



## بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره هیدروالکلی (*Urticadioica*L.) و مقایسه اثر درمانی آن با داروی سیپروفلوکساسین علیه باکتری‌های شایع جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری بیمارستان ولی عصر (عج) مشکین شهر

حجت اقبال

گروه فیتوشیمی مرکز تحقیقات علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
Email: hojat.eg@gmail.com

امید موذن زاده

گروه زیست‌شناسی، شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز، مشکین شهر، ایران

علی اصغر کاظم زاده

گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

ثمین امیرزاده

گروه داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

مصرف گیاهان دارویی از گذشته جهت درمان بیماری‌ها مد نظر بوده است. از این میان بیماری‌های عفونی نیز اهمیت قابل ملاحظه‌ای داشته‌اند. با توجه به اثرات آنتی باکتریالی گزنه و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، جایگزین کردن آن‌ها توسط داروهای ضد میکروبی با منشأ گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است. ترکیبات فنلی گیاه گزنه پس از جمع‌آوری و عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری گردید، سپس با هدف بررسی خاصیت ضد میکروبی با دو روش Disk diffusion و MIC در برابر باکتری‌های شایع عفونت مجاری ادراری در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ با ۳ تکرار انجام گردید. ترکیبات فنلی مثل کلورژنیک اسید (۲۸/۱٪)، روتین (۲۵/۲٪)، میریستین (۱۰/۶٪) و وانیلیک اسید (۹/۲٪) با استفاده از دستگاه HPLC به دست آمد. بیش‌ترین قطر هاله مربوط به اسینتوباکتر کالکوآستیکوس با قطر ۲۱ میلی‌متر و کم‌ترین آن مربوط به انتروکوکوس فکالیس با قطر ۴ میلی‌متر بود. بر اساس نتایج به دست آمده از تست MIC، باکتری انتروکوکوس فکالیس بیش‌ترین حساسیت را با حداقل غلظت مهاری ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و باکتری انتروباکتر ائروژنز کم‌ترین حساسیت را نسبت به عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه از خود نشان دادند. می‌توان گفت که عصاره هیدروالکلی گزنه می‌تواند جایگزین مناسب دیگری برای درمان عفونت مجاری ادراری باشد. در ادامه لازم است مطالعات بیش‌تر و دامنه داری در شرایط *in vivo* انجام شود تا بتوان این عصاره گیاهی را به‌عنوان یک فرآورده جدید معرفی نمود.

**کلیدواژه:** ضد میکروبی، عصاره، *Urtica dioica* L، عفونت مجاری ادراری، HPLC، MIC.

## مقدمه

عفونت مجاری ادراری از عفونت‌های شایع، به ویژه در زنان، افراد مسن، نوزادان و از مشکلات حاد سازمان‌های متولی بهداشت کشورهای مختلف محسوب می‌شوند، و از نظر فراوانی رتبه دوم را پس از بیماری‌های تنفسی دارد [۲۷]. آمار جهانی نشانگر آن است که بیش از ۲۵۰ میلیون نفر در سال به این بیماری مبتلا می‌شوند [۱۵]. از جمله باکتری‌های شایع در این بیماری می‌توان به اشرشیاکلی، پروتئوس ولگاریس، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس، اپیدرمایدیس، انتروباکتر، سیتروباکتر، سودوموناس آئروژینوزا اشاره نمود [۳۵].

درمان عفونت‌های ادراری بیش‌تر با آنتی‌بیوتیک صورت می‌گیرد ولی گزارش مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها هر روز در حال افزایش است. بر اساس تحقیقات انجام گرفته در زمینه شناسایی عوامل بیماری‌زا و تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها مشخص شده است که میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین در بین باسیل‌های گرم منفی تیره انتروباکتریاسه به‌ویژه در جنس کلبسیلا با مقاومت ۱۰۰ درصد چشم‌گیر است. هم‌چنین میزان مقاومت در بین سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس - اورئوس بین ۹۰ تا ۷۰ درصد و در مورد سایر استافیلوکوک - های کواگولاز منفی ۶۰ درصد می‌باشد [۲۷].

در تحقیقات مشابه دیگر علیه باکتری‌های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری نشان داده شده است که میزان مقاومت نسبت به داروهای ونکومايسين، تتراسیکلین و آمپی‌سیلین به ترتیب ۹/۸۹ و ۳/۴۷، ۸۸ درصد می‌باشد [۲۶]. لذا تحقیق در جهت شناسایی ترکیبات ضد میکروبی جدید با منشأ طبیعی، روز به روز در حال افزایش است. گیاهان عالی دارای متابولیت‌های ثانویه فراوانی می‌باشند که می‌توانند به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع دارویی با اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی جدید شمرده شوند [۲۸]. در طب

سنتی ایران استفاده از گیاهان دارویی در درمان سوختگی‌ها، ناراحتی‌های پوستی، بیماری‌های عفونی، سپتی سمی و التهاب متداول است [۳۰].

عوارض جانبی متعدد آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی و هم‌چنین مقاومت دارویی ایجاد شده در باکتری‌ها، علیه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ادراری، موجب گشته تا تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی، با اثرات درمانی مشابه یا حتی بهتر، بدون داشتن عوارض جانبی ادامه یابد. این مطالعه به منظور مقایسه فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه بر روی باکتری‌های شایع عفونت ادراری جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بخش عفونی بیمارستان ولی عصر مشکین شهر انجام شد.

