

Evaluation of the antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* extracts on intramacrophage *Brucella melitensis* 16M

Abdollah-zade P(M.Sc)¹, Shapouri R(Ph.D)^{2*}, Nasiri-Semnani Sh(Ph.D)³, Alizade H(M.Sc)¹

1- Department of Microbiology, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran

2- Department of Bacteriology, Biology Research Center, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran

3- Department of Physiology, Biology Research Center, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: 8 Oct 2011, Accepted: 18 Jan 2012

Abstract

Background: Brucellosis is caused by brucella which is a facultative intracellular pathogen invading both professional and nonprofessional phagocytic cells. *Eucalyptus globulus* is one of the most widely used medicinal plants in folk medicine throughout the world. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* extracts on intramacrophage *Brucella melitensis* 16M.

Materials and Methods: In this experimental study, after preparing aquatic, ethanolic, and acetic extracts of *Eucalyptus globules*, the effect of the extracts on intramacrophage survival of *B. melitensis* 16M obtained from cell culture of Balb/c mice peritoneal macrophages was studied. In order to do this, after lysis of macrophages, through preparation of serial dilutions and culture on Mueller Hinton agar medium, the number of colonies grown was counted.

Results: The maximum antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* extracts on intramacrophage *B. melitensis* 16 M were in 1:40 dilution (21.62 mg/ml) of the aquatic extract, 1: 640 dilution (1.26 mg/ml) of the ethanolic extract, and 1:320 dilution (2.59 mg/ml) of the acetic extract after 24h.

Conclusion: Aquatic, acetic, and ethanolic extracts of *Eucalyptus globulus* possess antimicrobial properties against intramacrophage *B. melitensis* 16M and ethanolic extract has the most effective antimicrobial activity on intramacrophage *Brucella melitensis*; therefore, these extracts can be useful in treatment of brucellosis.

Keywords: Antibacterial activity, *Brucella melitensis* 16M, Cell culture, *Eucalyptus globulus* extracts, Macrophage

*Corresponding author:

Address: Department of Bacteriology, Biology Research Center, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran
Email: rezashapoury@yahoo.com

ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره اوکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*) بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M درون ماکروفازی

پیمان عبدالله 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 ماکروفازی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی برگ‌های اوکالیپتوس، اثر عصاره‌ها بر بقای داخل ماکروفازی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M با کشت سلولی از ماکروفازهای صفاقی موش بلب سی مطالعه گردید. به این منظور پس از لیز ماکروفازها، 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 ماکروفازی بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت در رقت‌های ۱:۴۰ (۲۱/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره آبی و ۱:۶۴۰ (۱/۲۶ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره اتانولی و ۱:۳۲۰ (۲/۵۹ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره استونی بود.

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

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

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

Email: rezashapoury@yahoo.com

مقدمه

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 ریفاپیمین 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 بروسلوز 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، ۸-سیننول یا اوکالیپتول است که در پزشکی

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 بروسل‌شناسایی 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 علائم و کاهش عود بیماری و سایر عوارض آن می‌شود اما به دلیل

آب مقطر، اتانول ۹۵ درصد و استون مطلق (نسبت ۱:۵) 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 بلب 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 $200 \times g$ 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 بلب سی ۸-۶ هفته‌ای در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰

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 بلب سی (Balb/c) با سن ۸-۶ هفته‌ای به وزن تقریبی 25 ± 5 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

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 سانتی‌گراد با ۵-۷ درصد CO_2 به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند و تعداد باکتری‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها مورد شمارش قرار 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.

یافته‌ها

پس از جدا سازی ماکروفاژهای صفائی از موش‌ها به طور متوسط ۱۰ نمونه مورد شمارش قرار گرفته و میانگین کلی محاسبه شده برای تعداد ماکروفاژها $2/7 \times 10^6$ سلول در هر میلی‌لیتر بود.

جهت بررسی اثر عصاره‌های 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

درصد سرم جنین گاوی (FCS) و ۵ واحد هیپارین 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 ($100 \times$ نسبت تعداد سلول‌های زنده به کل سلول) محاسبه شد. پس از شمارش تعداد ماکروفاژها، ماکروفاژهای جمع‌آوری شده به میکروپلیت‌های کشت سلولی وارد ($2/7 \times 10^3$ 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).

