

مطالعه تجربی تاثیر درمانی اسانس گیاه لعل کوهستان در درمان التهاب در مثانه ناشی از اشریشیا کلی در رت های نر نژاد ویستار

حسین آنتیکچی^۱، سیامک مشهدی رفیعی^{۱*}، نگار پناهی^۲، کیومرث امینی^۳

چکیده

نگرانی بزرگ در سراسر جهان تبدیل شده است. این روند نشان دهنده نیاز به عوامل جایگزین برای آنتی بیوتیک ها مانند ترکیبات طبیعی با منشاء گیاهی است. اسانس ها، مخلوط های بیوشیمیایی پیچیده استخراج شده از گیاهان معطر، نتایج امیدوارکننده ای را در این زمینه نشان داده اند (۱). در سال های اخیر، علاقه فزاینده ای به استفاده از اسانس های گیاهی به عنوان یک سلاح طبیعی در برابر باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی وجود داشته است. این روغن ها فعالیت ضد میکروبی امیدوارکننده ای را نشان داده اند و به طور بالقوه می توانند به عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی برای مواد غذایی/سطوح تماس با مواد غذایی استفاده شوند، زیرا عموماً به عنوان ایمن (GRAS) برای مصرف انسان شناخته می شوند.

در دهه های اخیر مقاومت آنتی بیوتیکی در اشریشیا کلی به یک موضوع نگران کننده تبدیل شده است که به طور فزاینده ای در انسان و همچنین در دامپزشکی در سراسر جهان مشاهده می شود. این باکتری ذاتاً به اغلب عوامل ضد میکروبی حساس است، اما این گونه باکتریایی ظرفیت زیادی برای تجمع ژن های مقاومت، عمدتاً از طریق انتقال افقی ژن، دارد (۳). اسانس های گیاهی طیف گسترده ای از فعالیت ضد میکروبی را علیه پاتوژن های انسانی از جمله اشریشیا کلی (*E. coli*) نشان داده اند. به عنوان مثال، دو مطالعه اخیر نشان داد که اسانس اسطوخودوس و دارچین

مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص در اشریشیا کلی یکی از نگران کننده ترین مسائل در سراسر جهان است. علاوه بر این عوارض داروهای شیمیایی دانشمندان را به استفاده از جایگزین های طبیعی با اثرات درمانی بهتر و عوارض کمتر نسبت به درمان های رایج، سوق داده است. از این رو این تحقیق به مطالعه تاثیر درمانی اسانس گیاه لعل کوهستان در درمان التهاب در مثانه ناشی از عفونت با اشریشیا کلی در رت های نر نژاد ویستار پرداخته است. خواص ضدباکتریایی عصاره گیاه با استفاده از روش میکروداپلوشن استاندارد علیه اشریشیا کلی بررسی شد. سپس برای ایجاد سیستمیت، باکتری اشریشیا کلی با غلظت 1.0×10^8 CFU/mL به مثانه موش ها تزریق گردید و سپس برای آنها غلظت های مختلف عصاره و جنتامایسین تجویز شد. پارامترهای هیستوپاتولوژیک مثانه در پایان مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. MIC و MBC عصاره در برابر اشریشیاکلی به ترتیب 0.32 میکرولیتر بر میلی لیتر و 0.12 میکرولیتر بر میلی لیتر بود. در گروه آلوده بدون درمان، نفوذ سلول های التهابی و ضخامت بافت مثانه به طور قابل توجهی افزایش یافت، اما در گروه های تحت درمان با عصاره، به ویژه در دوزهای بالاتر، این پارامترها به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.01$). اثر عصاره در کاهش تعداد باکتری ها با جنتامایسین قابل مقایسه بود. علاوه بر این، پس از تجویز عصاره، التهاب، فیبروز و ضخامت اپیتلیوم نیز به صورت وابسته به دوز کاهش یافت ($p < 0.01$). نتایج این تحقیق نشان داد که درمان با عصاره این گیاه که به عنوان مکمل خوراکی یا تزریق زیر جلدی تجویز شد، منجر به کاهش قابل توجه شمار باکتری ادرار و بهبود تغییرات پاتولوژیک در موش های مورد مطالعه شد.

واژگان کلیدی: لعل کوهستان، اشریشیا کلی، اسانس، مقاومت آنتی بیوتیکی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱۵

مقدمه

امروزه ظهور باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک به یک

۱- گروه علوم بالینی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. sri1vet@yahoo.com

۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، مرکزی، ایران.