## گیاه‌شناسی گزنه

گیاه گزنه با نام علمی *Urtica dioica* L. از خانواده *Urticaceae* یک گیاه چند ساله است، به طور گسترده‌ای در مناطق گرمسیری و معتدل در سراسر جهان توزیع شده است، گیاهی پایا، دو پایه، علفی، سبز، ایستاده دارای کرک‌های گزنده که ارتفاع آن به ۱۲۰-۵۰ سانتی‌متر می‌رسد، ساقه متعدد، راست، کمی زاویه‌دار، چهار پهلو و کمی ضخیم، ساده و یا خیلی کم منشعب، پوشیده از کرک‌های گزنده است. برگ‌ها دم برگ‌دار، سبز روشن در دو سطح پوشیده از کرک گزنده، گل تک جنس، بسیار ریز، سبز خام و مجتمع در توده‌های کوچک کروی می‌باشد [۱]، و پس از لمس آن ترشحات سوزاننده‌ایی از جنس اسید فرمیک وارد پوست می‌شود [۱۹-۲].

نام گزنه از کلمه *Uro* یا *aurere* که به معنای سوزنده یا نیش است گرفته شده است، نام بومی گیاه در هندی و پنجابی - *Bichu BUTTI*، در زبان سانسکریت *Vrishchhiyaa* - *shaaka*، در طب یونانی *Anjuraa* است [۳۰-۴]. در دوران قدیم، از گزنه برای درمان درد مفاصل و یا برای تحریک گردش خون در اندام‌های فلج استفاده می‌کردند [۹]. گزنه

اگزما، کم‌خونی، نفرت، هماچوری، زردی و اسهال استفاده می‌شود [۳۹-۳۸-۱۶].

این گیاه دارای فعالیت‌های مختلف دارویی [۳۱-۲۹] از جمله آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد زخم معده [۲۲-۱۱] ضد کولیت، ضد ویروس، ضد سرطان، ضد باکتری، ضد میکروبی، ضد قارچ، ضد آندروژنی، حشره کش، کاهنده قندخون، ضد درد، کاهش فشارخون، محافظت کبدی و آرتريت روماتوئید می‌باشد. زدن برگ گزنه بر روی مفاصل درمانی برای آرتريت، روماتیسم مزمن و فقدان قدرت عضلانی در نظر گرفته شده است. هم چنین ضماد آن برای بر طرف شدن نقرس، درد سیاتیک و مفصلی به کار گرفته میشود و در طب سنتی ایران به عنوان یک داروی کاهنده گلوکز معرفی شده است، گیاه گزنه به‌عنوان داروی ضد فشار خون و ضد چربی نیز شناخته شده است و گزارش‌های متنوعی از کاربرد و مصرف گزنه در بیماری هیپرپلازی پروستات، التهاب آرتريت روماتوئید و ریت آلرژیک و هم چنین در تقویت مو، تقویت دستگاه هاضمه، افزایش شیر در زنان شیرده، برطرف کننده اخلاط خونی و پاک کننده اخلاط سینه، ریه و معده، رفع گرفتگی‌های کبدی، تقویت نیروی جنسی، التیام بخش زخم‌ها و کاهش درد نقرس، برطرف کننده دردهای عضلانی و درمان کننده بواسیر در دسترس می‌باشد.

گزنه دارای اثر مدر است و اثر دیورتیک این گیاه با افزایش دفع کلر و اوره همراه است. ثابت شده که مصرف ۱۴ روزه این گیاه موجب کاهش وزن بدن و کاهش فشار سیستولیک می‌گردد. برگ گزنه منجر به کاهش التهاب می‌گردد. ریشه گزنه پرولیفراسیون سلولی در بافت‌ها، هیپر پلاستیک خوش-خیم پروستات و فعالیت اتصالی گلوبین متصل شونده به سلول‌های جنسی را مهار می‌کند [۲۴-۱۸-۱۳].

دارای تانن، لسیتین، اسیدفرمیک، نترات پتاسیم و کلسیم، ترکیبات آهن دار و دارای انواع مختلفی از ویتامین‌ها است [۶-۵]. گزنه دارای گونه‌های متعددی است (۳۰ الی ۴۵ گونه)، ولی سه گونه عمده آن از نظر دارویی مورد توجه هستند و در ایران نیز یافت می‌شوند که عبارتند از: گزنه درشت (U. dioica L.)، گزنه کوچک (U. urens L.) و گزنه یونانی (U. pilulifera L. [۳۲]). نکته قابل ذکر این است که سه گونه تفاوت چندانی با هم ندارند و دو گونه U. dioica و U. urens از زمان‌های بسیار دور مورد توجه قرار داشته و از گونه‌های مهم به شمار می‌آیند. گزنه کبیر یا دو پایه با نام علمی Urtica dioica L. در کتب طب سنتی با نام انجره کبیر یا نبات النار نیز شناخته می‌شود. این گونه بومی اروپا، شمال آسیا، شمال شرق آفریقا و شمال آمریکا می‌باشد [۷] که در تمام مناطق معتدل دنیا رویش دارد، به خصوص مناطق کشت نشده ازت‌دار، اطراف جاده‌ها، باغ‌ها، نواحی مرطوب خارج شهر و جاهایی که چهار پایان در آن به سر می‌برند به حالت خود رو می‌روید [۳۲].