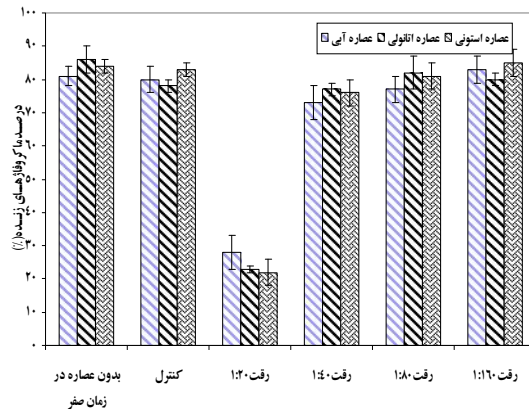
بررسی اثر عصاره‌ها بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا

پس از جدا سازی ماکروفاژهای صفائی و انتقال به میکروپلیت‌های کشت سلولی ($2/7 \times 10^3$ 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 5×10^5 Cfu/ml (باکتری در هر میلی‌لیتر) 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 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

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 میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره آبی و ۱:۶۴۰ (۱/۲۶ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره اتانولی و ۱:۳۲۰ (۲/۵۹ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره استونی بودند. بررسی آماری در سطح احتمال $p < 0.01$ اختلاف معنی‌داری بین تمام گروه‌های آزمون و گروه کنترل نشان می‌دهد (جدول ۱).

بررسی اثر عصاره‌ها بر روی بروسلا در داخل ماکروفاژ استفاده کرد (نمودار ۱).



نمودار ۱. 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

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار تعداد بروسلا ملی تنسیس 16M درون ماکروفاژی رشد کرده بر روی محیط آگاردار بعد از لیز ماکروفاژها بر حسب CFU/ml بعد از تیمار با عصاره های آبی و آلی اوکالیپتوس (مقدار تلقیح اولیه 5×10^5 CFU/ml)

عصاره	دقت	کنترل	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰
عصاره آبی	$(44 \pm 1) \times 10^4$	$(16 \pm 2) \times 10^2$	$(11 \pm 3) \times 10^2$	$(3 \pm 1) \times 10^3$	$(4 \pm 1) \times 10^3$	$(4 \pm 1) \times 10^3$
عصاره اتانولی	$(39 \pm 5) \times 10^4$	50 ± 10	70 ± 5	$(28 \pm 1) \times 10^2$	$(13 \pm 1) \times 10^3$	$(13 \pm 1) \times 10^3$
عصاره استونی	$(40 \pm 5) \times 10^4$	40 ± 5	$(14 \pm 1) \times 10^2$	$(39 \pm 3) \times 10^2$	$(45 \pm 1) \times 10^2$	$(45 \pm 1) \times 10^2$

* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p < 0.01$

بحث

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

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 سوبیه‌های بروسلا طی بیماری بروسولوزیس اهمیت به سزایی دارند، به همین علت در مقابل آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان بروسولوز 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).

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 توانسته‌اند 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 ۱:۶۴۰ و ۱:۱۲۸۰ 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

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 (Minimum Inhibition MIC و Concentration) (Minimum Bactericidal MBC و Concentration) عصاره‌ها بر روی ماکروفاژها فاقد اثر ات سمی می‌باشند و تنها در رقت ۱:۲۰ هر سه عصاره اثر مهار بر روی ماکروفاژها وجود دارد و در رقت‌های پایین‌تر این اثر مهار مشاهده نمی‌شود و می‌توانیم در این رقت‌ها اثر ضد میکروبی عصاره‌ها را بر بروسلا 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 باکتری‌ها 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

مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات آنها نشان داد که آلیسین موجود در سیر در رقت‌های مشخص باعث حذف بروسلای 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). هم چنین 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.

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 کلروفومی سیر را بر روی فعالیت ماکروفاژی صفاقی موش بآلب سی

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. Oyediji 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, Tsois 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. Abdolazhade 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 chloroformic 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.