مواد و روش کار

تهیه عصاره گیاه لعل کوهستان
اسانس گیاه لعل کوهستان مورد استفاده در این مطالعه در این تحقیق به صورت تجاری از شرکت باریج اسانس تهیه شد و برای اطمینان از عدم آلودگی اسانس ها به میکروارگانیزم های قارچی و باکتریایی، این اسانس ها ابتدا از کاغذ فیلتر واتمن (Whatman, grade 42, Sigma) عبور داده شدند و سپس آنها را بر روی محیط های عمومی و اختصاصی کشت داده شدند، تا هیچ گونه آلودگی در آنها مشاهده نگردد. گیاهان مذکور جمع آوری شده از منطقه نور آباد ممسنی، استان لرستان (در مرحله گلدهی، ژوئن ۲۰۲۱) بودند.

آماده سازی سویه اشرشیا کلی

باکتری اشرشیاکلی به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران به شماره ATCC 35218 تهیه شده و حدود ۰/۵ میلی لیتر از محیط کشت استریل را که قبلاً تهیه شده و توسط اتوکلاو استریل گردیده بود به ماده خشک موجود در آمپول میکروبی اضافه می شد. بعد از یکنواخت شدن سوسپانسیون حاصل به وسیله ورتکس، مخلوط درون یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ سی سی محیط کشت استریل شده ریخته میشد و برای مدت ۱۵ دقیقه در معرض هوای آزمایشگاه قرار داده و سپس آن در شرایط هوایی به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه میگردد. این محیط، محیط کشت پایه برای میکروب ها در نظر گرفته شده بود. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل درب دار حاوی نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شده و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند، با نرمال سالین رقیق و سوسپانسیون باکتری با غلظت 108×1.5 CFU/mL تهیه میگردد.

دارای اثر ضد باکتری بر روی اشرشیا کلی است و هنگامی که با آنتی بیوتیک پیراسیلین ترکیب می شوند، اسانس ها مقاومت این باکتری را به آنتی بیوتیک بسیار افزایش میدهند (۴) (۵). یک مطالعه کارآیی ۱۱ عامل ضد میکروبی مشتق شده از گیاهان را بر علیه اشرشیا کلی در شرایط آزمایشگاهی در محلول در دمای اتاق ارزیابی کرد. این عوامل شامل اسانس بادرنجبویه، دارچین و پونه کوهی و اجزای فعال آنها (به ترتیب سیترال، سینامالدئید و کارواکرول) بود. اثر ضد میکروبی هر دو وابسته به غلظت و زمان در معرض قرار گرفتن بود. اسانس ها و اجزای فعال آنها موجب ایجاد کاهش معنی داری در جمعیت باکتری ای. کلی در مدت زمان کوتاهی نشان دادند. این مطالعات نشان می دهد که اسانس های گیاهی ممکن است نقش مهمی در مبارزه با مقاومت آنتی بیوتیکی ایفا کنند (۶). در این بین اسانس استخراج شده از گیاه لعل کوهستان (*Oliveria decumbens*) اثرات ضد میکروبی قابل توجهی بر روی برخی از سویه های بالینی و استاندارد ایجاد کننده عفونت از جمله اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه نشان داده است (۷). این یافته ها نشان می دهد که اسانس این گیاه میتواند به عنوان یک سلاح طبیعی در برابر باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک مسئول عفونت هایی مانند سبتیت مورد بررسی قرار داده شود (۸). با توجه به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های ایجاد کننده عفونت در انسان و حیوانات، بررسی راهکارهای جایگزین از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از سوی دیگر، اطلاعات بسیار کمی در زمینه اثرات عصاره های گیاهی بر روی سیستمیت در مطالعات منتشر شده مشاهده شد. از این رو این مطالعه بر آن بوده است به بررسی تاثیر درمانی اسانس گیاه لعل کوهستان در درمان التهاب مثانه ناشی از اشرشیا کلی در رت های نر نژاد ویستار پردازد.

(۵۵/۵ درصد) و دوره ۱۲ ساعت نور/۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

برای القای سیستیت، باکتری اشرشیا کلی با غلظت 108×1.5 CFU/mL به مثانه موش های گروه ۲-۷ تزریق میشد. گروه ها به شرح زیر تعیین شدند.

جدول ۱: گروههای مطالعه

گروه کنترل منفی	سالین استریل تزریق شده به مثانه (شاهد).
گروه کنترل مثبت	گروه آلوده (تزریق باکتری) بدون درمان (شاهد).
گروه ۱	گروه آلوده تحت درمان با جتتامایسین (۲ میلی گرم بر کیلوگرم، تزریق عضلانی (IM)).
گروه ۲	گروه آلوده با تیمار عصاره گیاه لعل کوهستان ($0.5 \mu\text{l/ml}$)، اضافه شده به آب آشامیدنی.
گروه ۳	گروه آلوده با تیمار عصاره گیاه لعل کوهستان ($1 \mu\text{l/ml}$)، اضافه شده به آب آشامیدنی.
گروه ۴	گروه آلوده با تیمار عصاره گیاه لعل کوهستان ($0.5 \mu\text{l/ml}$)، تزریق به صورت زیر جلدی (SC).
گروه ۵	گروه آلوده با تیمار عصاره گیاه لعل کوهستان ($1 \mu\text{l/ml}$)، تزریق به صورت زیر جلدی (SC).

