

## مقایسه میزان تأثیر جوشانده شیرین بیان با آنتی بیوتیک های انتخابی بر رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط آزمایشگاهی

دکتر شکوه تقی پور ظهیر<sup>۱\*</sup>، دکتر هنگامه زندی<sup>۲</sup>، دکتر ضیاء الله بوتراپی<sup>۳</sup>، دکتر ناهید مراث<sup>۴</sup>

### چکیده

**مقدمه:** شیرین بیان (Glycyrrhizaglabra) از گیاهان خانواده پروانه آسامی باشد که در گذشته، هم به عنوان دارو وهم به عنوان غذا مورد استفاده مردم بوده است. اخیراً در مطالعات انجام گرفته اثرات مختلفی برای آن کشف شده است از جمله خواص آنتی اکسیدان - آنتی میکروبیال - ضد التهاب و عصاره این داروی گیاهی را در درمان زخم های پپتیک که در حدود ۷۰٪ از آنها با عفونت هلیکوباکتر پیلوری همراه بوده است مؤثر شناخته اند.

**روش بررسی:** در این مطالعه تأثیر جوشانده شیرین بیان 20gr/dl, 33gr/dl به دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت بر مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با آنتی بیوتیک های انتخابی (آموکسی سیلین - مترونیدازول - کلاریترومایسین) به صورت تحلیلی و به روش Lab trail بر روی ۳۰ نمونه که از طریق آندوسکوپی و بیوپسی از بیماران با تشخیص زخم معده گرفته شده بود انجام گردید.

**نتایج:** نتایج به دست آمده نشان داد که فقط جوشانده شیرین بیان 33gr/ dl به روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با آنتی بیوتیک مترونیدازول اثر یکسانی بر مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط آزمایشگاهی دارد (p=0.709) ولی در مقایسه با آموکسی سیلین و کلاریترومایسین چنین نتیجه ای به دست نیامد (p=0.0001).

**نتیجه گیری:** به طور کلی استفاده از جوشانده شیرین بیان (20gr/dl, 33 gr /dl) به جای آنتی بیوتیک های انتخابی درمان پپتیک اولسر (آموکسی سیلین - کلاریترومایسین) در شرایط آزمایشگاهی نمی تواند سبب مهار هلیکوباکتر پیلوری شود.

**کلید واژه ها:** شیرین بیان - هلیکوباکتر پیلوری - پپتیک اولسر - دیسک دیفیوژن

### مقدمه

استفاده از گیاهان در ایران قدمتی همپای تاریخ این سرزمین دارد و استفاده های طبی از گیاهان عمری دیرینه دارد<sup>(۱)</sup> یکی از بیماری های مهم که همواره انسان با آن دست

به گریبان بوده بیماری های میکروبی است و مقاومت میکروبی در برابر آنتی بیوتیک ها از موضوعات مهمی است که در امر درمان بیماری های عفونی رو به افزایش است<sup>(۳,۲)</sup> شیرین بیان از قدیمی ترین داروهایی است که ابوعلی سینا نیز در کتاب خود خواص درمانی فراوانی برای آن برشمرده است<sup>(۴)</sup>. مهم ترین ماده موجود در ریشه شیرین بیان را گلیسرین تشکیل می دهد که گگیلوزیدی از دسته ساپونینها است و ۵۰ برابر شیرین تر از قند است این ماده در آب و الکل به مقادیر زیاد حل می شود و مقدار آن متناوب و به نوع گیاه (وارتبه) و شرایط اقلیمی محل رویش بستگی دارد<sup>(۵,۶)</sup> اسید گلیسرینیک موجود در شیرین بیان

\*۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه پاتولوژی - بخش آسیب شناسی

