

اثرات ضدانقباضی عصاره هیدروالکلی آویشن بر روی ترمینال ایلنوم خوچه هندی

دکتر مهدی بابایی: استادیار گروه داخلی مرکز تحقیقات طب داخلی دانشگاه علوم پزشکی سمنان: نویسنده رابط

E-mail: amo_babaei@yahoo.com

دکتر میترا امامی ابرقوئی: استادیار گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان
دکتر رضا انصاری: دانشیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر عباسعلی وفائی: استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان
دکتر عباسعلی طاهریان: استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان
دکتر جعفر طوسی: متخصص آسیب شناسی، کارشناس (مشاور) آمار و کامپیوتر
دکتر شاهرخ موسوی: استادیار گروه داخلی، مرکز تحقیقات طب داخلی، بیمارستان فاطمیه، دانشگاه علوم پزشکی سمنان
دکتر مازیار محمد اخوان: استادیار گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

دریافت: ۸۴/۱۰/۱۳ پذیرش: ۸۵/۴/۱۹

چکیده

زمینه و اهداف: گیاهان دارویی در میان مردم استفاده وسیعی دارد و همیشه احتمال ایجاد عوارض توسط این ترکیبات وجود دارد. در این مطالعه اثرات عصاره هیدروالکلی آویشن بر روی روده کوچک خوچه هندی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: خوچه هندی نر بمدت ۲۴ ساعت بدون غذا نگهداشته و با زدن ضربه به سر، حیوان کشته شده و ترمینال ایلنوم برداشته می شد و در حمام نسجی حاوی تیروید در دمای ۳۷ درجه که با گاز کربوژن دمیده میشد با تحریک الکتریکی منقبض شده و این انقباضات با فیزیوگراف ثبت میشد. سپس آویشن در شش غلظت مورد آزمایش قرار گرفت، ۵ دقیقه اول به عنوان کنترل و ۵ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره به عنوان تست ثبت گردید، میانگین تغییرات با استفاده از نرم افزار SPSS11.5 (Chicago IL) و آزمون آماری تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: آویشن سبب مهار انقباضات شد که این مهار با افزایش غلظت عصاره بیشتر شد. که با غلظت 0.6 mg/ml سبب ۶۰٪ کاهش در دامنه انقباضات شد ($p < 0.02$). این اثر مهاری توسط گرانسترون بلوک شد و همچنین مانع اثر تحریکی استیل کولین شده که این امر نشان دهنده اثرات آنتی کولینرژیک با اثر در مسیر سروتونینرژیک میباشد. آنالیز رگرسیون نشان داد که با افزایش غلظت اثر عصاره افزایش میابد که برای گیاه آویشن ($p < 0.001$) با غلظت ۸۹ هزارم میلیگرم بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که آویشن سبب مهار برگشت پذیر انقباضات روده خوچه هندی شده که این مهار با افزایش غلظت عصاره بیشتر میشود.

کلید واژه ها: آویشن، روده خوچه هندی، ضد انقباض، گیاهان دارویی

مقدمه

وسیع از گیاهان در سراسر جهان ضرورت بررسی اثرات دارویی و عوارض جانبی این گیاهان را می طلبد. گیاهان خانواده نعناع^۱ ۳۸ گونه میباشد. این گیاهان در مناطق گرمسیری و اغلب نقاط کشور ایران می رویند. آویشن گیاهی علفی و از تیره Lamiaceae با نام علمی تیموس ولگاریس و با رنگ سبز و معطر می باشد. این گیاه خاصیت رشد و تکثیر بالا داشته و به صورت بوته ای کم ارتفاع با برگ و گل کوچک می روید. مطالعات علمی که توسط محققان انجام شده اثرات گوناگونی از این گیاه ارائه شده است که به موارد زیر میتوان اشاره کرد: اثرات درمانی در بیماری آسم و برونشیت و اثر ضد اسپاسم روی عضله صاف تراشه (۳) گزارش شده است. اثر مهارکنندگی این گیاه بر رشد میکروباها در محیطهای کشت آزمایشگاهی دیده شده