دریافت عصاره برای موشها دو بار در روز اجرا شد و به مدت ۱۴ روز ادامه یافت. در طول مطالعه، نمونه ادرار همه گروه ها در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ جمع آوری شد و برای تنظیم تعداد باکتری ها کشت داده شد. تعداد کلنی های باکتریایی ($\log \text{CFU/ml}$) اشرشیا کلی در گروه های مختلف با کشت ادرار موش اندازه گیری شد. کشت ادرار با تلقیح 0.1 میلی لیتر ادرار موش در محیط مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35 درجه سانتیگراد انجام شد (10).

بررسی بافتی مثانه

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

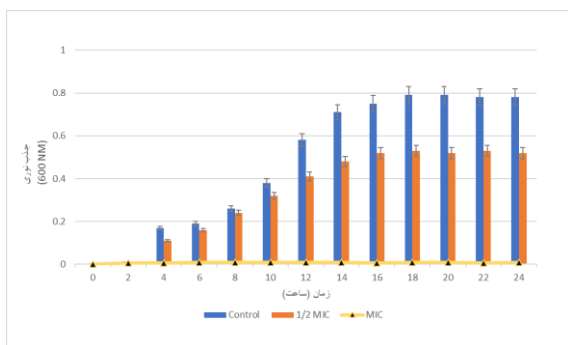
حداقل غلظت بازدارندگی عصاره گیاه لعل کوهستان با استفاده از روش میکرودايلوشن تعیین شد. عصاره گیاه به صورت سریالی در محیط کشت مایع مولر هیتون براث (Himedia، هند) در غلظت های متفاوت (از ۱ تا 2048 میکرولیتر بر میلی لیتر) رقیق شد. سپس ده میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (نیم مک فارلند) تا حجم نهایی 100 میکرولیتر در هر چاهک اضافه شد. سه چاه سوسپانسیون باکتریایی (بدون هیچ گونه عصاره) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. چگالی نوری هر چاهک در 450 نانومتر، هر دو ساعت یکبار به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد با استفاده از یک میکروپلیت ریدر (BioTek، PowerWave XS2، ایالات متحده آمریکا) ثبت شد. حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره گیاه لعل کوهستان با کشت ۵ میکرولیتر از نمونه های چاهک شفاف در پلیت های نوترینت آگار و انکوباسیون آنها در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت تشخیص داده شد. MBC به عنوان غلظتی در نظر گرفته شد که در آن رشد میکروبی وجود نداشت. تمام آزمایش ها در سه تکرار انجام شد.

مطالعه حیوانی

در این تحقیق کلیه آزمایشات با رعایت اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات تحقیقاتی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد (۹). ۳۵ موش صحرایی نر آلبینو ویستار (۳-۴ ماهه) سالم با وزن $220-180$ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و به طور تصادفی به هفت گروه (۵ موش در هر گروه) تقسیم شدند. موش ها در قفس های جداگانه نگهداری شدند و به طور آزاد آب و غذا دریافت کردند. حیوانات تا پایان آزمایش در شرایط کنترل شده دما ($22-24$ درجه سانتیگراد) و رطوبت نسبی

اثرات ضد میکروبی عصاره گیاه لعل کوهستان

شکل ۱ منحنی رشد باکتری اشرشیا کلی در تیمار با غلظت های مختلف عصاره گیاه لعل کوهستان را در مقایسه با کنترل بلانک نشان می دهد. داده ها نشان می دهد که با افزایش غلظت عصاره گیاه لعل کوهستان مقادیر سلولهای زنده اشرشیا کلی به صورت معنی داری کاهش میابد ($p < 0.01$).



نگاره ۱: تأثیر غلظت های مختلف (MIC, 1/2MIC) عصاره گیاه لعل کوهستان بر رشد باکتری اشرشیا کلی در مقابل کنترل بلانک. نتایج نشان دهنده میانگین مقادیر ۳ آزمون مختلف و Error Bar نشان دهنده انحراف از معیار است.

اثرات عصاره گیاه لعل کوهستان بر شمارش باکتری در

ادرار حیوانات

نتایج شمارش باکتری در ادرار گروه های مختلف موش ها در شکل ۲ نشان داده شده است. تعداد باکتری های گروه های کنترل منفی و مثبت در روز ۷ تفاوت معنی داری با روز اول آزمایش نداشت. با این حال، تجویز عصاره گیاه لعل کوهستان منجر به کاهش معنی دار در تعداد باکتری ها پس از ده روز گردید ($p < 0.01$). کاهش تعداد باکتری ها با دوزهای بالاتر عصاره گیاه لعل کوهستان نیز در مقایسه با دوزهای پایین تر معنی دار ($p < 0.01$) بود. جنتامایسین در کاهش تعداد باکتری ها نسبت به اسانس عصاره گیاه لعل کوهستان برتری نشان داد ($1.14 \pm 0.08 \log_{10}$) و میانگین تعداد باکتری یافته توسط عصاره گیاه لعل کوهستان در تزریق زیر جلدی با دوز بالاتر برابر با $2.12 \pm$