تلفن: ۰۳۵۱ ۸۲۲۹۲۹۱ Email: Shokouh\_Zahir@yahoo.com

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی - دانشکده پزشکی

۳- استادیار گروه بیماریهای داخلی

۴- پزشک عمومی، سازمان انتقال خون یزد

۱۳۸۴- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد

تاریخ دریافت: ۸۴/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۲۳

مقالات مختلف نظرات متفاوتی گزارش شده است<sup>(۱۲،۱۳)</sup>. در یک تحقیق وسیع در ژاپن Fukai و همکاران تأثیر فلاونوئید های مشتق از عصاره گیاه شیرین بیان را بر رشد هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار دادند که نتیجه حاصله نشان داد که در بین ترکیبات شیمیایی این گیاه گلابریدین، گلابرین، ترکیبات Licoisoflavone B, Licoricidin, Licochalcone A دارای اثر مهار بر رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط آزمایشگاهی هستند. همچنین این محققین عصاره متانولی این گیاه را نیز تهیه کرده و ۱۵ فلاونوئید جدید از این عصاره استخراج کردند که این فلاونوئیدهای جدید دارای تاثیرمهار بر رشد هلیکوباکتر پیلوری حتی در انواع مقاوم به کلاریترومایسین و آموکسی سیلین بودند<sup>(۱۲)</sup>. در یک تحقیق مشابه دیگر، Okada و همکاران در ژاپن (۱۹۸۹) به بررسی ترکیبات عصاره شیرین بیان روسی و چینی پرداختند و این نتایج را اعلام داشتند که گلابرین، گلابریدین و B, Licochalcone A دارای اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدان می باشند<sup>(۲۱)</sup>. لذا بر آن شدیم تا با بررسی جوشانده Licorice بر روی رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط آزمایشگاهی به این مهم دست یابیم که چنانچه بتواند سبب مهار رشد آن بشود به عنوان یک داروی گیاهی که در دسترس، ارزان تر، با عوارض جانبی کمتر و با پذیرش بهتر از جانب بیماران همراه است بتواند به عنوان یک عامل جایگزین آنتی بیوتیکی جهت ریشه کنی آن در درمان بیماران مبتلا مورد بررسی های دقیق تری قرار گیرد.

### روش بررسی

این تحقیق از نوع تحلیلی و به روش Lab trail بر روی سی نمونه هلیکوباکتر پیلوری انجام گرفت بدین صورت که نمونه های بیوپسی که از طریق آندوسکوپی از بیماران با تشخیص زخم معده یا اثنی عشر در بخش آندوسکوپی بیمارستان شهید صدوقی یزد گرفته شده بود را در محیط ترانسپورت به آزمایشگاه میکروب شناسی انتقال داده و با انجام تست اوره آز اولیه با بخشی از نمونه و به بقیه نمونه ۰/۵ میلی متر محلول نرمال سالین افزوده شده و پس از خرد کردن هموژنیزه

می تواند باعث مهار مسیرهای آنزیماتیک سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز شود<sup>(۷،۸)</sup> از طرفی از تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن O<sub>2</sub> و آب اکسیژنه (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>(۹)</sup> و نیز از مهاجرت سلولی جلوگیری به عمل می آورد<sup>(۱۰)</sup> و باعث مهار متابولیسم آراشیدونات، نفوذ پذیری عروقی و آلرژی می شود<sup>(۷،۱۱)</sup> که تمام این موارد سبب کاهش واکنش های التهابی می شود. گلابریدین و گلابرین موجود در شیرین بیان اثر مهار روی رشد هلیکوباکتر پیلوری حتی در گونه های مقاوم به آموکسی سیلین و متی سیلین دارند<sup>(۱۲،۱۳)</sup> از جوشانده شیرین بیان در درمان سرفه های عصبی، التهاب نای، کولیک، یبوست، انواع گاستریت، زخم های معده و دوازدهه، بلع هوا، نفخ روده و اسپاسم روده ای استفاده می شود<sup>(۱۴،۱۵،۱۶)</sup>. سازندگان داروها اخیراً راهی برای جدا کردن گلوسیریدین موجود در شیرین بیان از آن پیدا کرده اند و فرآورده های جدید را به بازار عرضه کرده اند که به نام Deglylyrrhizinated Licorice گفته می شود. در تحقیقات انجام گرفته DGL در درمان پپتیک اولسر و نیز پیشگیری از زخم های ایجاد شده به واسطه مصرف داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDS) و آسپرین موثر شناخته شده است<sup>(۱۸،۱۷)</sup>. هلیکوباکتر پیلوری ارگانیزم غیر تهاجمی، گرم منفی است که در موکوس معده زندگی می کند و درصد کمی از آنها به مخاط متصلند<sup>(۲۰،۱۹)</sup> شیوع آن در کشورهای در حال توسعه بیش از ۸۰٪ است و میزان شیوع بسته به سن متفاوت است و بیش از ۸۰٪ زخم های پپتیک با کلونیزاسیون آن مرتبط هستند. این باکتری در محیط آزمایش به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها حساس است ولی مونوتراپی در محیط بدن ناموفق بوده است. عدم موفقیت تک درمانی منجر به پیدایش رژیم های چند دارویی شده است. شکست درمان به دنبال عدم رعایت رژیم درمانی شایع بوده و اغلب منجر به مقاومت اکتسابی نسبت به مترونیدازول و کلاریترومایسین می شود<sup>(۱۹)</sup>. اخیراً در مطالعات انجام شده، Licorice یا شیرین بیان را به عنوان یک عامل مؤثر در درمان بیماران مبتلا به پپتیک اولسر در شرایط In vivo معرفی کرده اند ولی در این مورد که آیا می تواند هلیکوباکتر پیلوری را ریشه کن کند یا نه هنوز در