سندرم روده تحریک پذیر به حالتی اطلاق می شود که بیماران از درد و ناراحتی شکم، نفخ، تغییر در اجابت مزاج مثل اسهال یا یبوست شکایت دارند و تشخیص بیماری بر اساس رد علل ارگانیک و براساس یافته های بالینی استوار میباشد (۱). علت این بیماری مشخص نیست ولی اختلالات سایکولوژیک و افزایش حساسیت احشائی در ایجاد آن دخیل میباشند. روش های درمانی متعددی در درمان این بیماری استفاده شده که از جمله میتوان آنتی کولینرژیک ها، آنتی دپرسانتها، ملین ها و داروهای مؤثر در مسیر سروتونینرژیک را نام برد، اگر چه اثر این داروها متغیر و گاه ناامید کننده بوده است.

در طب سنتی از داروی گیاهی آویشن برای درمان بیماری های مختلف از جمله اسهال استفاده شده است (۲). استفاده

با وزنه‌ای به وزن ۰/۵ gr که به بازوی ترانسدیوسر متصل شده بود تحت کشش قرار گرفته و حداقل ۶۰ دقیقه به بافت جهت به تعادل رسیدن نسج استراحت داده میشد.

سپس تحریک الکتریکی با ولتاژ ۴۵ ولت به مدت ۱ ms توسط (Norco - Bio - system, Houston Texas, USA) با ۰/۱HZ داده شد. این تحریک الکتریکی سبب ایجاد انقباض ایزوتونیک در روده شده و تغییرات آن توسط آمپلی‌فایر متصل به فیزیوگراف (Harvard, Apparatus Limited, WA, USA) ثبت شد. ابتدا ۵ دقیقه دامنه انقباضات به عنوان کنترل ثبت شده و سپس عصاره هیدروالکی آویشن در حجم ۰/۵mL در غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۶، ۰/۲، ۰/۶، ۲ و ۶ میلی‌گرم در سی‌سی به حمام نسجی اضافه (از غلظت کم به غلظت زیاد) و ۵ دقیقه بعد دامنه انقباضات به عنوان تست ثبت و در انتها تمام مواد از محیط شسته شده و حمام نسجی با محلول تیروید جدید پر میشد، این عمل هر بار با غلظت جدید از محلول آویشن تکرار شد. دارو در حمام نسجی در سطح سرورزی ایلئوم قرار می‌گرفت و سعی شد که حجم دارو از ۱/۱ حجم حمام نسجی بیشتر نشود این عمل برای هر غلظت حداقل شش بار تکرار شد. بعد داروهای آتروپین، استیل کولین، نالوکسان، مورفین، گرانسترون هر کدام جداگانه به حمام نسجی اضافه شد و بعد از اضافه کردن عصاره گیاه اثرات آن در حضور این مواد بر روی انقباضات روده و حرکات خودبخودی آن مورد بررسی قرار گرفت.

در این پژوهش از عصاره هیدروالکی گیاه آویشن استفاده شد. گیاه مورد نظر از مزرعه تحقیقاتی و آموزشی مرکز آموزش علمی-کاربردی جهاد کشاورزی استان سمنان تهیه شد. عصاره‌گیری از گیاه نیز در همان مکان و توسط کارشناسان مرکز و با روش آزمایشگاهی سوکسله انجام شد. برای تهیه عصاره ابتدا ۴۸ گرم سرشاخه‌های گلدار گیاه که در سایه خشک شده بود تهیه و با ۴۵۰ سی‌سی متانول ۹۷٪ و آب مخلوط شده و توسط دستگاه فوق عصاره‌گیری انجام شد. در روند عصاره‌گیری الکل تبخیر شده و عصاره همراه با مقداری آب باقی ماند. عصاره مایع در حرارت حدود ۵۰ درجه قرار گرفت. پس از تبخیر کامل آب، پودر حاصل به وزن ۵ گرم باقی ماند. پودر حاصله پس از ساییده شدن کامل در هاون چینی، براساس دوز مورد نیاز در نرمال سالیین حل شده و مورد استفاده قرار گرفت.