برگ‌ها بخش دارویی گیاه گزنه را تشکیل می‌دهند. بهترین زمان برداشت و جمع‌آوری برگ‌های این گیاه از اردیبهشت ماه تا شهریور ماه می‌باشد، انتشار گیاه گزنه در نقاط مرطوب ایران، به خصوص نواحی شمالی، غربی، مرکزی و ارتفاعات ۳۰۰۰ متری می‌باشد و در شهرهای استان‌های: گلستان (علی‌آباد، بندرگز)، مازندران (نکا)، آذربایجان (مشکین شهر)، لرستان (پشت کوه، شهبازان)، خوزستان (بهبهان)، فارس (شیراز، خر موج)، کهگیلویه و بویر احمد (گچساران)، بوشهر، اصفهان، شاهرود، بسطام و کاشان به کثرت دیده می‌شود [۴۰-۲۳].

- اثرات فارماکولوژیکی گزنه

در طب سنتی، برگ و ریشه گیاه به عنوان یک تصفیه کننده خون، ادرار آور، قطع کننده خونریزی به خصوص قطع خونریزی از بینی و تحریک عادت ماهیانه، درمان روماتیسم،

## مواد و روش‌ها

- جمع آوری نمونه گیاه

گونه گیاه دارویی مورد نظر در تیرماه سال ۱۳۹۵ از بخش مرکزی شهرستان مشکین شهر واقع در شمال غربی ایران جمع آوری و پس از تایید در هر بار یوم بخش تحقیقات گیاهان دارویی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل به آزمایشگاه منتقل شد. هنگام جمع - آوری و برداشت گیاه در محل، مختصات جغرافیایی منطقه نمونه برداری در محدوده جغرافیایی بین ۴۷ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۴۸ درجه و ۵۴ دقیقه طول جغرافیایی و ۳۸ درجه و ۴ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۳۲ دقیقه عرض جغرافیایی و حدود ۱۲۹۸ تا ۱۳۰۸ متر ارتفاع از سطح دریا قرار داشت و متوسط حداکثر و حداقل دمای سالیانه این منطقه به ترتیب ۲۲ و ۳۴ درجه سانتی گراد و مجموع بارندگی سالیانه آن ۳۳۴/۶ میلی متر توسط دستگاه موقعیت سنج جغرافیایی (GPS) مدل Garmin گارمین ویستا Vista ثبت گردید.

در هنگام جمع آوری گیاه سعی شد که نمونه‌ها در فصل رشد مرحله‌ی فنولوژیکی جمع آوری گردد، که بیشترین متابولیت ثانویه را دارد. نمونه‌ها در یک فاصله زمانی بسیار کوتاه از اندام‌های هوایی گیاه در ساعات ۱۲ الی ۱۵ در اوج تابش خورشید به دلیل وجود بیشترین ماده موثره انجام شد.

- عصاره گیری

بعد از خشک شدن گیاه در دمای اتاق و در سایه، به وسیله آسیاب برقی و با استفاده از الک قسمت‌های هوایی گیاه به صورت پودر تهیه گردید. پودر تهیه شده گیاه در داخل بشر ریخته شد و جهت عصاره گیری به روش خیساندن، به نسبت ۸ به ۱ به آن اتانول ۹۶ درصد اضافه گردید و به مدت یک هفته در یخچال قرار داده شد. در طی این مدت ۲ بار بشرهای محتوی عصاره به مدت ۱۵ دقیقه به منظور استخراج بهتر و بیش تر ترکیبات موثر گیاه در دستگاه اولتراسوند قرار داده شدند [۲۵]. پس از آن محتویات داخل بشر بوسیله کاغذ

صافی و قیف شیشه‌ای صاف گردید. سپس توسط دستگاه روتاری مدل lab tech, Ev311 تغلیظ و جهت خشک شدن داخل پتری دیش ریخته و زیر هود قرار داده شد [۱۷]. همچنین عصاره‌های گیاهی استاندارد مورد نیاز جهت انجام HPLC نیز از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد.

- مشخصات دستگاه HPLC

در این مطالعه از دستگاه HPLC مدل KNAUER-Germany استفاده گردید. این دستگاه مجهز به دکتور UV مدل K ۲۵۰۰ و ستون C18 (Vertex) و همچنین دارای اندازه ذرات ۵ میکرومتر، طول ۲۵۰ میلی متر و قطر ۴ میلی متر بود.

- اندازه گیری ترکیبات فنلی گزنه با دستگاه HPLC

برای اندازه گیری ترکیبات فنلی از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC استفاده شد. برای این منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده به دستگاه HPLC تزریق گردید. آنالیز کمی و کیفی اسید کافئیک، اسید وانیلیک، naringin، اسید syringic و اسید ferulic، اسید ellagic، میریستین، کامپفرول ایزورامنتین، کاتچین، کلرژنیک اسید، P-کوماریک اسید، روتین، فوماریک و اسید گالیک موجود در نمونه گزنه انجام شد و تجزیه و تحلیل HPLC نیز با استفاده از برنامه شستشو مدرج انجام گردید. برنامه شستشو با استفاده از حلال‌های شستشوی A و B به شرح زیر انجام شد:

۰-۱۱ دقیقه، ۱۰۰٪ A، ۳۰-۴۰ دقیقه، ۳۵٪ A، B و ۶۵٪ و ۴۲-۰ دقیقه ۱۰۰٪ A. حلال A شامل ۲٪ اسید استیک، ۱۰٪ متانول و ۸۸٪ آب خالص، و B شامل ۲٪ اسید استیک، ۹۰٪ متانول و ۸٪ آب خالص است. سرعت جریان ۱ میلی لیتر/دقیقه، درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد، و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر می‌باشد. از سوی دیگر، با توجه به حداکثر جذب استاندارد، تجزیه و تحلیل در طول موج‌های ۲۵۴، ۲۷۰، ۲۸۰، و ۳۷۰ نانومتر انجام شد. برخی از نمونه کروماتوگرام در شکل ۲ نشان

داده شده است. کروماتوگرام استاندارد در شکل ۳ نمایش داده شده است.