واسط (I) و قطر هاله کمتر از ۱۸ میلی متر مقاوم (R) در نظر گرفته شد. دیسک آنتی بیوتیکی مترونیدازول با قطر هاله  $\geq 21$  میلی متر برای هلیکوباکتر حساس (S) و ۲۱-۱۶ میلی متر حدواسط (I) و قطر هاله کمتر از ۱۶ میلی متر مقاوم (R) در نظر گرفته شد. در مورد دیسک آنتی بیوتیکی کلاریترومایسین وجود هاله به هر اندازه برای هلیکوباکتر حساس (S) گزارش می شود و تشکیل نشدن هاله به معنی مقاوم بودن است. در نهایت قطر هاله های حاصل از فعالیت جوشانده شیرین بیان غلظت 20gr/dl و 33gr/dl در هر یک از دو روش با شاهد یعنی قطر هاله های ایجاد شده توسط دیسک های آنتی بیوتیکی مقایسه و ضبط گردید و تجزیه و تحلیل اطلاعات به وسیله رایانه و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS صورت گرفت و از آزمونهای آماری t.test, paired t test استفاده شد و سطح اعتماد 95% (CI) و  $P < 0.05$  به عنوان معنی دار تلقی گردید.

### نتایج

میانگین قطر هاله تولید شده آنتی بیوتیک های مورد استفاده و جوشانده شیرین بیان با غلظت های مختلف در دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت اندازه گیری و تعیین شد (جدول ۱). از ۳۰ نمونه هلیکوباکتر پیلوری ۶ مورد مقاوم به مترونیدازول، ۵ مورد حدواسط و ۱۹ مورد حساس به مترونیدازول بودند (جدول ۲).

جدول ۱ میانگین قطر هاله تولید شده توسط آنتی بیوتیک های مورد استفاده و جوشانده شیرین بیان با غلظت های مختلف در دو روش دیفیوژن و چاهک پلیت

| آزمون                   | میانگین قطر هاله (mm) | * S.D |
|-------------------------|-----------------------|-------|
| آموکسی سیلین            | ۲۵/۷۳                 | ۶/۷۴  |
| مترونیدازول             | ۲۲/۳۷                 | ۴/۵۷  |
| چاهک شیرین بیان 33gr/dl | ۱۸/۶۷                 | ۱/۹۴  |
| چاهک شیرین بیان 20gr/dl | ۱۵/۰۷                 | ۱/۶۲  |
| دیسک شیرین بیان 33gr/dl | ۲۲                    | ۲/۲۴  |
| دیسک شیرین بیان 20gr/dl | ۱۹/۸۰                 | ۱/۸۶  |

\* S.D= انحراف معیار

کردن بر روی محیط کشت اختصاصی (کلمبیا آگار غنی شده با ۰/۵٪ خون گوسفندی همراه با آنتی بیوتیک های وانکوماسین 10mg و تری متوپریم 50mg و پلی میکسین B ۲۵۰۰ واحد با مارک زیگما) و محیط غیر اختصاصی (شکلات آگار با مارک مرک) کشت داده شد<sup>(۲۲)</sup> و پس از آن محیط های کشت به مدت ۷-۵ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط میکرواثر و فلیک (CO<sub>2</sub> 10%, O<sub>2</sub> 5%) رشد داده و پس از تشکیل کلنی و رنگ آمیزی گرم و انجام تست های بیوشیمیایی لازم نوع باکتری مسلم و ایزوله گردید. جهت تهیه جوشانده شیرین بیان با غلظت 33gr/dl, 20gr/dl ابتدا ۲۰ و ۳۳ گرم شیرین بیان را در 100cc آب مقطر ۲ بار تقطیر به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و سپس حجم محلول حاصل را مجدداً با آب مقطر به 100cc رسانیدیم بدین ترتیب محصول بدست آمده جوشانده شیرین بیان با غلظت های ۲۰ و ۳۳ گرم در دسی لیتر به دست آمد<sup>(۳)</sup>. سپس بر روی محیط مولر هنتون با (مارک Antec Diagnostic) از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت معادل (0.5 Mcfarland) کشت داده شد. جهت تعیین حساسیت و مقاومت باکتری ها در مقابل شیرین بیان و آنتی بیوتیک های انتخابی از دو روش به طور جداگانه استفاده شد در روش اول به وسیله انتهای پیت پاستور استریل با قطر ۶ میلی متر ۲ چاهک به عمق ۲ میلی متر بر روی محیط کشت ایجاد نموده و در هر کدام 20  $\mu$ L نمونه از جوشانده شیرین بیان با غلظت 33gr/dl, 20gr/dl قرار داده شد، در روش دوم دیسک خام را در جوشانده شیرین بیان با غلظت 33gr/dl, 20gr/dl به مدت یکساعت خوابانده و بعد از خشک شدن در درجه حرارت محیط آنها را بر روی محیط کشت داده شده قرار دادیم. همچنین از دیسک های آنتی بیوتیک مترونیدازول (4 $\mu$ g)، آموکسی سیلین (25 $\mu$ g) و کلاریترومایسین (2 $\mu$ g) با مارک پادتن طب بر روی محیط کشت قرار داده شد بعد از نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد و در شرایط میکرواثر و فلیک قطر هاله عدم رشد اندازه گیری گردید به طوری که دیسک آنتی بیوتیکی آموکسی سیلین با قطر هاله ۲۲ میلی متر برای هلیکوباکتر پیلوری حساس (S) قطر هاله ۲۱-۱۹ میلی متر حد

دیفیوژن بر روش چاهک پلیت ارجحیت دارد و بهتر از روش چاهک پلیت می تواند شیرین بیان را در خود حفظ کرده و به محیط کشت انتقال دهد (جدول ۶).