داده‌ها به صورت ثبت دامنه انقباضات هر دقیقه شش‌بار به مدت ۵ دقیقه جمعاً ۳۰ انقباض به عنوان تست و ۳۰ انقباض به عنوان کنترل ثبت گردید، سپس میانگین \pm انحراف معیار مشخص شد برای بررسی تفاوت آماری بین این گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Chicago, IL, USA) از آزمون T - test Paired استفاده شد در ابتدا میزان اثر عصاره در هر غلظت محاسبه و میانگین اثرات مشخص شد،

منحنی پاسخ به دارو با استفاده از برنامه نرم‌افزاری (Curve Expert 1.3) رسم شد. همچنین جهت بررسی ارتباط بین دوز

است، از جمله اثر ضد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و میکروبهایی گرم مثبت و منفی را میتوان نام برد (۴). اثرات ضدقارچی بروی کاندیدا آلیکس (۵) و اثرات مفیدی ضد میکروبی در درمان سوختگی موش آزمایشگاهی داشته است (۶).

اثرات ضدباکتریال کوکسی‌های گرم مثبت، پسودوموناس، ایشریشیا کولی و گونه‌های آئروموناس در محیط کشت میکروبی گزارش شده است (۷/۸). در مطالعه دیگر اثرات ضد اکسیداتیو و ضد قارچی این گیاه را نیز نام برده اند (۹).

همچنین اثر ضد التهابی و مهار تولید نیتریک اکساید در مطالعه‌ای نشان داده شده است (۱۰). عصاره آویشن باعث تأخیر در فساد نوعی ماهی می‌شود (۱۱). در تحقیقی که در دانشگاه کالیفرنیا انجام شد اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره آویشن به اثبات رسید (۱۲).

آویشن انواع مختلفی داشته و در فصول مختلف سال ترکیبات موجود در گیاه نیز تغییر می‌کند. آویشن حاوی ترکیبات مختلفی مثل اسانس و ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، اسیدکافئیک، اسیداولانوییک و اسیدارسولیک می‌باشد، از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه می‌توان به تیمول و Carvacol و Borneol اشاره کرد (۲). با توجه به استفاده وسیع از این گیاه در طب سنتی به عنوان داروی ضد درد و ضد اسهال، این مطالعه با هدف بررسی چگونگی، اثر و مکانیسم آن بر روی ایلئوم خوکیه‌هندی به عنوان مدل حیوانی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و چگونگی انجام آزمایش: پس از اخذ مجوز رسمی از کمیته حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه، خوکیه‌هندی نر به وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم (انستیتو پاستور تهران - ایران) خریداری و مقررات ملی و بین‌المللی نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. خوکیه‌های هندی به مدت ۲۴ ساعت بدون غذا بوده ولی آب آشامیدنی دریافت می‌کردند. با زدن ضربه به سر، حیوان کشته و شکم حیوان باز و ایلئوم ترمینال از بدن بدقت جدا می‌شد. روده حیوان شسته شده و داخل محلول تیروید قرار میگرفت. محلول تیروید حاوی ترکیبات: کلرید سدیم ۱۳۷، کلرید پتاسیم ۲۷، کلرید کلسیم ۱/۸، کلرید منیزیم ۱/۵، بی‌کربنات سدیم ۱۱/۹، فسفات سدیم ۰/۴، گلوکز ۵ میلی‌مول بود.