#### - سویه‌های باکتریایی

در این مطالعه تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گزنه بر باکتری‌های شایع عفونت ادراری جدا شده از ادرار بیماران بستری مبتلا به عفونت مجاری ادراری در بخش داخلی بیمارستان حضرت ولی عصر (عج) مشکین شهر مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری‌ها شامل: اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، پروتئوس میرابیلیس، انتروکوکوس فکالیس، کلبسیلا پنومونیه، اسینتوباکتر کالکوآستیکوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، سیتروباکتر فرودی، انتروباکتر اثرورژنز، سودومونس آثرورژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند.

این باکتری‌ها پس از کشت ادرار بیماران بر روی محیط‌های کشت میکروبی، با کمک رنگ‌آمیزی گرم و انجام آزمون MRVP، SIM، TSI، های بیوشیمیایی از قبیل کواگولاز، سترات و آزمایش تخمیر قندهای مختلف شناسایی و به بخش میکروب‌شناسی جهت بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه دارویی مورد مطالعه، انتقال یافتند. در این تحقیق سویه‌های استاندارد، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و جهت مطالعه استفاده شدند.

- رقیق‌سازی عصاره گیاه گزنه و تهیه دیسک‌های حاوی عصاره

عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه با پروپیلن گلیکول رقیق شده و علاوه بر عصاره خالص، غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml از عصاره تهیه شدند، سپس جهت تهیه دیسک‌های حاوی عصاره از دیسک‌های بلانک، ساخت پادتن طب استفاده گردید. بدین ترتیب که دیسک‌های بلانک در لوله‌های حاوی رقت‌های تعیین شده عصاره قرار داده شد. بعد از مدت ۳ تا ۵ دقیقه پس از جذب کامل،

دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کامل خشک شده و جهت دیسک‌گذاری آماده شوند [۲۹].

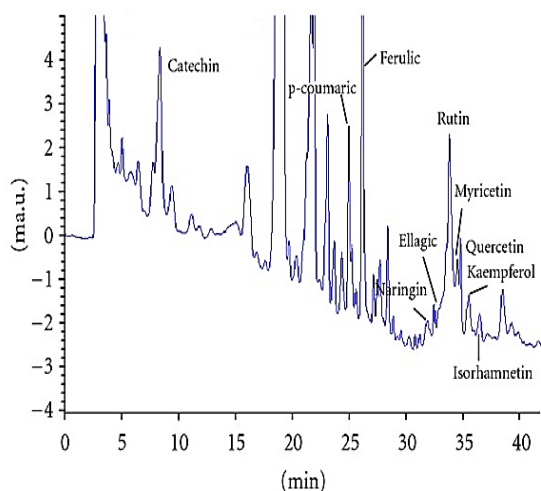
#### - بررسی فعالیت ضد میکروبی

جهت بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی گزنه، از روش بررسی قطر هاله عدم رشد (Disk diffusion) و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای تعیین حساسیت سویه‌هایی از هر دو نوع باکتری گرم منفی و گرم مثبت (اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، پروتئوس میرابیلیس، انتروکوکوس فکالیس، کلبسیلا پنومونیه، اسینتوباکتر کالکوآستیکوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، سیتروباکتر فرودی، انتروباکتر اثرورژنز، سودومونس آثرورژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس) نسبت به عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه گزنه از روش انتشار یا Disk diffusion استفاده شد.

در این روش از باکتری‌هایی که در محیط کشت رشد کرده‌اند، سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژیک به تعداد  $10^8 \times 3$  باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون روی محیط مولر هیتون آگار حاوی ۵ درصد خون تلقیح گردید. سپس دیسک بلانک استریل روی پلیت گذاشته و عصاره‌ی هیدروالکلی گزنه را در غلظت ۱۰۰ - میکروگرم در میلی‌لیتر روی دیسک بلانک تلقیح شد و به مدت دو روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

سپس پلیت‌ها از نظر وجود هاله عدم رشد بررسی گردید. از دیسک‌های استاندارد جنتامایسن و سیپروفلوکسازین به منظور کنترل مثبت استفاده شد. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها به وسیله‌ی خط کش میلی‌متری انجام شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت علاوه بر روش دیسک‌گذاری، حساسیت هر سویه از باکتری‌های مورد نظر نسبت به عصاره‌ی به دست آمده گیاه گزنه با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط مایع در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته گرد مورد

از رشد باکتری‌ها مشخص شد که بیش‌ترین قطر هاله مربوط به اسیتوباکتر کالکوآستیکوس با قطر هاله ۲۱ میلی‌متر می‌باشد و پس از آن به ترتیب استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله ۱۶ و ۱۳ میلی‌متر و انتروکوکوس فکالیس با ایجاد قطر هاله ۴ میلی‌متری کم‌ترین میزان قطر هاله را به خود اختصاص داد. براساس نتایج به‌دست آمده از تست MIC، باکتری انتروکوکوس فکالیس بیش‌ترین حساسیت را با حداقل غلظت مهاري ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و باکتری انتروباکتر ائروژنز کم‌ترین حساسیت را نسبت به عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه از خود نشان دادند. بنابراین با توجه به اثر مطلوب ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه و نتایج مشابه عصاره این گیاه دارویی با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در تحقیق حاضر، می‌توان چنین استنباط نمود که وجود ترکیبات ثانویه ضد میکروبی در این گیاه می‌تواند اثرات درمانی موثری بر عفونت ادراری داشته باشد.