**جدول ۲: وضعیت حساسیت هلیکوباکتر پیلوری در مقابل آنتی بیوتیک های انتخابی (n=30)**

| وضعیت حساسیت   | مقاوم (R) |      | حداوسط (I) |       | حساس (S) |       |
|----------------|-----------|------|------------|-------|----------|-------|
|                | تعداد     | درصد | تعداد      | درصد  | تعداد    | درصد  |
| آموکسی سیلین   | ۲         | ۶/۶۷ | ۴          | ۱۳/۳۳ | ۲۴       | ۸۰    |
| کلاریترومایسین | ۶         | ۲۰   | ۰          | ۰     | ۲۴       | ۸۰    |
| مترونیدازول    | ۶         | ۲۰   | ۵          | ۱۶/۶۷ | ۱۹       | ۶۳/۳۳ |

**جدول ۳: میانگین قطر هاله تولید شده توسط آموکسی سیلین (25 µg) و جوشانده شیرین بیان با غلظت های مختلف به دو روش دیفیوژن و چاهک پلیت**

| *P-Value | S.D  | میانگین تفاوت (d) | غلظت و روش استفاده از جوشانده شیرین بیان |
|----------|------|-------------------|--|
| ۰/۰۰۰۱   | ۷/۰۴ | ۷/۷۰              | چاهک شیرین بیان 33gr/dl                  |
| ۰/۰۰۰۱   | ۶/۷۳ | ۱۰/۶۷             | چاهک شیرین بیان 20gr/dl                  |
| ۰/۰۰۰۹   | ۷/۳۲ | ۳/۷۳              | دیسک شیرین بیان 33gr/dl                  |
| ۰/۰۰۰۱   | ۶/۵۵ | ۵/۹۳              | دیسک شیرین بیان 20gr/dl                  |

قطر هاله جوشانده شیرین بیان - قطر هاله آموکسی سیلین = d

آزمون \*paired.t.test

میانگین قطر هاله تولید شده توسط آنتی بیوتیک آموکسی سیلین با اختلاف  $7/40 \pm 7/07$  میلی متر بیشتر از قطر هاله تولید شده توسط چاهک شیرین بیان 33gr/dl است (p-value = 0.0001).

**جدول ۴: میانگین تفاوت قطر هاله تولید شده مترونیدازول (۱µg) و جوشانده شیرین بیان با غلظت های مختلف به دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت**

| *P-Value | S.D  | میانگین تفاوت (d) | غلظت و روش استفاده از جوشانده شیرین بیان |
|----------|------|-------------------|--|
| ۰/۰۰۱    | ۵/۲۴ | ۳/۷۰              | چاهک شیرین بیان 33gr/dl                  |
| ۰/۰۰۰۱   | ۴/۸۲ | ۷/۳۰              | چاهک شیرین بیان 20gr/dl                  |
| ۰/۷۰۹    | ۵/۳۲ | ۰/۳۷              | دیسک شیرین بیان 33gr/dl                  |
| ۰/۰۰۷    | ۴/۸۳ | ۲/۵۷              | دیسک شیرین بیان 20gr/dl                  |

قطر هاله جوشانده شیرین بیان - قطر هاله مترونیدازول = d

آزمون \*paired.t.test

S.D = انحراف معیار

میانگین تفاوت قطر هاله تولید شده توسط آنتی بیوتیک های انتخابی (آموکسی سیلین و مترونیدازول) و جوشانده شیرین بیان با غلظت های متفاوت در هر دو روش با استفاده از آزمون Paired t.test محاسبه گردید که فقط قطر هاله تولید شده توسط آنتی بیوتیک مترونیدازول با قطر هاله تولید شده توسط دیسک شیرین بیان 33 gr/dl یکسان بود میانگین و تفاوت نزدیک صفر بود ( $p = 0.709$ ) ولی در بقیه موارد قطر هاله تولید شده توسط آنتی بیوتیک های انتخابی بیشتر از قطر هاله تولید شده توسط شیرین بیان بود ( $p = 0.0001$ ) (جدول ۳ و ۴).

بنابراین به طور کلی کمترین اختلاف مربوط به دیسک شیرین بیان 33gr/dl با آنتی بیوتیک مترونیدازول می باشد که با  $p = 0.709$  اثری معادل هم دارند. اما در مورد دیسک شیرین بیان 20gr/dl و چاهک شیرین بیان 20gr/dl و 33gr/dl چنین نتیجه ای در مقایسه با آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین و مترونیدازول به دست نیامد و در شرایط این مطالعه نمی تواند اثر مهارتی بیشتری بر رشد هلیکوباکتر پیلوری داشته باشد.