قطعه روده به طول ۲-۳cm برای ثبت انقباضات ایزوتونیک طولی در حمام نسجی (Harvard, Apparatus Limited, WA, USA) حاوی ۵۰mL محلول تیروید که با گازکربوژن ۵٪ دی‌اکسیدکربن و ۹۵٪ اکسیژن دمیده می‌شد قرار داده شده و دمای حمام نسجی در ۳۷°C ثابت نگذاشته شد.

یک انتهای روده در محور طولی به قلاب شیشه‌ای (هوک) و انتهای دیگر آن با نخ ابریشمی به ترانسدیوسری (Harvard, Apparatus Limited, WA, USA) متصل شد که حرکات مکانیکی را نشان می‌داد. روده در داخل حمام نسجی آویزان شده و

گرانیسترون داروی است که بلوک کننده گیرنده سروتونین (5-HT₃) میباشد و ابتدا در غلظت 10^{-6} مول در مجاورت با روده قرار گرفت، که تاثیری در دامنه انقباضات روده نداشت و پس از اضافه کردن عصاره آویشن اثر مهار کنندگی عصاره مشاهده نشد. آتروپین سبب مهار انقباضات با تحریک الکتریکی و خودبخودی روده خوکیچه هندی شد و استیل کولین سبب ایجاد انقباض شدید در روده حیوان شد سپس این آزمایش مجددا در مجاورت با عصاره آویشن انجام شد که انقباض ایجاد شده نسبی بوده و آویشن سبب مهار انقباضات در مجاورت با استیل کولین شده بود.

پس از اضافه کردن مورفین که یک محرک رسپتورهای اپیوئیدی است دامنه انقباضات کاهش و کاملاً متوقف شد و پس از اضافه کردن عصاره آویشن این مهار ادامه داشت. نالوکسان که آنتاگونیست رسپتورهای اپیوئیدی است و لی بر خلاف انتظار افزودن نالوکسان به محیط سبب توقف دامنه انقباضهای شده و اثر مهاری خود را بر روی انقباضات روده نشان داد و پس از اضافه کردن عصاره آویشن این مهار دامنه انقباضات ادامه داشت.

دارو و اثر آن از آنالیز رگرسیون (Regression, linear model) استفاده گردید. در تمام آزمون‌های ذکر شده از $\alpha = 0/05$ برای معنی دار بودن آزمون استفاده شد.

یافته ها

یافته های حاصل از پژوهش نشان می دهد عصاره آویشن در شش غلظت و هر غلظت شش تا نه مرتبه مورد آزمایش قرار گرفت. همان طوری که در جدول ۱ و شکل ۱ مشاهده می شود باعث کاهش دامنه انقباضات ایلئوم خوکیچه هندی در دوزهای ۰/۲ تا ۶ میلی گرم در میلی لیتر می گردد.

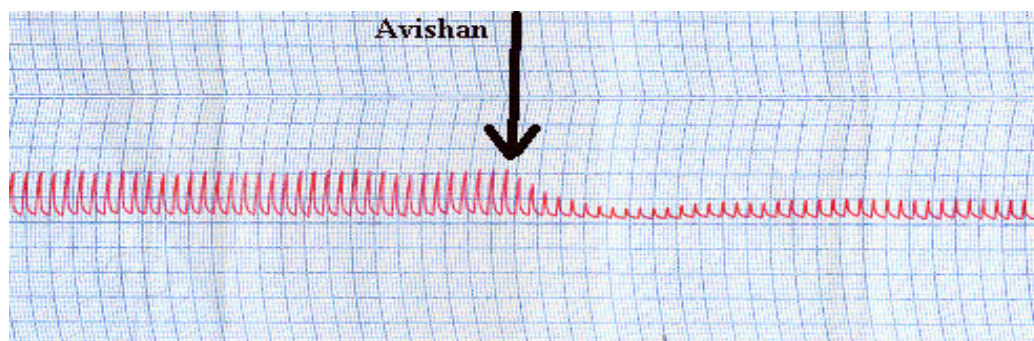
اما اثر عصاره با دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۰۶ میلی گرم در میلی لیتر با گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت. در شکل ۲ منحنی غلظت ۵۰٪ حداکثر اثر دارو (EC₅₀) ارائه شده است.