در پایان مطالعه، نمونه هایی ادرار جمع آوری و سپس موش ها با اتر معدوم شدند و مثانه های آن ها با دقت تشریح و برای ارزیابی پاتولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های بافتی با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند و تحت میکروسکوپ نوری مورد بررسی بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. نهایتاً برای تعیین شدت سیستیت سطح التهاب، تغییرات در اپیتلیوم (فیروز) و ضخامت اپیتلیوم (در میلی متر) ثبت شد (۰ تا ۴؛ ۰ = عدم تغییر، ۴ = تغییر شدید) (11).

نتایج

نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت

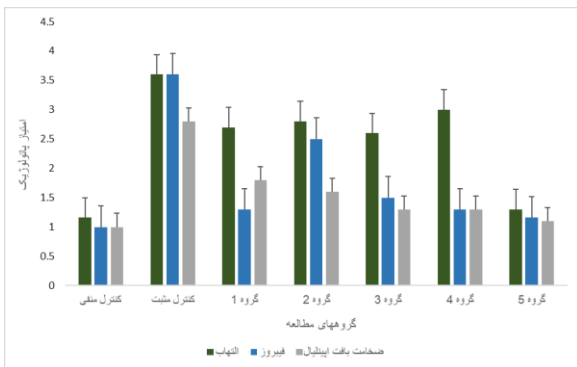
کشندگی عصاره گیاه لعل کوهستان

در این مطالعه حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره گیاه لعل کوهستان برابر با ۰٫۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید و غلظت MBC نیز برابر با ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در حالی که حداقل غلظت بازدارندگی برای آنتی بیوتیک جنتامایسین (MIC) برابر با ۲ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید و غلظت MBC نیز برابر با ۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

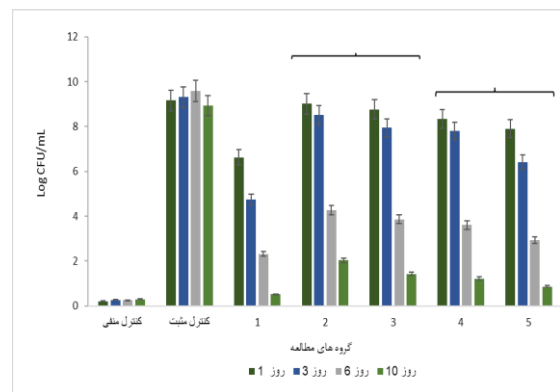
جدول ۲: مقایسه مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بین عصاره گیاه لعل کوهستان و آنتی بیوتیک جنتامایسین

سویه	عصاره گیاه لعل کوهستان		جنتامایسین	
	MIC ($\mu\text{l/ml}$)	MBC ($\mu\text{l/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
اشرشیا	۰٫۳۲	۵۱۲	۲	۴
کلی				

رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین کاهش قابل توجهی در فیبروز، التهاب و ضخامت اپیتلیوم در بافت مئانه موش های تحت درمان با عصاره گیاه لعل کوهستان در مقایسه با بافت های شاهد را به صورت وابسته به دوز نشان داد (شکل ۴). در گروه کنترل مثبت، نفوذ سلول های التهابی و ضخامت بافت مئانه به طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که در گروه های تحت درمان با عصاره گیاه لعل کوهستان، به ویژه در دوزهای بالاتر، پارامترها به طور قابل توجهی کاهش یافت ($p < 0.01$). در شکل ۳ مشاهده می‌گردد که در گروه کنترل منفی میزان تغییرات پاتولوژیک در کمترین حد ممکن است این در حالی است که تغییرات پاتولوژیک در گروه کنترل مثبت آلوده شده بدون اعمال درمان در بیشینه می‌باشد. در زمینه التهاب در بافت مئانه مشاهده می‌شود که با افزایش میزان دوز دریافتی از عصاره گیاه لعل کوهستان از ۰.۵ به ۱ میکروگرم بر میلی لیتر در گروه دریافت کننده خوراکی تغییر معنی داری رخ نداد اما تزریق زیر جلدی این عصاره در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر موجب کاهش معنی دار التهاب نسبت به دوز پایتتر شده است ($p < 0.01$). این در حالی است که میزان ضخامت بافت اپیتلیال و فیبروز به عنوان نشانگر تغییرات پاتولوژیک در گروه دریافت کننده به صورت تزریقی نسبت به خوراکی و در گروه دریافت کننده دوز یک میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به دوز پایتتر به صورت معنی داری کاهش یافته بودند ($p < 0.01$).