میانگین قطر هاله تولید شده شیرین بیان در دو گروه نمونه هلیکوباکتر پیلوری حساس و مقاوم به کلاریترومایسین توسط آزمون t.test مقایسه گردید. از ۳۰ نمونه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی ۲۴ مورد حساس (هاله دار) و ۶ مورد مقاوم (بدون هاله) بود که میانگین قطر هاله حاصل از جوشانده شیرین بیان در این دو گروه تفاوت معنی داری پیدا نکرد و لذا اثر جوشانده شیرین بیان (قطر هاله تولید شده) در دو گروهی که از نظر آنتی بیوتیک کلاریترومایسین متفاوت بودند (حساس و مقاوم) یکسان است (جدول ۵).

میانگین قطر هاله تولید شده توسط جوشانده شیرین بیان 33gr/dl در روش دیسک دیفیوژن  $2/56 \pm 3/33$  میلی متر بیشتر از روش چاهک پلیت می باشد ( $p = 0.0001$ ) هم چنین میانگین قطر هاله تولید شده توسط جوشانده شیرین بیان 20gr/dl در روش دیسک دیفیوژن  $2/29 \pm 4/73$  میلی متر بیشتر از روش چاهک پلیت می باشد ( $p = 0.0001$ ) این نتایج نشان می دهد که روش دیسک

جدول ۵: میانگین قطر هاله تولید شده توسط شیرین بیان در دو گروه نمونه های هلیکوباکتر پیلوری حساس و مقاوم به کلاریترومایسین (2µg)

| P-Value | مقاوم |                  | حساس  |      | آزمون کلاریترومایسین |       | غلظت و روش استفاده از جوشانده شیرین بیان |
|---------|-------|------------------|-------|------|----------------------|-------|--|
|         | S.D   | میانگین قطر هاله | تعداد | S.D  | میانگین قطر هاله     | تعداد |  |
| ۰/۲۴۵   | ۱/۸۷  | ۱۹/۵۰            | ۶     | ۱/۹۳ | ۱۸/۴۶                | ۲۴    | چاهک شیرین بیان 33gr/dl                  |
| ۰/۹۱۲   | ۲/۶۸  | ۱۵               | ۶     | ۱/۳۲ | ۱۵/۰۸                | ۲۴    | چاهک شیرین بیان 20gr/dl                  |
| ۱/۰۰    | ۲/۲۸  | ۲۲               | ۶     | ۲/۲۸ | ۲۲                   | ۲۴    | دیسک شیرین بیان 33gr/dl                  |
| ۰/۹۶۲   | ۱/۳۳  | ۱۹/۸۳            | ۶     | ۲    | ۱۹/۷۹                | ۲۴    | دیسک شیرین بیان 20gr/dl                  |

\* t.test آزمون

### بحث

امروزه با پیدایش پدیده مقاومت میکروبی در برابر آنتی بیوتیک ها ضرورت دستیابی به ترکیبات جدید با فعالیت ضد میکروبی بیشتر احساس می گردد<sup>(۲۳)</sup>. گیاهان جزء مواد طبیعی می باشند و با طبیعت انسان سازگاری دارند و همچنین استفاده بومی از گیاه شیرین بیان از دیرباز مورد توجه دانشمندان علوم گیاهی و پزشکان بوده است<sup>(۱)</sup> و اخیراً نیز در مطالعات انجام شده شیرین بیان به عنوان یک عامل مهار کننده هلیکوباکتر پیلوری معرفی شده است. در مطالعه ای که Krausse و همکاران اثر عصاره شیرین بیان را بر روی ۲۹ مورد سوش هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار دادند و دیدند Glycrrhetic Acid (GA) موجود در شیرین بیان ترکیب بسیار قوی جهت مهار رشد ۷۹/۳٪ از سوش ها می باشد و سوش های مقاوم به کلاریترومایسین در غلظت های 12.5 و 25mg/l و سوش های مقاوم به مترونیدازول در غلظت های 50,25 mg/l 200 می شوند و این طور نتیجه گیری کردند که (GA) سبب عدم رشد هلیکوباکتر پیلوری شده و می تواند در آینده نزدیک جهت درمان زخم پپتیک مورد استفاده قرار گیرد<sup>(۲۴)</sup>.