با استفاده از آنالیز رگرسیون مشاهده می گردد که با افزایش دوز عصاره اثر آن نیز افزایش یافته و ارتباط معنی داری قابل مشاهده می باشد ($p < 0/001$). به طوریکه از نتایج این آنالیز دیده می شود برای افزایش یک درصد اثر عصاره ضریب دوز عصاره ۰/۰۸۹ mg می باشد. همچنین مطابق شکل ۳ ترکیبات ذیل به حمام نسجی اضافه شدند که این نتایج حاصل شد:

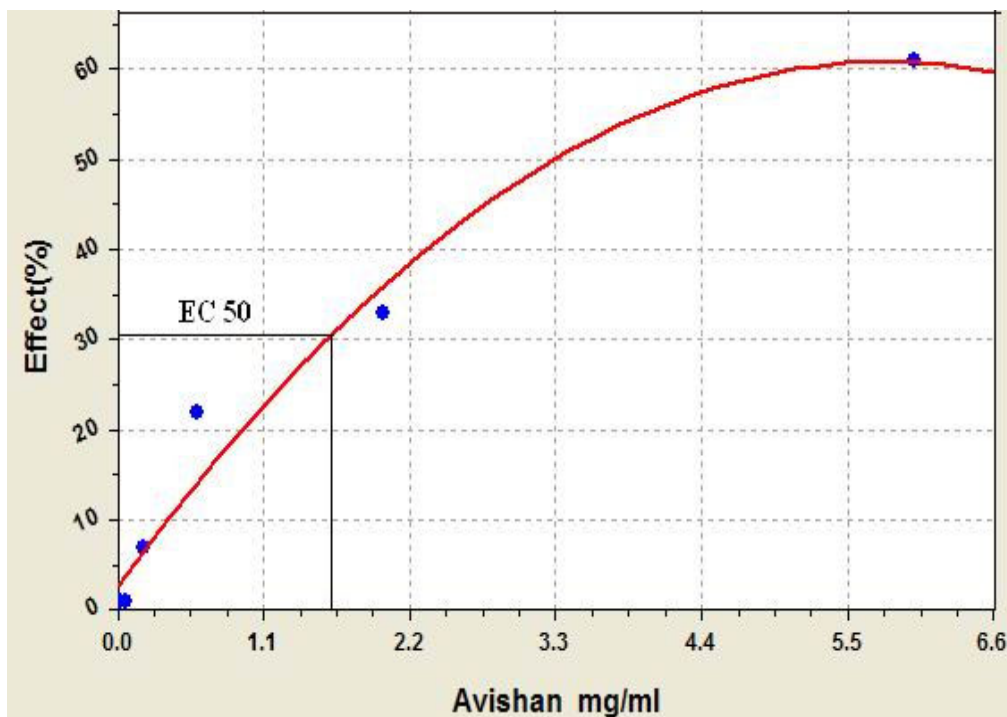
جدول ۱: اثر دوزهای مختلف آویشن در کاهش میانگین دامنه انقباضات عضلات ترمینال ایلئوم خوکیچه هندی