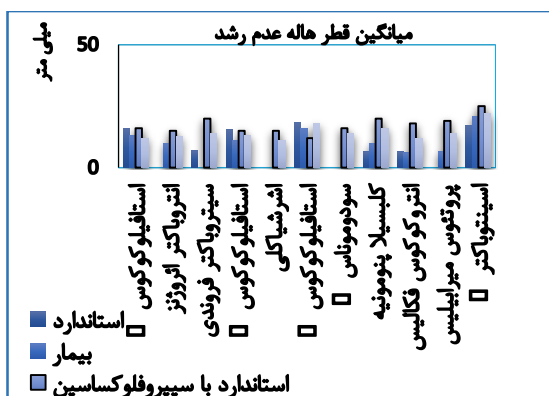
شکل ۱: کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه

بررسی قرار گرفت. به خانه‌های ردیف اول پلیت فقط محیط کشت و سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در ردیف بعدی به ۶ خانه از پلیت‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط مایع مغذی مولر هیتتون اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره گیاه به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شده و تا چاهک ششم به ترتیب غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که با روش رقیق‌سازی تهیه شده بود اضافه گردید. به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. از داروی سیپروفلوکساسین برای کنترل مثبت استفاده شد. محتویات هر چاهک ۲ دقیقه به وسیله دستگاه Plate Reader مجهز به تکان‌دهنده با هم مخلوط شده و در زمان صفر عمل طیف‌سنجی با طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌داری شدند و کدورت و یا عدم کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اولین رقتی که توانست کم‌ترین میزان کدورت را نشان دهد به عنوان حداقل غلظت کشنده تعیین گردید. این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام و میانگین سه تکرار برای هر چاهک برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارنده مورد استفاده قرار گرفت [۳-۳۶].

## یافته‌ها و بحث

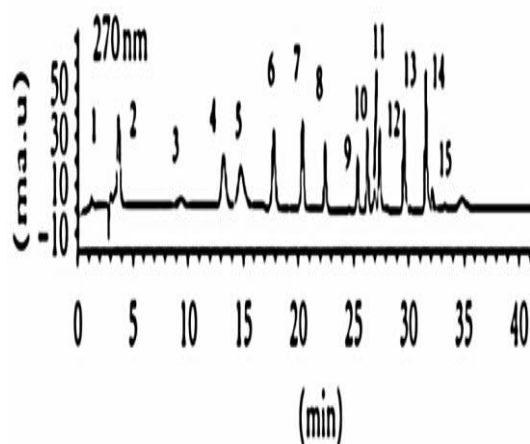
نتایج حاصل از این آزمایش در جداول ۲ و ۳ و ۴ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز HPLC عصاره هیدروالکلی گیاه گزنه می‌توان بیان کرد که ترکیبات فنلی عمده موجود در عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه شامل کلورژنیک‌اسید (۲۸/۱٪)، روتین (۲۵/۲٪)، Myricetin (۱۰/۶٪) و وانیلیک اسید (۹/۲٪) می‌باشد. همچنین انجام آزمون آنتی‌بیوگرام مشخص کرد که در بررسی اثر ممانعتی عصاره، بین باکتری‌های مختلف، اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. در بررسی اثر ساده عصاره گیاهی بر قطر ممانعت



نمودار ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌ی هیدروالکلی گزنه علیه باکتری‌های جدا شده از بیماران در غلظت ۱۰۰ mg/ml بر حسب میلی-لیتر

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌ی هیدروالکلی گزنه علیه باکتری‌های جدا شده از بیماران در غلظت ۱۰۰ mg/ml بر حسب میلی-لیتر

سیپروفلوکساسین		عصاره گزنه		گرم	
استاندارد	بیمار	استاندارد	بیمار		
					میکروب‌های مورد آزمایش
۱۶	۱۲	۱۶	۱۳	+	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۵	۱۲/۵	۰	۱۰	-	انتروباکتر اثرورژنز
۲۰	۱۴	۷	۰	-	سیتروباکتر فروندی
۱۵	۱۳	۱۵/۴	۱۱/۳	+	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس
۱۵	۱۱	۰	۰	-	اشرشیاکلی
۱۲	۱۸	۱۸/۵	۱۶	+	استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس
۱۶	۱۴	۰	۰	-	سودوموناس آنروژینوزا
۲۰	۱۶	۶/۵	۱۰	-	کلسیلا پنومونیه
۱۸	۱۲	۶/۵	۶	+	انتروکوکوس فکالیس
۱۹	۱۴	۰	۶/۵	-	پروتئوس میرابیلیس
۲۵	۲۲	۱۷/۱	۲۱		اسیتوباکتر کالکوآستیکوس