در مطالعه دیگری سلیمانی رهبر و همکاران در بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی شهید بهشتی تهران از شیرین بیان با استفاده از حلال متانول ۸۰٪ عصاره گیری کردند و این عصاره به نسبت های ۱/۱۶ و ۱/۸/۴، ۱/۲ و ۱/۱۶ رقیق شده و سپس دیسک های کاغذی آنتی بیوگرم از آنها تهیه گردید و بر روی محیط های کشت شده اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس

جدول ۶: میانگین تفاوت قطر هاله تولید شده توسط دوروش دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت بر حسب غلظت های مختلف جوشانده شیرین بیان

| *P-V R | S.D  | میانگین تفاوت (d) | دوز جوشانده شیرین بیان |
|--------|------|-------------------|------------------------|
| alue   |      |                   |                        |
| ۰/۰۰۰۱ | ۲/۵۶ | ۳/۳۳              | 33gr/dl                |
| ۰/۰۰۰۱ | ۴/۸۲ | ۴/۷۳              | 20gr/dl                |

قطر هاله جوشانده شیرین بیان - قطر هاله دیسک شیرین بیان d =  
\*paired.t.test آزمون

جدول ۷: میانگین تفاوت قطر هاله تولید شده به وسیله دو غلظت مورد استفاده (33gr/dl و 20 gr/dl) بر حسب روش استفاده از جوشانده شیرین بیان

| *P-Value | S.D  | میانگین تفاوت (d) | روش استفاده از جوشانده شیرین بیان |
|----------|------|-------------------|-----------------------------------|
| ۰/۰۰۰۱   | ۲/۳۹ | ۳/۶               | چاهک و پلیت                       |
| ۰/۰۰۱    | ۳/۱۷ | ۲/۲               | دیسک دیفیوژن                      |

قطر هاله جوشانده شیرین بیان 20 gr/dl - قطر هاله دیسک شیرین بیان 33gr/dl d =  
\*paired.t.test آزمون

میانگین قطر هاله تولید شده توسط جوشانده شیرین بیان 33gr/dl در هر دو روش چاهک پلیت و دیسک دیفیوژن بیشتر از 20 gr/dl است و میانگین این تفاوت در روش چاهک پلیت ۳/۶±۲/۳۹ میلی متر (p=۰/۰۰۰۱) و در روش دیسک دیفیوژن ۲/۲±۳/۱۷ میلی متر (p=۰/۰۰۱) است. بنابراین با افزایش غلظت شیرین بیان قطر هاله تشکیل شده در محیط کشت افزایش می یابد (جدول ۷). اثر دیسک جوشانده شیرین بیان 33gr/dl با اثر مترونیدازول در مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری یکسان بوده است.

مطالعه حاضر تاثیر بیشتری بر کاهش رشد هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با آنتی بیوتیک های انتخابی (کلایتروماکسین آموکسی سیلین) ندارد و نمی توان از این فراورده گیاه به عنوان یک داروی آنتی میکروبیال جایگزین آنتی بیوتیک های انتخابی (کلایتروماکسین آموکسی سیلین) بر علیه هلیکوباکتر پیلوری استفاده کرد. اگر چه ممکن است علت تخفیف علائم بیماری در بیماران مبتلا به Peptic disease که از جوشانده شیرین بیان استفاده می کنند به علت اثرات ثابت شده دیگری در شیرین بیان از قبیل محافظت مخاطی، کاهش فعالیت پپسین و یا افزایش ویسکوزیته مخاط معده نیز باشد<sup>(۲۳)</sup> که این اثرات در شرایط آزمایشگاهی قابلیت دستیابی و بررسی ندارند. بنابراین ذکر این نکته مهم است که تمامی نتایج به دست آمده در این تحقیق مربوط به شرایط In vitro می باشند و در شرایط Invivo ممکن است جوشانده شیرین بیان بتواند به لحاظ همراهی با اثرات ذکر شده فوق باعث مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری گردد.

**نتیجه گیری:** عامل اصلی در بروز خاصیت ضد میکروبی شیرین بیان فلاونوئیدهای موجود در این گیاه است و هر چه درصد این فلاونوئیدها بیشتر باشد این خاصیت قوی تر است در این تحقیق دیسک جوشانده شیرین بیان با غلظت 33gr/dl در مقایسه با مترونیدازول دارای میانگین قطر هاله یکسانی در مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری بود (به ترتیب ۲۲ و ۲۲/۳۷ میلی متر) اما در سایر موارد جوشانده شیرین بیان نتوانست با آنتی بیوتیک های انتخابی در مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری برابری کند بنابراین استفاده از شیرین بیان به روش سنتی (جوشانده، دم کرده) و با غلظت 20gr/dl و 33gr/dl و در شرایط مطالعه حاضر در مقایسه با آنتی بیوتیک های انتخابی (آموکسی سیلین، کلایتروماکسین) تاثیری در مهار رشد هلیکو باکتر پیلوری ندارد.

### پیشنهاد ها

استفاده از شیرین بیان به صورت سنتی (جوشانده، دم کرده) و با دو غلظت 20gr/dl و 33gr/dl و در شرایط مطالعه حاضر در مقایسه با آنتی بیوتیک های انتخابی تاثیر بیشتری بر مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری ندارد لذا این روش جهت تلخیص