p	df	T	Standard Error (SE)	دامنه انقباضات				دوز دارو mg/ml
				گروه تست	گروه کنترل	اختلاف دو گروه	درصد کاهش	
۰/۷۳۵	۴	-۰/۳۶	۱/۸۱	۱۹/۸۶	۲۰/۵۱	۰/۶۵۶	۳/۱۹	۰/۰۲
۰/۳۶۴	۳	-۱/۰۶	۱/۷۰	۳۰/۸۴	۳۲/۶۶	۱/۸۲	۵/۵۷	۰/۰۶
× ۰/۰۴۴	۹	-۲/۳۴	۰/۶۷	۲۶/۳۵	۲۷/۹۳	۱/۵۸	۵/۶۵	۰/۲
× ۰/۰۰۹	۸	-۳/۴۴	۱/۹۴	۲۰/۹۹	۲۷/۶۷	۶/۶۸	۲۴/۱۴	۰/۶
× ۰/۰۰۵	۷	-۴/۰۸	۲/۵۹	۲۰/۶۷	۳۱/۲۶	۱۰/۵۹	۳۳/۸۷	۲
× ۰/۰۰۲	۶	-۵/۲۷	۲/۹۹	۱۰/۶۳	۲۶/۴۳	۱۵/۸۰	۵۹/۷۸	۶

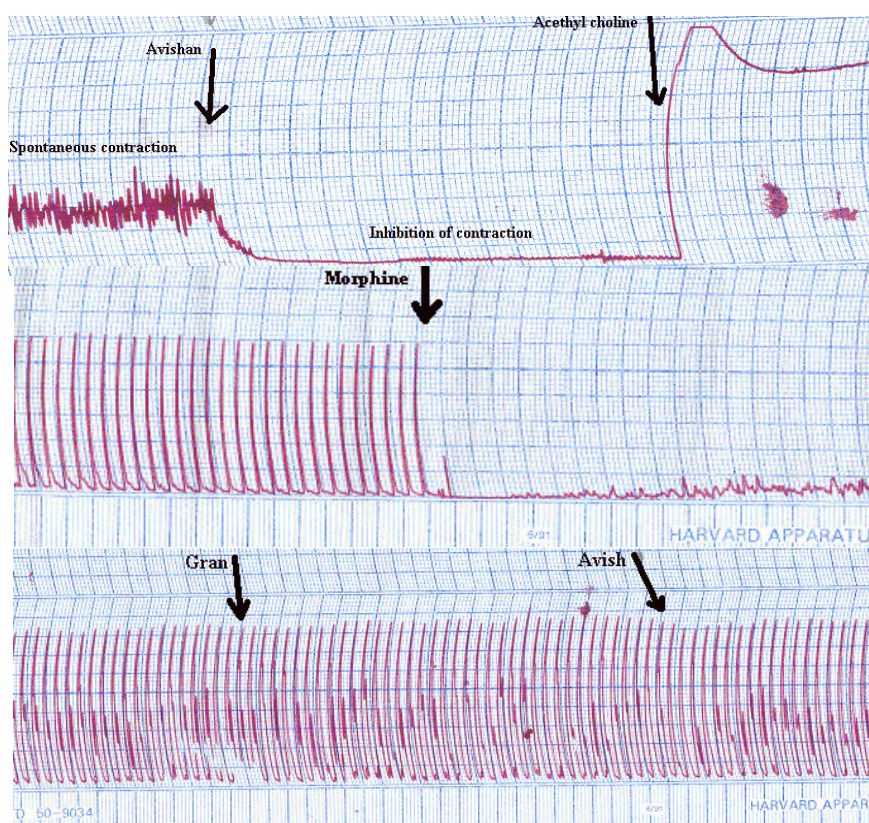
* Statistically significant (paired T-test)



شکل ۱: دامنه انقباضات عضلات ترمینال ایلئوم خوکیچه هندی در حضور آویشن با غلظت شش میلی گرم در میلی لیتر (هر مربع بزرگ برابر ۲۰ ثانیه است)



شکل ۲: منحنی پاسخ-دارو و غلظت ۵۰٪ اثر عصاره $\Gamma = 0.98$



شکل ۳: اثر استیل کولین و گرانسترون در حضور آویشن و اثر مورفین روی روده

بحث و نتیجه‌گیری

می‌باشد. در این مطالعه عصاره آویشن توانست انقباضات ایلئوم کوچکه هندی را مهار کند که این اثر با افزایش دوز بیشتر شده

با توجه به شیوع زیاد سندرم روده تحریک‌پذیر و وجود اسهال، یافتن داروهای مناسب و بدون عارضه همواره مدنظر

تحریک و به شدت منقبض شد اما روده در مجاورت با آویشن همراه با استیل کولین تحریک شد که این بار دامنه انقباضات کمتر بوده است. این امر نشان دهنده بلوک سیستم کولینرژیک به واسطه عصاره گیاه آویشن می‌باشد.