شکل ۲: کروماتوگرام HPLC استاندارد عصاره گیاه گزنه برای سنجش ترکیبات فنلی

جدول ۱- نتیجه آنالیز HPLC ترکیبات فنلی موجود در عصاره گزنه

درصد ترکیبات	ترکیبات فنلی موجود در گزنه
به مقدار خیلی کم	P-coumaric acid
۱/۶	Caffeoylquinic acid
۲	Fumaric acid
به مقدار خیلی کم	2-O-Caffeoylmalic acid
۹/۲	Vanillic acid
۳/۱	Quercetin 3- O-glucoside
۵/۲	Kaempferol 3- O-glucoside
۱/۶	Isorhamnetin 3- O-glucoside
۱۰/۶	Myricetin
۱/۲	Syringic acid
۱	Naringin
۲۵/۲	Rutin
۲۸/۱	Chlorogenic acid
۷	Catechins
۴/۲	Caffeic acid derivative

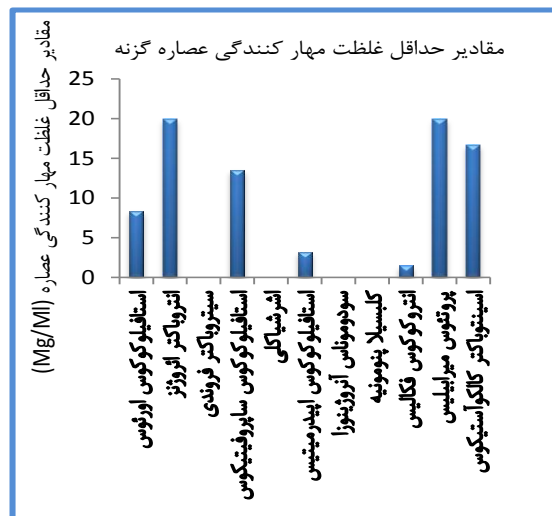
## بحث و نتایج

عفونت ادراری یکی از شایع‌ترین علل مراجعات سرپایی بیماران به مراکز پزشکی است که گاهی به دلیل وخامت حال عمومی و یا وجود یک زمینه ناتوان‌کننده در شخص، نیاز به بستری احساس می‌شود. عفونت ادراری هم چنین شایع‌ترین نوع عفونت بیمارستانی و دومین علت مرگ بر اثر این گونه عفونت‌ها می‌باشد [۳۳]. باسیل‌های گرم منفی روده‌ای (انتروباکتریاسه) شایع‌ترین باکتری‌های مسبب عفونت ادراری بوده و بعد از آن‌ها کوکسی‌های گرم مثبت عمدتاً شامل استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی و انتروکوک‌ها در رتبه دوم قرار می‌گیرند [۳۷-۳۴-۲۰].

با توجه به شیوع اشکال مختلف عفونت ادراری در سطح جامعه (به خصوص در جنس مؤنث) و مصرف متداول و گاه بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان، به نظر می‌رسد که بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نزد پاتوژن‌های ادراری هر جامعه امری بدیهی و قابل انتظار باشد.

به‌وجود آمدن چنین مقاومت‌های دارویی، توسط میکرو اورگانیزم‌ها، ضرورت یافتن داروهای جایگزین با اثر درمانی مناسب را بیش از پیش نمایان می‌کند. این مطالعه به منظور بررسی اثر درمانی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه در درمان عفونت مجاری ادراری و مقایسه اثر درمانی آن با داروی سیپروفلوکساسین انجام شد، که نتایج نشان دهنده اثر درمانی مناسب عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه بود.

مطالعات بی‌شماری بر روی گیاه گزنه (*Urtica dioica L.*) در زمینه‌های گوناگون پزشکی و گیاهان دارویی تا کنون صورت گرفته است، ولی اطلاعات ناچیزی در مورد خاصیت ضد میکروبی آن گزارش شده است، به عنوان مثال در پژوهش انجام شده مشخص شد که عصاره آبی گزنه بر روی اشیرشیاکلی، انتروباکتر آنروژنس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کاندیدا آلیکانس خاصیت ضد میکروبی



نمودار ۲: مقادیر MIC عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه بر باکتری‌های عامل عفونت ادراری

جدول ۳- مقادیر MIC عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه باکتری‌های عامل عفونت ادراری

Mg/ml	میکروب‌های مورد آزمایش
۸/۳۳	استافیلوکوکوس اورئوس
۲۰	انتروباکتر آنروژنز
-	سیتروباکتر فروندی
۱۳/۵	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس
-	اشرشیاکلی
۳/۲	استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس
-	سودوموناس آنروژینوزا
۲۰	کلبسیلا پنومونیه
۱/۵	انتروکوکوس فکالینس
-	پروتئوس میرابیلیس
۱۶/۶۶	اسینتوباکتر کالکواستیکیوس



همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه به اندازه سیپروفلوکساسین موجب مهار باکتری‌های شایع عفونت ادراری می‌گردد. با توجه به شناسائی ترکیبات موثر در عصاره گیاه گزنه در یک نتیجه‌گیری کلی نیز می‌توان چنین بیان نمود که عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه منطقه مشکین‌شهر با میزان ماده موثره بیش‌تر دارای خاصیت و قابلیت ضد باکتریایی بر روی بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت و برخی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد، با این حال اثر عصاره بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در این مطالعه دیده نشد.