۰,۷۴ \log_{10} بود ($p < 0.01$). بررسی آماری شمارش باکتری در بین گروه دوم ($0.5 \mu\text{l/ml}$) و سوم ($1 \mu\text{l/ml}$) با یکدیگر و گروه های سوم و چهارم با یکدیگر که دریافت کننده دوزهای مختلف عصاره به صورت خوراکی و تزریقی بودند، نشان داد که افزایش دوز عصاره منجر به کاهش معنی دار تعداد باکتری ها می‌گردد ($p < 0.01$). علاوه بر این داده ها نشان داد که تزریق زیر جلدی دوز یکسان عصاره منجر به کاهش معنی دار تعداد باکتری ها در مقایسه با دریافت آن به صورت خوراکی می‌شود ($p < 0.01$).

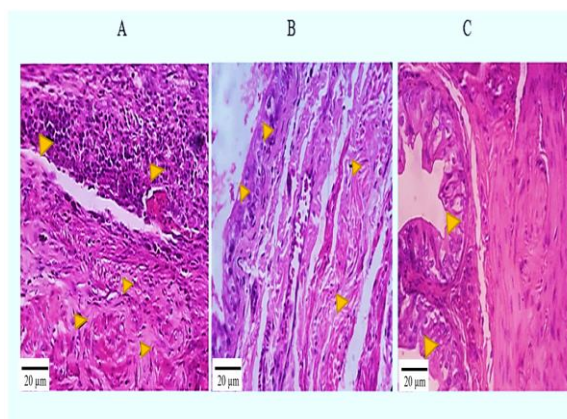


نگاره ۲: شمارش باکتری اشرشیا کلی در گروه های درمان و کنترل مدل موش سیستیت ناشی از اشرشیا کلی در روزهای مختلف. گروه کنترل منفی: سالیین استریل تزریق شده به مئانه. گروه کنترل مثبت، گروه آلوده به باکتری بدون درمان؛ گروه ۱، گروه آلوده با درمان جنتامایسین (۲ میلی گرم بر کیلوگرم، تزریق عضلانی). گروه ۲، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان ($0.5 \mu\text{l/ml}$)، دریافت خوراکی. گروه ۳، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان ($1 \mu\text{l/ml}$)، دریافت خوراکی. گروه ۴، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان ($0.5 \mu\text{l/ml}$)، تزریق زیر جلدی. گروه ۵، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان ($1 \mu\text{l/ml}$)، تزریق زیر جلدی. مقادیر تفاوت آماری با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه ($p < 0.01$), ($p < 0.05$) در مقابل گروه (۲) تعیین شد.

نتایج بررسی بافتی

دامها، عفونت در عرض ۲ تا ۶ ماه دوباره عود می کند و ممکن است برای دوره های طولانی زندگی آنها را دچار مشکل کند. بار قابل توجه عفونت دستگاه ادراری بر روی دامها و انسان های بیمار در سراسر جهان، سال ها تحقیق گسترده در این زمینه را برای کشف علت شناسی عفونت دستگاه ادراری و کشف استراتژی های مدیریت پیشگیرانه و درمان ها برانگیخته است. به طور سنتی، تحقیقات در مورد پاتوژن عفونت دستگاه ادراری عمدتاً بر اساس سنجش های کشت سلولی و مدل های تجربی در موش ها است، حیواناتی که ذاتاً به عفونت ادراری مقاوم هستند و برای عفونت به تلقیح باکتریایی بسیار بالایی نیاز دارند، معمولاً ۱۰^۶ تا ۱۰^۷ باکتری در هر موش برای ایجاد بنابراین، این حیوان حساسیت طبیعی به عفونت دستگاه ادراری را که در بیماران انسانی دیده می شود، منعکس نمی کند. دامهای اهلی و موشها، در مقابل، به طور طبیعی مانند انسان ها به عفونت ادراری حساس هستند و ویژگی های مهم عفونت ادراری انسانی را با توجه به پاسخ التهابی، فیزیولوژی، آناتومی دستگاه ادراری و ترکیب ادرار مشترکند (۱۲). سیستیت باکتریایی یکی از عفونت های ادراری است که عمدتاً پستانداران را تحت تأثیر قرار می دهد (۱۳). شایع ترین عامل ایجاد کننده آن /شرشیا کلی است که باعث نفوذ سلول های التهابی می شود، ادم و فیبروز برخی از تغییرات هیستوپاتولوژیک هستند که منجر به این عفونت می شود (۱۴). امروزه وجود یک جایگزین طبیعی، که ممکن است منجر به بهبود پیامدهای درمانی و عوارض کمتری نسبت به درمان های معمولی شود، نسبت به هر درمان دیگری ارجحیت دارد (۱۵) (۱۴). یکی از جایگزین های به خوبی مطالعه شده با اثربخشی اثبات شده، عوامل گیاهی هستند. اثرات ضد میکروبی عصاره گیاه لعل کوهستان قبلاً در بسیاری از مطالعات اثبات گردیده است. در این مطالعه، خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاه لعل