در مطالعه انجام شده با استفاده از روشهای ایمونوهیستوشیمی در روده Rat توزیع وسیع رسپتورهای 5-HT₃ در دیواره سلولها، فیبرهای عصبی سلولهای انتریک، فیبرهای عصبی آوران و سلولهای بینابینی Cajal را نشان دادند. فعال شدن رسپتورهای 5-HT₃ در شبکه های عصبی و عضلانی روده توسط باز جذب سروتونین در سلولهای کریپتی مهار میشود. در صورتی که در بررسی توسط MKC-733 که یک آگونیست گیرنده 5-HT₃ میباشد این ماده سبب تسریع در ترانزیت روده کوچک میشود (۱۶). آزمایش با گرانیسترون نشان داد که این عصاره از طریق بلوک گیرنده 5-HT₃ در مسیر سروتونین اثر دارد و از طریق این راه می‌تواند اثرات ضد انقباضی نیز داشته باشد اما بدلیل وجود دخالت مکانیسم های متعدد در حرکات روده نتیجه گیری مشکل میباشد. ترکیبات نالوکسان و مورفین بدلیل داشتن اثرات ایپوئیدی سبب مهار انقباضات روده شده و اضافه نمودن عصاره نیز تغییری در آن ایجاد نکرد و به همین علت در مورد اثر عصاره از طریق گیرنده های ایپوئیدی نمیتوان تفسیری ارائه نمود.

در این مطالعه نشان داده شد که اثرات آنتی اسپاسمودیک آویشن از طریق اثر آنتی کولینرژیک و همچنین تاثیر مهاری در مسیر سروتونینرژیک می باشد، بررسی دقیق مکانیسم عمل مستلزم مطالعات دقیق تر با استفاده از بلوک کننده یا تحریک کننده گیرنده ها، مطالعات Binding و استفاده از روش های ایمونوهیستوشیمیایی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از آقای مهندس اعتمادی در مرکز آموزش علمی - کاربردی جهاد کشاورزی استان سمنان جهت همکاری در تهیه گیاه آویشن و پرسنل مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان جهت همکاری در انجام مراحل مختلف مطالعه تشکر و قدر دانی می شود.

References

1. Everhart JE, Renault D. Irritable bowel syndrome in office-based practice in the United States. *Gastroenterology* 1991; **100**(4): 998-1005
2. زرگری ع. گیاهان دارویی. چاپ دوم، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۵، ص: ۲۲-۲۰
3. Meister A, Bernhardt G, Christoffel V, Buschauer A. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea:

وبعلاوه این اثر برگشت پذیر بوده و پس از چند دقیقه (بین ۲۰-۵ دقیقه) دامنه انقباضات به حد پایه قبلی باز می گشت. با توجه به این که بروز این اثر به صورت غیر قابل برگشت همانند سموم ارگانوفسفره امکان استفاده دارویی از یک ترکیب را بشدت کاهش میدهد وجود اثر برگشت پذیر توضیح داده شده در عصاره آویشن یک مزیت برای این ترکیب گیاهی می باشد.

این مطالعه نشان داد که آویشن می‌تواند دارای اثرات کاهش دهنده انقباضات روده بوده و در درمان اسهال مورد استفاده قرار گیرد. در یک مطالعه ۳۷٪ مراجعه کنندگان به کلینیک های تخصصی سابقه مصرف داروهای گیاهی را داشته اند که ۶٪ آنان از آویشن استفاده کرده بودند و اغلب این افراد را زنان و بیمارانی که دردهای مزمن در قسمت تحتانی شکم داشته اند تشکیل می دادند (۱۳).

