



## Evaluation of Lethal Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Glycyrrhiza glabra* on the *Eimeria tenella* Oocysts *In Vitro*

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Rajaei N.<sup>1</sup> MSc,  
Habibian Dehkordi S.\*<sup>1</sup> PhD,  
Rahimi Junqani R.<sup>1</sup> DVM,  
Alijani M.R.<sup>1</sup> DVM,  
Sasannejad N.<sup>2</sup> DVM

#### How to cite this article

Rajaei N, Habibian Dehkordi S, Rahimi Junqani R, Alijani M.R, Sasannejad N. Evaluation of Lethal Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Glycyrrhiza glabra* on the *Eimeria tenella* Oocysts *In Vitro*. Pathobiology Research. 2020;23(1):11-17.

<sup>1</sup>Basic Sciences Department, School of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup>Basic Sciences Department, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

#### \*Correspondence

Address: Shahrekord University, Rahbar Boulevard, Shahrekord, Iran.  
Postal Code: 8818634141  
Phone: +98 (38) 32324427  
Fax: +98 (38) 32324427  
habibian\_dehkordi@yahoo.com

#### Article History

Received: February 19, 2019  
Accepted: May 22, 2020  
ePublished: June 22, 2020

### ABSTRACT

**Aims** Coccidiosis is one of the most common infectious diseases in poultry that causes huge economic losses. *Glycyrrhiza glabra* is a medicinal plant that used traditionally. The aim of the present study was to evaluate the effect of aqueous and alcoholic extracts of this plant on the *Eimeria tenella* oocysts *in vitro*.

**Materials & Methods** The unsporulated oocysts were obtained by inoculation of 14th day-old broiler chicks with 75,000 oocysts. To obtain sporulated oocysts, 9g of feces samples was soaked in 2% potassium bichromate and incubated at 27°C for 72h. Aqueous and alcoholic extracts of *Glycyrrhiza glabra* in concentrations of 1, 2, and 5% were prepared and oocysts were exposed to these extracts for 48 hours. Thereafter, the number of sporulated and unsporulated oocysts were counted at 1, 12, 24, and 48 hours. In order to prevent any error, the experiments were repeated three times.

**Findings** Both extracts of *Glycyrrhiza glabra* in all tested concentrations cause a significant reduction in the number of sporulated and unsporulated *Eimeria tenella* oocysts compared with control ( $p < 0.05$ ). The rate of inhibitory effect of extracts had a direct relationship with exposure time, and inhibition was continuously increased over time.

**Conclusion** Alcoholic extracts of *Glycyrrhiza glabra* had a better effect than aqueous extracts. 5% alcoholic extract had the best effect. However, further studies are needed to find the best dose for the most anticoccidial effects and also to show its effects on other species of *Eimeria* and in animal models.

**Keywords** *Glycyrrhiza glabra*; Sporulated and Unsporulated Oocysts; *Eimeria tenella*; *In Vitro*

### CITATION LINKS

[1] Poultry coccidiosis: Recent ... [2] Anticoccidial drug resistance in ... [3] Coccidiostat residues in poultry ... [4] Phytochemicals as new class of feed ... [5] Anticoccidial activity of Curcuma ... [6] Efficacy of a herbal complex against caecal coccidiosis ... [7] Comparative efficacy of herbal and allopathy drugs ... [8] Effect of dietary Curcuma, Capsicum, and Lentinus ... [9] Screening of the anticoccidial effects of herb extracts ... [10] Medicinal plants in the prevention and treatment of ... [11] Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root ... [12] Effects of glycyrrhizin (SNMC: Stronger Neo-Minophagen C®) in ... [13] Glycyrrhizin attenuates ... [14] Effect of quercetin on colon contractility and ... [15] Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig ... [16] Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant ... [17] Fermented wheat germ extract induced cell ... [18] Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza* ... [19] *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Extractum ... [20] *Glycyrrhiza glabra*: Medicine over the ... [21] *In vitro* antiviral activity of indigenous glycyrrhizin, licorice and glycyrrhizic acid ... [22] Antiviral Activity of glycyrrhizic acid derivatives against ... [23] Glycyrrhizin alleviates experimental allergic asthma in ... [24] Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice ... [25] The extraction of natural products using ultrasound or ... [26] Anticoccidial activity of herbal complex in broiler ... [27] Laboratory medicine: avian and exotic ... [28] Principles of laboratory animal ... [29] *In vitro* and *in vivo* assessment of plant essence ... [30] Poultry coccidiosis: Diagnostic and ... [31] Molluscicidal activity of *Ferula asafoetida*, *Syzygium* ... [32] Evaluation of lethal effect of aqueous and hydroalcoholic extracts ... [33] Effect of essential oils from some medicinal plants ... [34] Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against ... [35] Evaluation of anticoccidial and immunomodulatory ... [36] Antimalarial activity of plant ... [37] Antimicrobial mechanism of  $\beta$ -glycyrrhetic acid ... [38] Antiviral effects of *Glycyrrhiza* ... [39] Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from ... [40] Dietary oregano essential oil supplementation on ... [41] Dietary supplementation with Echinacea and development of immunity to challenge infection ... [42] Dietary modulation of avian ...