شکل ۳: مقایسه آماری یافته های پاتولوژیک درمان سیستیت با اسانس گیاه لعل کوهستان در گروه های مطالعه. گروه کنترل منفی: سالین استریل تزریق شده به مثانه. گروه کنترل مثبت، گروه آلوده بدون درمان؛ گروه ۱، گروه آلوده با درمان جنتامایسین (۲ میلی گرم بر کیلوگرم، تزریق عضلانی). گروه ۲، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان (۰.۵ μl/ml)، دریافت خوراکی). گروه ۳، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان (۱ μl/ml، دریافت خوراکی). گروه ۴، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان (۰.۵ μl/ml، تزریق زیر جلدی). گروه ۵، گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان (۱ μl/ml، تزریق زیر جلدی). داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ذکر شده است. مقادیر تفاوت آماری با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه (*p<0.05، **p<0.01) در مقابل گروه (۲) تعیین شد.



نگاره ۴: مقایسه تغییرات پاتولوژیک در بافت مثانه موشهای مورد مطالعه. A: تغییرات بافتی شامل افزایش سلولهای التهابی و ماکروفاژها، و فیبروز در مثانه موشهای گروه کنترل مثبت بدون درمان پس از ۱۰ روز از شروع مطالعه، B: بهبود تغییرات پاتولوژیک همچون کاهش قابل توجه سلولهای التهابی و فیبروز در گروه ۳ (گروه تیمار شده با عصاره گیاه لعل کوهستان (۱ μl/ml، دریافت خوراکی)) و C: کاهش ضخامت بافت اپیتلیال مثانه در گروه ۵ مطالعه تحت درمان با عصاره گیاه لعل کوهستان (۱ μl/ml، دریافت زیرجلدی)). Scale bar: 20 μm

بحث

امروزه عفونت دستگاه ادراری درصد بسیاری از بیماری های درگیر کننده انسانها به خصوص زنان و نیز دام را تشکیل می دهد، که عامل اصلی آن /شریشیا کلی یوروپاتوژنیک است. متأسفانه، در بسیاری از انسان ها و

کوهستان، همچنین اثرات ضد التهابی را نشان داده است (23). علاوه بر این، تیمول و کارواکرول در مهار ادم التهابی و مهاجرت گلبول های سفید گزارش شده اند (24). داده های این مطالعه نشان داد که تجویز خوراکی و عضلانی عصاره گیاه لعل کوهستان اثر ضد باکتریایی قوی دارد. مشخص شده است که تنوع در ترکیب شیمیایی شناسایی شده در میان گیاهان جمع آوری شده از مناطق مختلف با شرایط آب و هوایی و جغرافیایی متفاوت می تواند بر سطح دارایی های بیولوژیکی یک گونه گیاهی تأثیر بگذارد. در مطالعه ما، این شرکت عصاره گیاه لعل کوهستان جمع آوری شده از منطقه نور آباد ممسنی را تولید کرد که در مقایسه با گیاهان سایر مناطق توسط خوشبخت و همکاران، فعالیت ضد میکروبی قوی و قابل اعتمادی را نشان داد (25).

تیمول و کارواکرول ترکیباتی هستند که در برخی گیاهان مانند آویشن و پونه کوهی یافت می شوند. آنها خواص ضد میکروبی دارند و می توانند باکتری ها، قارچ ها و بیوفیلیم ها را از بین ببرند یا از رشد آنها جلوگیری کنند. برخی از مطالعات نشان داده اند که تیمول و کارواکرول ممکن است با القای مرگ سلولی، توقف رشد سلولی و مسدود کردن برخی مسیرهای سیگنالینگ در سلول های سرطانی، اثرات ضد توموری داشته باشند (26). با این حال، تحقیقات بیشتری برای تایید اثربخشی و ایمنی آنها در انسان مورد نیاز است. بنابراین، تیمول و کارواکرول ممکن است فوایدی برای سیستمیت داشته باشند، به خصوص اگر ناشی از عفونت باکتریایی باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره گیاه لعل کوهستان دارای اثرات ضد میکروبی اشریشیا کلی است که میتواند به محتویات تیمول و کارواکرول آن نسبت داده شود (27، 28).