نویسندگان موفق به یافتن گزارشی در رابطه با مکانیسم اثر این گیاه در روده نگردیدند با این وجود اثرات شل کنندگی آویشن بر روی عضله صاف توسط Briseid نشان داده شده است (۱۴). هم چنین اثر ضد اسپاسم عصاره آویشن بر روی نای کوچک هندی (۳) مشخص شده، که این مطالعه نیز اثر شل کنندگی عضله صاف را نشان داده است.

استفاده از داروهای رایج برای درمان اسهال در بیماران سندروم روده تحریک پذیر با عوارض همراه بوده و داروهای آنتی کولینرژیک باعث خشکی دهان و تاری دید و همچنین داروهای آنتی دپرسانت مثل آمی تریپتیلین باعث خواب آلودگی میشوند که مصرف طولانی مدت این ترکیبات مشکلاتی در زندگی روزمره ایجاد خواهد کرد. استفاده از ترکیبات جدیدتر مثل آلوسترون که آتاگونیست رسپتور 5-HT₃ میباشد با عارضه کولیت ایسکمیک همراه بوده و مصرف این دارو را محدود ساخته است، ترکیبات دیگر مثل لوپروماید و دی فنوکسیلات نیز با فواید قابل ملاحظه همراه نبوده است (۱۵).

استفاده از آزمون تحریک ایلئوم کوچک هندی با استفاده از ایمپالس های الکتریکی نشان دهنده آزاد شدن استیل کولین بوده و این انقباض توسط سیستم کولینرژیک و همراه با آزاد شدن استیل کولین می‌باشد. از بلوک این اثر در این مطالعه توسط آویشن می‌توان پیشنهاد کرد که مکانیسم اثر دارو ناشی از آنتی کولینرژیک بودن آن می‌باشد. زیرا روده در تماس با داروی استیل کولین

discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med.* 1999; **65**(6): 512-6.

4. Azaz AD, Irtem HA, Kurkcuoglu M, Baser KH. Composition and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some *Thymus* species. *Z Naturforsch [C]*. 2004; **59**(1-2): 75-80
5. Pina-Vaz C, Goncalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004; **18**(1): 73-8.

6. Dursun N, Liman N, Ozyazgan I, Gunes I, Saraymen R. Role of thymus oil in burn wound healing. *J Burn Care Rehabil.* 2003; **24**(6): 395-9.
7. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Lett Appl Microbiol.* 2003; **36**(3): 162-7.
8. Aboghazaleh BM. Inhibition of aeromonas and *A. sobira* by sodium chloride, citric acid, ascorbic acid, *Thymus vulgaris*. *Jpn J infec.* 2000; **53**(3): 111-5
9. 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.
10. Bonjar GH. Inhibition of Clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia.* 2004; **75**(1): 74-6.
11. Harpaz S, Glatman L, Drabkin V, Gelman A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J Food Prot.* 2003; **66**(3): 410-7.
12. Lee KG. Determination of antioxidant potential of volatile extract isolated from herbs. *J Agric Food Chem.* 2002; **50**(17): 4947-52
13. Devesa Jorda F, Pellicer Bataller J, Ferrando Ginestar J, Borghol Hariri A, Consumption of medicinal herbs in patients attending a gastroenterology outpatient clin. *Gastroenterol Hepatol.* 2004; **27**(4): 244-9.
14. Briseid K, Dyrod OK. The smooth muscle relaxant effect of thyme. *acta pharmacol Toxicol(copenh).* 1962; **19**: 345-55
15. Poynard T, Regimbeau C, Benhamou Y. Meta-analysis of smooth muscle relaxants in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; **15**(3): 355-61
16. Glatzle J, Sternini C, Robin C. Expression of 5-HT₃ receptors in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2002; **123**(1): 217-26.