آرئوس قرار داده شد و با دیسک های جنتامایسین و وانکوماکسین به عنوان شاهد مقایسه گردید که با مقایسه قطر هاله های عدم رشد در اطراف دیسک ها این نتایج به دست آمد. عصاره غلیظ شیرین بیان بر روی استاف آرئوس دارای اثر مناسب و بر روی E.coli اثر متوسط داشته است. عصاره های ۱/۲ و ۱/۴ بر روی هر دو باکتری اثر متوسط و بقیه غلظت ها بر روی آنها بی اثر بوده است<sup>(۲۵،۲۶)</sup>. همچنین مسعود امامی و همکاران، در دانشگاه علوم پزشکی تهران به بررسی اثرات ضدقارچی شیرین بیان به روش In Vivo پرداخته و به این نتیجه دست یافتند که استفاده از پماد شیرین بیان ۱٪ در مقایسه با پماد کلوتریمازول ۱٪ سبب کوتاهتر شدن طول دوره درمان و موفقیت بیشتر در درمان بیماران می گردد<sup>(۲۳)</sup>. در مقایسه نتایج مطالعات قبلی با مطالعه حاضر به نظر می رسد که:

اولاً روش به کار گیری شیرین بیان در این مطالعات با مطالعه حاضر متفاوت است به این صورت که در این تحقیق از شیرین بیان به فرم جوشانده که به صورت سنتی مورد استفاده عوام است استفاده شد در حالی که در مطالعات قبلی از شیرین بیان که به روش های صنعتی عصاره گیری شده استفاده گردیده است<sup>(۲۱،۲۷)</sup> بنابراین استفاده از روش جوشاندن یا دم کردن و با دو غلظت 20gr/dl و 33gr/dl در استخراج مواد مؤثر موجود در شیرین بیان جهت مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری مناسب نمی باشد. ثانیاً در مطالعات قبلی به جای آب مقطر از حلال هایی نظیر اتانول، فنل و یا N-هگزان استفاده شده است که احتمالاً این حلال ها سبب جدا کردن Fraction باکتریوسیدی گیاه از مواد غیرباکتریوسیدی می شوند که در مورد آب مقطر چنین ویژگی مشاهده نشد<sup>(۱۲،۲۱)</sup> همچنین ممکن است غلظت یا درصد مواد مؤثر شیرین بیان در گونه روسی و چینی بیشتر از گونه ایرانی باشند<sup>(۴)</sup> و لذا به نظر می رسد جهت تهیه عصاره شیرین بیان و استخراج مواد مؤثر موجود در گیاه که بر رشد هلیکوباکتر پیلوری اثر دارند استفاده از حلال هایی نظیر اتانول، فنل و N-هگزان و خالص سازی فراورده های حاصل به روش های تقطیر صنعتی مناسب تر باشد<sup>(۱۸،۲۲)</sup> و استفاده از شیرین بیان به صورت سنتی (دم کرده و جوشانده) و با شرایط

بیشتری بر مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با آنتی بیوتیک های انتخابی داشته باشد. روش دیسک دیفیوژن نسبت به روش چاهک پلیت قابلیت بیشتری دارد و لذا جهت بررسی خواص آنتی میکروبیال میتوان از این روش به جای چاهک پلیت استفاده کرد.

### سپاسگزاری

از آقایان دکتر علیرضا وحیدی و مهندس احمدیه که با راهنمایی های ارزنده شان ما را در این پژوهش یاری نموده اند کمال سپاسگزاری را داریم.

مواد باکتریوسیدی شیرین بیان مناسب نمی باشد. با توجه به مؤثر بودن فلاونوئیدهای موجود در شیرین بیان در مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری توصیه به جداسازی Fraction باکتریوسیدی این گیاه به روش های دیگر (تقطیر صنعتی و استفاده از حلال های اسیدی و الکلی) می شود تا بتوان از این داروی گیاهی به عنوان عامل درمان کننده به جای آنتی بیوتیک های انتخابی استفاده کرد.

با توجه به افزایش میانگین قطر هاله حاصل از جوشانده شیرین بیان با غلظت 33gr/dl نسبت به 20gr/dl ممکن است استفاده از غلظت های بالاتر جوشانده شیرین بیان بتواند تأثیر

