۲	*_* (۱±۰.۱)×۱۰۲	* (۳۵±۲)×۱۰۲	* (۴۶±۲)×۱۰۲	-

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p<0.01$

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه گیری

ماکروفاژها برای بقا و تکثیر بروسلاها طی بیماری بروسلوزیس نقش مهم و کلیدی دارند (۹-۵). در این مطالعه اثرات رقت‌های مختلف عصاره‌های گیاه دارویی اوکالیپتوس بر روی بقاء ماکروفاژها ارزیابی شد (نمودار ۱). این نتایج نشان دادند که رقت‌های MIC و MBC عصاره‌های اوکالیپتوس برای بروسلا، دارای خاصیت سمی بر روی ماکروفاژهای موش نیستند (نتایج مربوط به تعیین MIC و MBC عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی بروسلا آبورتوس S۹۹ قبلاً منتشر شده است)(۲۸). بنابراین ما از این رقت‌ها برای بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها بر روی بروسلای درون ماکروفاژی استفاده نمودیم. اما رقت‌های ۱:۱۰ و ۱:۲۰ عصاره‌های اوکالیپتوس برای ماکروفاژها سمی بوده و نباید برای کشت ماکروفاژی بکار برده می‌شدند. بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس بر روی بروسلا آبورتوس S۹۹ در شرایط In vitro و In vivo نشان می‌دهند که تمامی عصاره‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری مذکور می‌باشند بطوریکه در بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با روشagar well diffusion مشخص شد که در رقت‌های ۱:۱۰ تا ۱:۱۶۰ عصاره‌ها قطر هاله‌های عدم رشد بیشتر از ۱۵ میلی‌متر بوده و این مقادیر در بالاترین میزان خود به ۲۷ 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 آبورتوس S۹۹ 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 (۲۸).

نتایج جدول ۱ که مربوط به اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی اوکالیپتوس بر بقاء درون ماکروفاژی سویه S۹۹ است نشان می‌دهد که در رقت‌های MIC و MBC هر سه عصاره تعداد قابل توجهی از باکتری‌ها پس از مدت زمان ۲۴ ساعت از بین رفته‌اند ولی در رقت‌های بعدی با کاهش غلظت عصاره‌ها، میزان رشد باکتری افزایش یافته است. تا به حال مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اوکالیپتوس بر روی باکتری‌های داخل سلولی انجام نشده است و برای اولین بار نشان دادیم که عصاره‌های استخراج شده از اوکالیپتوس دارای فعالیت ضد میکروبی و باکتری کشی بر روی بروسلای درون ماکروفاژی می‌باشند و رقت‌های MIC و MBC عصاره‌ها دارای فعالیت قابل توجهی در از بین بردن بروسلاهای داخل ماکروفاژی بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت هستند (نمودار ۱). بنابراین عصاره‌های اوکالیپتوس توانایی نفوذ به سلول‌های یوکاریوتی و سیستم ایمنی جهت از بین بردن میکروب‌ها را دارا می‌باشند. همچنین ممکن است که آن‌ها برای درمان بیماری‌هایی که توسط باکتری‌های داخل سلولی مانند بروسلا ایجاد می‌شوند مفید باشند.

در یک بررسی جامع گیاهان دارویی و اثرات ضد باکتریایی آن‌ها توسط Srinivasan و همکاران، ۵۰ گیاه دارویی مورد ارزیابی وسیع قرار گرفت. این محققین نشان دادند که اوکالیپتوس دارای اثر باکتری کشی بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی (اشریشیا کولای، انتروباکتر فکالیس، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس میرابیلیس، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا پاراتیفی و سالمونلا تیفی) و گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس) می‌باشد (۲۹). همچنین اثر مهاری عصاره‌های آبی و الکلی اوکالیپتوس در شرایط in vitro بر روی سودوموناس آئروژینوزا توسط دکتر ستاری و همکاران در سال ۱۳۸۴ نشان داده شد. مطالعات آن‌ها نشان داد که عصاره‌های خام الکلی و آبی اوکالیپتوس به خوبی می‌توانند از رشد سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کنند. این محققین به این نتیجه رسیدند که از بین تمام مواد شناسایی شده از این گیاه، اوکالیپتول به عنوان بیشترین و مهم‌ترین ماده ضد میکروبی مطرح می‌باشد (۳۰). در سال ۱۳۸۵ دکتر جلالی و همکاران اثرات ضد لیستریایی گیاه اوکالیپتوس را بررسی کردند. نتایج حاصل از بررسی‌های آن‌ها نشان داد که عصاره هیدرو الکلی اوکالیپتوس در هر دو روش رقت لوله‌ای و انتشار دیسک دارای اثرات ضد باکتریایی بر روی لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد (۳۱). در مطالعه‌ای که توسط Vigo 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 (۳۲). شاپوری و همکاران نیز اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی گیاه دارویی رازک را بر روی فعالیت ماکروفاژی صفاقی موش Balb/c مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که این عصاره‌ها دارای فعالیت باکتری کشی بر روی بروسلا بوده و در رقت‌های مشخص باعث حذف بروسلاهای داخل ماکروفاژی می‌شوند که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (۲۱). در تحقیق دیگری توسط Lau و همکاران، اثر عصاره آبی سیر بر روی فعالیت ماکروفاژی صفاقی موش Balb/c و لنفوسیت‌های طحال حیوان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این