با توجه به نتایج می‌توان گفت که عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه می‌تواند جایگزین مناسب دیگری برای درمان عفونت مجاری ادراری باشد. در ادامه لازم است مطالعات بیش‌تر و دامنه داری در شرایط *in vivo* انجام شود تا غلظت مؤثر این عصاره بر باکتری‌های مورد نظر و سویه‌های بالینی، اثرات جانبی آن‌ها در این غلظت‌های به‌کار رفته و فرمولاسیون دقیق آن، مورد ارزیابی قرار گیرد تا در نهایت بتوان پس از مراحل تکمیلی، این عصاره گیاهی را به‌عنوان یک فرآورده جدید ضد میکروبی معرفی نمود.

#### سپاس‌گذاری

از مسئولین بخش تحقیقات گیاهان دارویی و نیز بخش تحقیق و توسعه شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز که در تامین هزینه طرح، فعالیت‌های تولیدی و آزمایشگاهی همکاری داشته‌اند و همچنین از مسئولین و کارکنان بخش داخلی بیمارستان ولی‌عصر (عج) مشکین‌شهر، قدردانی می‌نمائیم.

دارد، در حالی که هیچ‌گونه اثری بر روی باکتری مقاوم گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا نداشت [۱۱].

نتایج نشان داد که از بین باکتری‌های مورد پژوهش، باکتری‌های گرم مثبت هم چون باسیلوس سرئوس و باسیلوس اسپیزرنی و ویبریو پاراهمولایتیکوس به نظر می‌رسد که با سهولت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی مانند *E. coli* مهار شوند. این امر ممکن است به لیوپلی ساکاریدها در غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی مثل نسبت داده شود که آن‌ها را به عوامل خارجی مثل رنگ‌های آب‌دوست، آنتی-بیوتیک‌ها و شوینده‌ها مقاوم می‌کند [۱۲].

همچنین در تحقیقی دیگر نشان داده شده که عصاره الکل گیاه گزنه بر روی باکتری استرپتوکوکوس با سویه پیوژنس، باکتری‌های استافیلوکوکوس آئروس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اثر ضد باکتریایی خوبی داشته است [۱۴].

#### نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از آنالیز HPLC عصاره هیدروالکلی گیاه گزنه نشان داد که این گیاه دارویی دارای ترکیبات مهمی چون اسید فوماریک، اسید گالیک، کاتچین، اسید وانیلیک، کلرژنیک اسید + کافنیک، اسید syringic، اسید P-کوماریک، فرولیک، naringin، روتین، ellagic، میریستین، کورستین، کامفرول، ایزورامنتین و ... می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام شده، مشخص شده است که خاصیت ضد باکتریایی گزنه به دلیل ترکیبات فنلی موجود در عصاره آن می‌باشد. عمده‌ترین ترکیبات فنلی جدا شده از عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی گزنه شامل کلورژنیک اسید (۲۸/۱٪)، روتین (۲۵/۲٪)، Myricetin (۱۰/۶٪) و وانیلیک اسید (۹/۲٪) می‌باشد که به نظر می‌رسد خاصیت ضد میکروبی گزنه توسط این ترکیبات کنترل می‌گردد.