کوهستان توسط MIC و MBC تعیین شد. نشان داده شده است که برخی از عوامل طبیعی مانند زغال اخته می توانند مصرف آنتی بیوتیک و دوره های UTI علامتی را در مقایسه با گروه دارونما کاهش دهند (16). همچنین نشان داده شده است که عصاره گیاه توت خرس (۱۵ میلی لیتر) دو بار در روز به مدت یک ماه باعث کاهش میزان باکتریوری در بیماران دچار عفونت ادراری می شود (17). عصاره اتانولی برخی گیاهان مانند *Ocimum sanctum*، *Zingiber officinale*، *Cinnamomum cassia*، *Terminalia chebula*، *Punica granatum* و *Azadirachta indica* دارای منابع بالقوه ترکیبات ضد میکروبی علیه پاتوژن های ایجاد کننده عفونت ادراری از جمله اشریشیا کلی هستند (18). همچنین، *Tuken* و همکاران نشان دادند که درمان طولانی مدت (۱۴ روز) با یک عامل گیاهی اضافه شده به آب آشامیدنی منجر به پاکسازی کامل ادرار از این باکتری ها می شود (10). مطالعه ما پژوهش دیگری در این زمینه است که اثرات ضد میکروبی داروهای سنتی را تایید می کند.

در بررسی حاضر به دلیل محدودیت های مالی، اجزای اسانس مورد بررسی قرار نگرفتند، اما در بسیاری از مطالعات قبلی تفاوت های جزئی در میزان اجزای اصلی مشاهده شده است. محبویی و همکاران نشان داد که اجزای اصلی عصاره گیاه لعل کوهستان تیمول (۲۲٪)، کارواکرول (۲۲٪) و *p-cymene* (19%) (19) بودند. این نتایج همچنین توسط امین و همکارانش تایید شد که ادعا کردند عصاره گیاه لعل کوهستان حاوی مقادیر زیادی از عناصر مونوترپن اکسیژن دار است که کارواکرول و تیمول عوامل اصلی آن هستند (20). اثرات ضد باکتریایی قوی بسیاری از اسانس های گیاهی که تیمول و کارواکرول جزء اصلی آنها هستند نیز در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است (21، 22). لیمونن، یکی دیگر از اجزای عصاره گیاه لعل

فهرست منابع

1. Waldorff MS, Bjerrum L, Holm A, Siersma V, Bang C, Llor C, et al. Influence of antimicrobial resistance on the course of symptoms in female patients treated for uncomplicated cystitis caused by *Escherichia coli*. *Antibiotics*. 2022;11(2):188.
2. Waldorff MS, Bjerrum L, Holm A, Siersma V, Bang C, Llor C, et al. Influence of Antimicrobial Resistance on the Course of Symptoms in Female Patients Treated for Uncomplicated Cystitis Caused by *Escherichia coli*. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11.(۲)
3. Tizura AT, Material Soncini JG, Koga VL, Takayama Kobayashi RK, Tano ZN, Vespero EC. *Escherichia coli* Isolated from Vegans, Vegetarians and Omnivores: Antibiotic Resistance, Virulence Factors, Pathogenicity Islands and Phylogenetic Classification. *Microbiology Research*. 2022;13(4):825-35.
4. Altun M YB. Determination of chemical compositions and antibacterial effects of selected essential oils against human pathogenic strains. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2023;318:137997.
5. Falleh H, Jemaa MB, Neves MA, Isoda H, Nakajima M, Ksouri R. Formulation, physicochemical characterization, and anti-*E. coli* activity of food-grade nanoemulsions incorporating clove, cinnamon, and lavender essential oils. *Food Chemistry*. 2021;359:129963.
6. Ahmed MM, Khadum HE, Jassam HMS. Medicinal Herbs as Novel Therapies against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2023;16(1):62-6.
7. Malihi N, Danafar F, Moosavi-nasab M. The effect of *Olivaria decumbens* Vent. essential oils and lysozyme on physicochemical and functional properties

رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین کاهش قابل توجهی در فیروز، التهاب و ضخامت اپیتلیوم در بافت مثانه موش های تحت درمان با عصاره گیاه لعل کوهستان به صورت وابسته به دوز در مقایسه با بافت های شاهد نشان داد. در گروه ۲، نفوذ سلول های التهابی و ضخامت بافت مثانه به طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که در گروه های تحت درمان با عصاره گیاه لعل کوهستان، به ویژه در دوزهای بالاتر، پارامترها به طور قابل توجهی کاهش یافت. یافته های ما با بررسی های قبلی که اثربخشی عصاره گیاه لعل کوهستان را در برابر باکتری های مختلف که به ترکیبات تیمول و کارواکرول آن نسبت داده شده اند، مستند کرده اند، مطابقت دارد (25). عصاره گیاه لعل کوهستان نه تنها باکتری های بیماری زا را از بین میبرد بلکه التهاب و فیروز ناشی از عفونت مثانه را نیز کاهش می دهد. مشخص شده است که ترکیبات فعال زیستی گیاه غشای باکتریایی را مختل می کند و از بیوستز ارگوسترول و رشد باکتری ها جلوگیری می کند که منجر به مرگ سلولی به دلیل نشت ATP و یون می شود (9).