## ارزیابی اثر کشندگی عصاره‌های الکلی و هیدروالکلی شیرین‌بیان بر روی اووسیت‌های *آیمریا تنلا* در شرایط آزمایشگاهی

نازنین رجائی MSc

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

سعید حبیبیان دهکردی PhD

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

رسول رحیمی جونتانی DVM

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

محمدرضا علیجانی DVM

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

ندا ساسان‌نژاد DVM

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

### چکیده

**اهداف:** کوکسیدیوزیز از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در طیور است که هر ساله خسارت زیادی وارد می‌کند. گیاه شیرین‌بیان در طب سنتی برای موارد متعددی استفاده می‌شود. هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی عصاره‌های آبی و الکلی این گیاه بر اووسیت‌های *آیمریا تنلا* در شرایط آزمایشگاهی بود.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا پس از خوراندن تعداد ۷۵۰۰۰ اووسیت به جوجه‌های ۱۴ روزه اووسیت‌های غیر اسپوروله به دست آمد. برای به‌دست‌آوردن اووسیت اسپوروله مقدار ۹ گرم از مدفوع جوجه‌ها در بی‌کرومات‌پتاسیم ۲٪ خیسانده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷°C انکوبه شد. غلظت‌های ۰٫۱ و ۵٪ عصاره‌های آبی و الکلی شیرین‌بیان تهیه و اووسیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در تماس با این عصاره‌ها قرار گرفتند و تعداد اووسیت‌های اسپوروله و غیر اسپوروله در ساعت‌های ۱، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ شمارش شدند. به‌منظور جلوگیری از هر خطا، آزمایشات سه بار تکرار شدند.

**یافته‌ها:** عصاره‌های شیرین‌بیان در مقایسه با گروه کنترل در همه غلظت‌های مورد استفاده اثر بهتری در کاهش تعداد اووسیت‌های اسپوروله و غیر اسپوروله *آیمریا تنلا* داشتند ( $p < 0.05$ ). این اثر مهارکنندگی با زمان ارتباط مستقیم داشت و به‌طور مداوم با گذشت زمان افزایش می‌یافت.

**نتیجه‌گیری:** عصاره الکلی شیرین‌بیان در مقایسه با عصاره آبی اثر بهتری داشت، به‌طوری که بهترین تاثیر مربوط به عصاره ۵٪ الکلی بود. با این حال شناخت بهترین دوز برای بیشترین اثرات ضدکوکسیدیایی عصاره شیرین‌بیان همچنین اثرات آن بر سایر گونه‌های آیمریا و مدل‌های حیوانی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

**کلیدواژه‌ها:** *Glycyrrhiza glabra*، اووسیت‌های اسپوروله و غیر اسپوروله، *آیمریا تنلا*، شرایط آزمایشگاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۲

نویسنده مسئول: habibian\_dehkordi@yahoo.com

### مقدمه

کوکسیدیوز یک بیماری انگلی شایع در طیور است که توسط تک‌یاخته‌ای از جنس آیمریا (*Eimeria*) ایجاد می‌شود. آلودگی به این انگل از راه بلع اووسیت اسپوروله به وجود می‌آید. این بیماری سالیانه خسارتی بیش از ۳ میلیارد دلار به صنعت طیور در