Archive of SID

www.SID.ir

محققین نشان داد که عصاره سیر باعث افزایش قدرت انفجار اکسیداتیوی و پاسخ‌های ماکروفاژها می‌شود. هم چنین باعث افزایش بلاستوژنز در لنفوسیت‌های T – می‌گردد (۳۳). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی استخراج شده از گیاه دارویی اوکالیپتوس قادر به از بین بردن تعداد قابل توجهی از باکتری‌های بروسلا آبورتوس S۹۹ درون ماکروفاژی می‌باشند. در انجام تحقیق حاضر محدودیت خاصی وجود نداشت ولی با توجه به عدم دسترسی به ماکروفاژهای انسانی از ماکروفاژهای موش استفاده کردیم که در صورت وجود ماکروفاژهای انسانی می‌توانستیم نتیجه مطالعه را به انسان نیز تعمیم دهیم. لذا می‌توان با انجام مطالعات بیشتر و مقایسه عصاره گیاهان اوکالیپتوس در مناطق جغرافیایی مختلف و نیز مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس گونه‌های مختلف اوکالیپتوس، از این گیاه در ساخت داروهای جدید علیه بیماری بروسلوز استفاده نمود. همچنین با مطالعه اثرات ارگانولپتیکی عصاره‌ها می‌توان استفاده از آن‌ها را به عنوان نگه‌دارنده در مواد غذایی پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

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

References:

1. Boschiroli ML, Foulongne V, Callaghan DO. Brucellosis: a worldwide zoonosis. Curr Opin Microbiol 2001; 4(1); 58-64.
2. Hashemi SH, Keramat F, Ranjbar M, Mamani M, Farzam A, Jamal Omidi S. Osteoarticular complications of brucellosis in Hamedan, an endemic area in the west of Iran. Int J Infect Dis 2007; 11(6): 496-500.
3. World Health Organization. Fact sheet N 173, July 1997. World Health Organization, Geneva Switzerland.
4. Turatbek B, Kozukeev S, Ayeilat E, Maes M. Favorov. Risk factors for brucellosis – leylek and kadamjay districts, bakten oblast kyrgyzstan jan-Nov 2003 MMWR 2006 April; 55(Scep.0-1): 31-4.
5. Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. Res Microbiol 2006; 157(2): 938.
6. Celli J, De Chastellier, Franchini DM, Pizarro Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J Exp Med 2003; 198(4): 545-56.
7. Chumakov MI, Kurbanova IV. Localization of the protein Vir-B1 involved in contact formation during conjugation among Agrobacterium cells. FEMS Microbiol Lett 1998; 168(2): 297-301.
8. Bellaire BH, Roop RM, Cardelli JA. Opsonized virulent Brucella abortus replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP1 positive phagosomes in human monocytes. Infect Immun 2005; 73(6): 3702-13.
9. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro. Infect Immune 1990; 58(7): 2320-8.
10. Godfroid J, Kasbohrer A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty–first century. Vet Microbiol 2002; 90: 135-45.
11. Moreno E. Brucellosis in Centrall America. Vet Microbiol 2002; 90: 31-8.
12. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology, 4th Ed. Philadelphia: Mosby; 2002.P. 78-81.
13. Doganay M, Aygen B. Human brucellosis an overview. Int Infect Dis 2003; 7: 173-82.
14. Solera J, Espinoza A, Martinez Alfao E. Treatment of human brucellosis with doxycyclosis and gentamycin. Antimicrobial Agents Chemother 1997; 41: 80-4.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Lakshmana Perumalsamy P. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. J Ethnopharmacol 2001; 74: 217–20.
16. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review 1999; 12: 564-82.
17. Adebola O, Olusegun E, Olayide N, Bolanle A, Adeniyic, Wilfried AK. Antimicrobial activity of the essential oils of five Eucalyptus species growing in Nigeria. Fitoterapia 1999; 70(5): 526-8.
18. 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.
19. Abdollahzade P, Shapouri R, Nasiri Semnani Sh, Alizade H. Evaluation of the antibacterial effects of Eucalyptus globulus extracts on intramacrophage Brucella melitensis 16M. Arak Med Uni J 2012; 14(6 Suppl 3): 55-63. (Persian)
20. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol 2002; 90: 81-110.
21. Shapouri R, Rahnema M. Evaluation of antimicrobial effect of hops extracts on intramacrophages Brucella abortus and B. melitensis. Jundishapur J Microbiol 2011; 4(Supplement 1): S51-S8.
22. Igbal A, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol 2001; 74(2): 113-23.
23. Mohsen Nezhad F, Zeighami H, Mota A, Sattari M, Yadegar A. Antibacerial activity of Eukalyptus extracts on methicillin resistance Staphylococcus aureus. Res J Biol Sci 2009; 4(8): 905-8.
24. Gorvel JP and Edgardo M. Brucella intracellular life: invasion to intracellular replication. Vet Microbiol 2002; 90: 281-97.
25. Olivera SC, Soeurt N, Splitter G. Molecular and cellular interactions between Brucella abortus antigens and host immune responses. Vet Microbiol 2002; 90: 417-24.
26. Pei J, Turse JE, Ficht TA. Evidence of Brucella abortus OPS dictating uptake and restricting NF-kB activation in murine macrophages. Microbes Infect 2008; 10: 582-90.
27. Sun YH, Den Hartigh AB, De Lima Santos R, Adams LG, Tsolis RM. VirB-mediated survival of Brucella abortus in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxid synthase or NADPH oxidase in macrophages. Infect Immun 2002; 70: 4826-32.
28. Abdolahzade P, Shapouri R, Nasiri Semnani SH . Antibacterial effects of Eucalyptus globulus extracts on Brucella melitensis 16M and Brucella abortus S99 in vitro and in vivo. J Ardabil Univ Med Sci 2011; 11(3): 218-27. (Persian)
29. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Lakshmana Perumalsamy P. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. J Ethnopharmacol 2001; 74: 217–220.
30. Sattari M, Shahbazi N, Najar Peeryeh S. An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of Eucalyptus leaves on Pseudomonas aeruginosa. J Med Sci 2006; 8(5): 19-23. (Persian)
31. Jalali M, Abedi D, Ghasemi Dehkordi N, Chaharmahali A. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against Listeria monocytogenesis. J Shahrekord Univ Med Sci 2006; 8(3): 25-33. (Persian)
32. Vigo E, Cepeda A, Gualillo O, Perez Fernandez R. In-vitro anti-inflammatory effect of Eucalyptus globulus and Thymus vulgaris: nitric oxide