نتایج مطالعه حاضر فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاه لعل کوهستان را بر سیستیت ناشی از *اشرشیا کلی* نشان میدهد. عصاره گیاه لعل کوهستان را می توان بیشتر به عنوان یک عامل جایگزین برای درمان عفونت های دستگاه ادراری مورد مطالعه قرار داد. علاوه بر این، برای از بین بردن باکتری های عامل، اسانس می تواند از لایه های سلولی یوروپیتلیال نیز محافظت کند. علاوه بر این، آزمایش های *in vivo* و آزمایش های بالینی برای ارزیابی اثربخشی و ایمنی درمان عصاره گیاه لعل کوهستان برای مدیریت عفونت دستگاه ادراری در دام و انسان مورد نیاز است.

- of fish gelatin film. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2022;16(3):2356-64.
8. Moghadam MJ, Maktabi S, Zarei M, Koohi PM. Inhibitory Activity of *Oliveria decumbens* Essential Oil on *Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic Cells. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*. 2022;9(3):109-14.
 9. Behbahani BA, Yazdi FT, Vasiee A, Mortazavi SA. *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial pathogenesis*. 2018;114:449-52.
 10. Tuken M, Temiz MZ, Yuruk E, Kaptanagasi AO, Basak K, Narter F, et al. The role of an herbal agent in treatment for *Escherichia coli* induced bacterial cystitis in rats. 2017;89(2):134-8.
 11. Zwaans BM, Krueger S, Bartolone SN, Chancellor MB, Marples B, Lamb LEJAiro. Modeling of chronic radiation-induced cystitis in mice. 2016;1(4):333-43.
 12. Zhou Y, Zhou Z, Zheng L, Gong Z, Li Y, Jin Y, et al. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10537.
 13. Cernja M, Oros D, Melvan E, Svetlicic E, Skrlin J, Barisic K, et al. Modeling of urinary microbiota associated with cystitis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021;11:643638.
 14. Hayami H, Takahashi S, Ishikawa K, Yasuda M, Yamamoto S, Wada K, et al. Second nationwide surveillance of bacterial pathogens in patients with acute uncomplicated cystitis conducted by Japanese Surveillance Committee from 2015 to 2016: antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus saprophyticus*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2019;25(6):413-22.
 15. Del Popolo G, Nelli F. Recurrent bacterial symptomatic cystitis: A pilot study on a new natural option for treatment. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*. 2018;90(2):101-3.
 16. Stothers LJCJoU. A randomized trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women. 2020;9:1558-62.
 17. Haverkorn MJ, Mandigers JJJ. Reduction of bacteriuria and pyuria using cranberry juice. 2021;272(8):590.-
 18. Sharma A, Chandraker S, Patel V, Ramteke PJJjops. Antibacterial activity of medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. 2019;71(2):136.
 19. Mahboubi M, Feyzabadi M, Haghi G, Hosseini H. Antimicrobial activity of chemical composition of essential oil from *olivera decumbens* vent. 2018.
 20. Amin G, Sourmaghi MS, Zahedi M, Khanavi M, Samadi NJF. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Oliveria decumbens*. 2015;76(7-8):704-7.
 21. Bagamboula C, Uyttendaele M, Debevere JFm. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. 2019;21(1):33-42.
 22. Botelho M, Nogueira N, Bastos G, Fonseca S, Lemos T, Matos F, et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. 2017;40(3):349-56.
 23. Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Suganuma N. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil on eosinophils. *Journal of Food Science*. 2020;75(3):H87-H92.
 24. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevao-Silva CF, Carvalho MDdB, Cunha JM, Grespan R, et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris*

- L. essential oil, on the inflammatory response. 2012;2012.
25. Khoshbakht T, Karami A, Tahmasebi A, Maggi F. The variability of thymol and carvacrol contents reveals the level of antibacterial activity of the Essential Oils from different accessions of *Oliveria decumbens*. *Antibiotics*. 2020;9(7):409.
 26. Zapién-Chavarría KA, Plascencia-Terrazas A, Venegas-Ortega MG, Varillas-Torres M, Rivera-Chavira BE, Adame-Gallegos JR, et al. Susceptibility of multidrug-resistant and biofilm-forming uropathogens to Mexican oregano essential oil. *Antibiotics*. 2019;8(4):186.
 27. Kwiatkowski P, Sienkiewicz M, Pruss A, Łopusiewicz Ł, Arszyńska N, Wojciechowska-Koszko I, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of essential oil compounds against New Delhi Metallo- β -lactamase-1-producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antibiotics*. 2022;11(2):147.
 28. El-jalel LF, Idris HA, Eltagori A, Bumadian MM, Bozakouk IH, Gonaid MH, et al. Evaluation of the Antimicrobial Effect of *Thymus capitatus* Essential Oil (EO) Extract on Bacteria Isolated from Urinary Tract Infection. *AJBSR*. 2021;3:39-46.