دنیا وارد می‌کند<sup>[1]</sup>. در مرغداری‌های مدرن و پیشرفته کنترل کوکسیدیوز عمدتاً براساس پیشگیری است که از داروهای کوکسیدیواستات همراه با غذا استفاده می‌شود. با این وجود استفاده بی‌رویه از کوکسیدیواستات‌ها سبب ایجاد مقاومت دارویی در گونه‌های آیمریا می‌شود<sup>[2]</sup>. همچنین شواهد متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد استفاده از کوکسیدیواستات‌ها باعث به‌وجودآمدن باقیمانده دارویی در گوشت طیور می‌شود و سلامت مصرف‌کننده را به خطر می‌اندازد<sup>[3]</sup>. در نتیجه تمایل زیادی به یافتن روش جایگزین برای پیشگیری از کوکسیدیوز وجود دارد. در حال حاضر هیچ جایگزین مناسبی برای کوکسیدیواستات‌ها وجود ندارد و جست‌وجو برای یافتن یک جایگزین طبیعی موضوع بسیاری از تحقیق‌ها است. یک روش انتخابی برای جایگزینی کوکسیدیواستات‌ها، استفاده از گیاهانی است که فعالیت ضدکوکسیدیوزی داشته و محرک سیستم ایمنی باشند<sup>[4]</sup>. به این منظور در مطالعات قبلی فعالیت ضدکوکسیدیوزی تعدادی از گیاهان و محصولات گیاهی آزمایش شده است<sup>[5-9]</sup>. خوشبختانه به‌علت شرایط اقلیمی مناسب، گیاهان متنوع و زیادی در بیشتر مناطق ایران می‌رویند که بیشتر آنها تاثیرات دارویی زیادی را دارند. شیرین‌بیان از گیاهانی است که طی سال‌های متمادی در پزشکی سنتی به‌ویژه در ایران مورد استفاده بوده است.

شیرین‌بیان با اسم علمی *Glycyrrhiza glabra* گیاهی از خانواده Leguminosae است. در گذشته ریشه شیرین‌بیان برای بهبود زخم، تسکین سرفه، کاهش درد و رفع التهاب معده مورد استفاده قرار می‌گرفته است. از مهم‌ترین مواد موجود در این گیاه یک ترکیب گلیکوزیدی به نام گلیسیریزین است که به میزان ۶ تا ۱۲٪ در ریشه گیاه یافت می‌شود. به علاوه حدود ۱ تا ۵٪ ریشه شیرین‌بیان را فلاونوئیدها شامل می‌شوند که این فلاونوئیدها را جفت ایزومرهای شالکونی و فلاوانونی تشکیل می‌دهند<sup>[10]</sup>. ریشه این گیاه علاوه بر ترکیبات فوق حاوی اسید ۲-بتا-گلوکورونوزیل-گلوکورونیک، اسیدگلیسیریتینیک (انوکسولون)، اسیدتانیک، آسپاراژین، رزین‌ها، روغن‌های فرار و همچنین ترکیبات کومارینی مانند هرنبارین و اومبلی‌فرن است<sup>[11, 12]</sup>. شیرین‌بیان از گیاهان سنتی شناخته‌شده ایران است که مطالعات زیادی روی آن انجام شده است و تاکنون اثرات متعددی مثل اثرات ضدالتهابی<sup>[13]</sup>، ضداسپاسمی<sup>[14, 15]</sup> و حفاظت‌کننده از زخم معده<sup>[16]</sup> برای آن گزارش شده است. امروزه خواص درمانی شیرین‌بیان در درمان سرطان‌ها نیز مشخص شده است<sup>[17]</sup>. به علاوه این گیاه دارای فعالیت‌های ضدباکتری در مقابل باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بوده و علیه *هلیکوباکتر پیلوری* در درمان زخم‌های معده موثر است<sup>[16, 18, 19]</sup>. عصاره شیرین‌بیان امروزه در شربت سرفه استفاده می‌شود. همچنین گیاه شیرین‌بیان دارای خواص ضدآلرژی، ضدالتهابی و ضدویروسی است<sup>[20-23]</sup>.

آثار دارویی شیرین‌بیان را به دو دسته ترکیبات موجود در آن شامل فلاونوئیدها که دارای اثر ضداسپاسم هستند و گلیسیریزین که

مدفوع، با استفاده از روش شناورسازی مک‌مستر اندازه‌گیری شد [27]. برای اسپروله کردن اووسیست‌ها، مقدار ۹ گرم نمونه مدفوع در بی‌کرومات‌پتاسیم ۲٪ خیسانده شد. سپس در دمای ۲۷°C و به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد تا اووسیست‌ها اسپروله شدند [28].