Archive of SID

www.SID.ir

Lymphocyte functions. Mol Biother 1991; 3(2): 103-7.

inhibition in J774A.1 murine macrophages. J Pharm Pharmacol 2004; 56(2): 257-63.

33. Lau BH, Yamasaki T, Gridley DS. Garlic compounds modulate macrophage and T-

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

BACTERICIDAL EFFECTS OF EUCALYPTUS GLOBULUS EXTRACTS ON INTRAMACROPHAGE BRUCELLA ABORTUS S99

Peyman Abdolahzadeh[1], *Reza Shapouri*[2*], *Shahrzad Nasiri Semnani*[3]

Received: 1 May , 2013; Accepted: 2 Jul , 2013

Abstract

***Background & Aims*:** Brucellosis is a worldwide zoonotic disease that caused by *Brucella spp*. They are facultative intracellular pathogens which replicate inside macrophages and in non professional phagocytes cells. The experiences show that medicinal plants can be used successfully to treat bacterial diseases. The aim of this study is evaluation of bactericidal effects of *Eucalyptus globulus* extracts on intramacrophage *Brucella abortus S99.*

Material & Methods: In this study aquatic, ethanolic and acetonic extracts of *Eucalyptus globulus* leaves prepared. Then effect of extracts on intramacrophge surviving of *B. abortus S99* studied on cell culture of Balb/c mice peritoneal macrophages. Therefore, after lysis of macrophages, preparation of serial dilution and culture on Muller-Hinton Agar media, number of grown CFU counted.

Results: Results indicated that *Eucalyptus globulus* extracts have antimicrobial activity on intramacrophage *B. abortus S99* after 24h.

Conclusion: Overall cell culture results indicated that *Eucalyptus globulus* extracts have bactericidal activity on intramacrophage *B. abortus S99* and ethanolic extract has the most effective antimicrobial activity on intramacrophage brucellae.

Key words: Antibacterial activity*, Brucella abortus S99, Eucalyptus globulus* extracts, Cell culture.

Address: Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
Tel:+982414221030
Email: rezashapoury@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(5): 363 ISSN: 1027-3727

Archive of SID

[1] *MSc of Microbiology, Young Researchers Club, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran*
[2] *Assistant Professor of Bacteriology, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran*

www.SID.ir