### منابع

- 1- میر - محمد تقی. فرهنگ و اصطلاحات طبی سنتی در ایران (۳) چاپ اول - دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران - ۱۳۸۰: ۸۶-۸۷.
- 2- دهقان - علی. بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاه هونه چو- پایان نامه دکترای عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی- دانشگاه علوم پزشکی شیراز- ۱۳۷۹: ۸۲-۵۷ و ۳۲-۱.
- 3- صمصام شریعت- ه، معطر- ف. عصاره گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش شناسایی و ارزشیابی آن - چاپ اول - انتشارات مانی - ۱۳۷۳: ۱۲ و ۱۴ و ۱۹ و ۳۶.
- 4- امیدبگی - رضا. تولید و فرآوری گیاهان دارویی (۳) چاپ اول - انتشارات آستان قدس رضوی ۱۳۷۹: ۲۶۶-۲۷۵.
- 5- آینه چی - یعقوب. مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران - چاپ اول انتشارات دانشگاه تهران ۱۳۶۵: ۱۷۴-۱۷۸.
- 6- اسماعیلی ماهانی - سعید، زارعین - پروین، اسمی جهرمی - رضا، خاکساری حداد - محمد. بررسی اثر ضد التهابی عصاره هیدروالکی ریشه شیرین بیان بر التهاب حاد ایجاد شده توسط کاراگینان و موش صحرایی نشریه فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران - جلد ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۸۲.
7. Hideo I, Takeo, M, Shojis. Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of tpa induced mouse ear edema, br.j.pharmacol; 96(1989): 204-210.
8. Fujisawa, Sakamoto M, Fujitat. Glycyrrhizin inhibits the lytic pathway of complement, possible mechanism of its anti inflammatory effect on hepatic cell in viral hepatitis, microbial immunol; 41(2000): 799-804.
9. Hirohiko, A, Jinro, K, Yasuo A, Mechanism of anti inflammatory action of glycyrrhizin effect on neutrophil function inducing reactive oxygen species generation, planta med, 57(1991): 119-121.
10. Capasso, F, Mascolo N, Autore G, Duraccio, R. Glycyrrhetic acid, Leukocytes and prostaglandins. J pharm, pharmacol 35, (1983): 332-335.
11. Hisang, C.Y. Lei, IL, Chao, D,C, ho, T, Y, Differential, regulation of activator protein I activity by glycyrrhizin ,life Sci, 22(2002): 1643-1656.
12. Fukai T, Morumo, A, kaitou K, Kanada T, Teradas, Normura T. Anti-helicobacter pylori flavonoids from licorice extract japan 2002, 9, 71(12): 1449-63.
13. Hatano, T, Shintani Y, Aga Y, Shitoe S,

- Tsu, Tsuchiya T. *Yashida T phenolic constituents of licorice structures of glycofenone and glicoisoflavanone and effects of licorice phenolics on meticillin resistant staphylococcus aureus chem pharm bull*, 2000;48(9):1286-92.
- ۱۴- والنت - ژان. گیاه درمانی بیماریها توسط گیاهان (۲): ترجمه احمد امامی - محمدرضا شمس اردکانی - نسیم نکویی نائینی - چاپ اول - انتشارات راه کمال، ۱۳۸۱: ۲۹۵-۲۹۲.
- ۱۵- فلوک - هانس. کلیات گیاهان دارویی - ترجمه دکتر صابری ودکتر صداقت - انتشارات نوربهران - چاپ چهارم - ۱۳۷۱: ۸۴.
- ۱۶- جانزاده - علی. اعجاز گلها و گیاهان دارویی - چاپ اول - انتشارات ایده - ۱۳۷۷: ۲۱۵-۲۱۸.
17. Rees WD, Rhodes J, Wright GE, Stamford LF, Bennett A. *Effect of deglycrrhizinated licorice on gastric mucosal damage by aspirin*. Scand Ygastroentr 1979;14:(5)-607.
18. Schulz V. Hansel R, Tyler V.E. Rational phytotherapy; A physicia, *guide to herbal medicine*, 3th ed. Berlin,germany:springer-verlag;1998: 185.
- ۱۹- هاریسون. بیماری های عفونی هاریسون (باکتریال) ترجمه دکتر حافظی اردکانی - دکتر مشعل مشروطه - ویرایش دکتر مسعود مجلسی - چاپ پانزدهم - انتشارات گلبن - ۱۳۸۰ - ص ۳۶۴-۳۷۵.
- ۲۰- جاوتز - م. میکروبی شناسی پزشکی جاوتز (۱) ترجمه رحیم زاده - چاپ اول - انتشارات سماط - ۱۳۷۸: ۳۶۵-۳۷۸.
21. Okada K, Tamura Y, Yamamoto M, Inoue Y, Takagati R, Takahashik, Denizs. *I dentification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of russian and Xinjiang origin*.chem pharm Bull (Tokyo) 1989: 37(9); 2528-30.
22. Forbes Ba, Sahn DF,W As, Bailey and Sco H,S, *Diagnostic microbiolog*, 11<sup>th</sup> ed. Mosby (2002 ): 480-481.
23. Katzung, BG. *Basic and clinical pharmacology*, 16<sup>th</sup> ed. Lange medical book (2000): 301-325.
24. Krausse R, Bielnberg Y, Blasch W. *Ullman U In vitro anti-Helicobacter pylori of Extractum liguiritae , glycyrrhizin and its metabolits*, Y Antimicrob Chemother. 2004 Jul; 54(1): 243-6.
- ۲۵- پاشازاده - ح. داروهای ژنریک ایران - چاپ پنجم - انتشارات پاشا ۱۳۷۹: ۱۵۳-۵۹.
- ۲۶- زرگری - علی. گیاهان دارویی (۱) انتشارات دانشگاه تهران - چاپ هفتم - ۱۳۷۶: ۶۴۷-۶۵۵.
27. Tanaka Y, Kikuzaki H, Fukukuda S, Nakatani N, *antibacterial compounds of licorice upper airway respiratory tract phathogensnutr Sci vitaminol* 2001;47(3):270-300.