## منابع

- [19] Krystofova, O., Adam, V., Babula, P., Zehnalek, J., Beklova, M., Havel, L., 2010, et al. Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int J Environ Health Res Public Health*; 7:3804-15.
- [20] Kurin, C., 2000, urinary treat infection. In: Goldman & Bennett. *Cecil Text Book of medicine*. 21th Ed.; 613-617.
- [21] Mashhadian, NV and Rakhshandeh, H., 2005, Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pakistan J. Medical Sci.*; 21 (1): 47 - 52 .12.
- [22] Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., Co'kun, M., 2004, Antioxidant properties of some medicinal plants. *Prangosferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malvaneglecta* (Malvaceae), *Cruciatataurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galiumverum* subsp. *Verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (*Urtica ceae*). *Biol Pharm Bull*; 7:702-5.
- [23] Mojaverian, SM., Sajadi, P., Zali, SH., 2010, A study on comparative advantage in export of Iranian medicinal plants. Faculty of sciences. University DjillaliLiabes of Sidi Bel Abbes (Algeria); pp: 364-65.
- [24] Miltman, P., 1990, Randomized double blind study of freeze dried *Urticadioica* in the treatment of allergic rhinitis. *Planta Medica*; 56: 44-7.
- [25] Min, BR., Barry, TN., 2003, Attwood GT, McNabbWC. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forage: a review . *J food chem.*; 9(1):76-81.
- [26] Mohammadi, M, and Mohammadi M., 2006, Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from Urinary Tract Infections. *Medical Science Journal of Islamic Azad University*; 2 (16): 95 - 9.
- [27]-Nwanze, PI., Nwaru, LM., Oranusi, S., Dimkpa, U., Okwu, MU, and Babatunde, BB., Urinary tract infection in Okada village: Prevalence and antimicrobial susceptibility.
- [28] pattern. *Sci. Res. and Essay*, 2007; 2 (4): 112 - 6.
- [29] Oussalah, M, and Caillet, S., 2007, Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria. *Food Control*; 18: 414 - 20.
- [30] Rafajlovska, V., Kavrakovski, Z., Simonovska, J., Srbinska, M., 2013, Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. *Qual Life*; 4:26-30.
- [31] Shahidi, B., 2004, Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *J Ethnopharmacol.*; 94: 301 - 5.
- [32] Shackebaei, D., Godini, A., Abolghazi, M., Majnoui, M., Hesari, M., 2010, Protection of ischemic and reperfused rat heart by aqueous extract of *urticadioica*. *Iran Cardiovasc Res J*; 4:107-11.
- [33] Shahraki, MR., Mirshekari, H., Shahraki, AR., Shahraki, E., Divband, KH., 2008, Effect of *Urticadioica* boiling on serum glucose, insulin and lipids in fructose-fed male rats. *Ofogh-e Danesh*; 14(3):10-15.
- [34] Sobel, J., Kaye, D., 2000, urinary treat infections. in: Mandell G, Bennet J, Dolin R. principles & practice of infectious diseases. 5th Ed. Churchill-livingstone.; 777-800.
- [35] Stamm, W., 2001, Urinary treat infection. In: Branwald .Fauci, Kasper. Harrison,s principles and practice of internal medicine. 15th Ed.; 1620 - 1626.
- [36] Tanagho, EA, and Aninch, JW., Smith, s., 2000, general urology. 15th Philadelphia, Mc Grow Hill.; 200 p.
- [37] Thornsberry, C, and Dougal, L., 1983, Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin resistant *Staphylococa*. *J. Clinical Microbiol.*; 18 (5): 1084 - 91.
- [38] Tolckoff - Rubin, N., Costron, R., Rubin, R., 2000, urinary treat infection. In: Brenner B. *The Kidney*. 6th Ed.; 1449-1508.
- [1] قهرمان، احمد، ۱۳۶۲، فلور ایران. (ج ۷). مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ۸۶۸
- [۲] میر حیدر، حسین، ۱۳۷۳، معارف گیاهی: کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها. تهران: انتشارات دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ج ۶ ص ۲۳۲-۲۲۲.
- [3] Androw, JM., 2001, BSAC Standardized disc susceptibility testing method. *J. Antimicrobial Chemotherapy*; 7 (5): 48 - 57 .
- [4] Chopra, RN., Nayar, SL., Chopra, IC., 1956, Supplement to Glossary of Indian Medicinal Plants. New Delhi: CSIR; P. 686-7.
- [5] Chopra, RN., Nayar, SL., Chopra, IC., 2011, Supplement to Otlis S .Yalcin. BPhenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle SemihOtlis and BuketYalcin Food Engineering Department, Engineering Faculty, Ege University, 35100 Bornova/Izmir, Turkey Received 17 October; Accepted 19 December.
- [6] Farhan, S., Faraj, M., 2012, Al-Shemari H, Jassim A.2012. Study of Some *Urtica dioica* L. Leaves Components and Effect of Their Extracts on Growth of Pathogenic Bacteria and Identify of Some Flavonoids by HPLC. Vol. 23, No 3.
- [7] Farzami, B., Ahmadvand, D., Vardasbi, S., Majin, FJ., Khagani, Sh., 2003, Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*; 89(1):47-53.
- [8] Glossary of Indian Medicinal Plants. New Delhi: CSIR; 1956. P. 686-7.
- [9]-Green, T., 1824, Universal herbal. 2 nd ed. London: Caxton Press; 1824. P. 729.
- [10] Grieve, M., 1824, A modern herbal. 3 rd ed. London: Tiger Books International; 1931. P. 912Green T. Universal herbal. 2 nd ed. London: Caxton Press; 1824. P. 729.
- [11] Gulchin, İ., Küfrevioğlu, İ., Oktay, M., Büyükkokuroğlu, ME., 2004, Antioxidant, antimicrobial antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol*.2004; 90: 205 - 15. 16.
- [12] Hayouni, El., Abedrabba, M., Bouix, M, and Hamdi, M., 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercuscoccifera* L. and *Juniperusphoenicea* L. fruit extracts. *Food. Chem.*; 105 (3): 1126 - 34.
- [13] Harput, US., Saracoglu, I, Ogihara, Y., 2005, Stimulation of lymphocytic proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract. *Phytother Res*; 19(4):346-8.
- [14] Janssen, AM and Scheffer, JJ., *Planta Med.*, 1985, 51: 507 (Abstract).
- [15] Keah, SH., Wee, EC., Chng, KS and Keah, KC., 2007, Antimicrobial Susceptibility of Community - Acquired Uropathogens in General Practice. *Malaysian Family Physician*; 2 (2): 234.
- [16] Khare, CP., 2007, Indian Medicinal Plants an Illustrated Dictionary. New York: Springer Science Business Media LLC; P. 686-7.
- [17] Koelzer, J., Pereira, DA., Dalmarco, JB., Pizzolatti, MG., 2009, et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of lotus *corniculatus*. *Jfoodchem.*; 117(3): 444-450.
- [18] Krzeski, T., Kazon, M., Bordowski, A., Witeska, A., Kuczera, J., 1993, Combined extracts of *Urtica dioica* and *pygeum africanum* in treatment of benign prostatic hyperplasia: double-blind comparison of two doses. *Clin Ther*; 15: 1011-20.

- [39] Tucakov, J., 1997, Lecenjebiljem-fitoterpija. Beograd: Rad;. P. 405.
- [40] Wetherilt, H., 1992, Evaluation of urtica species as potential sources of important nutrients. Dev Food Sci;29:15-25.
- [41] Zargari, A., 1997, Medicinal plants. 6th ed. Tehran: Tehran University Publication 1997; p: 179.