**تهیه رقت از عصاره شیرین بیان و مجاور کردن هر رقت با اووسیست غیراسپروله و اسپروله آیمیریا**

برای بررسی اثر گیاه شیرین بیان بر اووسیست‌های آیمیریا تنلا در محیط آزمایشگاهی، از عصاره خشک شده گیاه، رقت‌های ۱، ۲ و ۵٪ تهیه شد. سپس این رقت‌ها به لوله‌های محتوی ۲۵۰۰ عدد اووسیست اسپروله و غیر اسپروله به صورت جداگانه افزوده شدند. اووسیست‌ها به کمک لوپ جمع‌آوری، شمارش و در لوله‌های آزمایش قرار داده شدند. یک لوله کنترل حاوی آب مقطر و انگل که هیچ عصاره‌ای به آن اضافه نشده بود نیز به عنوان گروه شاهد در هر سری آزمایش در نظر گرفته شد. تمامی لوله‌ها در انکوباتور ۲۸-۲۵°C به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند [29]. برای جلوگیری از بروز خطا در نتایج، آزمایش سه بار تکرار شد. برای بررسی نحوه اثر عصاره شیرین بیان بر اووسیست‌های غیر اسپروله و اسپروله آیمیریا، لوله‌های آزمایش در زمان‌های ۱، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شدند و اووسیست‌های اسپروله و غیر اسپروله مورد شمارش قرار گرفتند [29].

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها**

داده‌های آزمایش جمع‌آوری و با استفاده از نرم‌افزار اکسل ویرایش شدند. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SigmaPlot 12.3 استفاده شد و داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس سه طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح  $p < 0.05$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته‌ها**

در مطالعه حاضر تاثیر سه فاکتور نوع عصاره شیرین بیان (آبی یا الکلی)، غلظت عصاره (۱، ۲ و ۵٪) و مدت زمان مواجهه با عصاره (۱، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بر روی تعداد اووسیست‌های اسپروله و غیر اسپروله آیمیریا تنلا بررسی و نتایج حاصل در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

خواص ضدالتهاپی نشان می‌دهد، نسبت می‌دهند [24]. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر کشندگی عصاره‌های الکلی و هیدروالکلی شیرین بیان روی اووسیست‌های آیمیریا تنلا در شرایط آزمایشگاهی است.

**مواد و روش‌ها**

**جمع‌آوری گیاه و انجام عصاره‌گیری**

ابتدا ریشه گیاه شیرین بیان از کوه‌های اطراف شهرکرد جمع‌آوری و بعد از انتقال به هرباریوم دانشگاه و تایید تشخیص توسط متخصص گیاه‌شناس، دور از نور و حرارت مستقیم آفتاب خشک و خرد شد. ترکیبات موجود در ریشه گیاه شیرین بیان از طریق حلال (متانول ۸۰٪ و آب) به نسبت وزنی- حجمی ۱:۱۰ (۱۰۰ گرم پودر ریشه شیرین بیان در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر حلال) استخراج شدند. به این صورت که به مدت ۱۵ دقیقه درون مایکروفر خانگی (۲۰۰ وات) قرار داده شدند و پس از سرد شدن بالن، عصاره حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. به منظور خروج حلال، دستگاه دوار تبخیر در خلأ با دمای ۴۰ و ۵۶°C مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ها با دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک و تا زمان استفاده، در فریزر ۲۰°C نگهداری شدند [25].

**تهیه اووسیست آیمیریا تنلا و اسپروله کردن**

تعداد ۱۰ قطعه جوجه گوستی دوازده روزه از نژاد راس ۳۰۸ با میانگین وزنی  $320 \pm 3/60$  گرم خریداری و به محل نگهداری واقع در کلینیک دامپزشکی متعلق به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل شدند. شرایط پرورشی جوجه‌ها تحت شرایط استاندارد روی بستر بود. در کل دوره پرورش آب و دان به طور آزاد در اختیار آنها قرار گرفت. جیره پایه براساس ذرت- سویا فرموله شد که در مورد همه گروه‌ها یکسان بود. شرایط پرورش از قبیل درجه حرارت، رطوبت، تهویه و برنامه نوری برای همه گروه‌ها یکسان در نظر گرفته شد. پس از ارزیابی بالینی و اطمینان از سلامتی جوجه‌ها، در روز چهاردهم به همه آنها تعداد ۷۵۰۰۰ اووسیست آیمیریا تنلا خورانده شد [26]. سپس برای تعیین میزان اووسیست دفع شده، در روز دوازدهم پس از تلقیح تمام مدفوع روزانه جمع‌آوری و پس از توزین، برای شمارش اووسیست‌ها به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل شد. تعداد اووسیست‌ها در یک گرم

جدول ۱) نتایج مطالعه اثر رقت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی شیرین بیان بر اووسیست‌های اسپروله آیمیریا تنلا

غلظت	زمان (ساعت)			
	۴۸	۲۴	۱۲	۱
کنترل	۲۲۵۸±۱۲۳/۶۶ <sup>Aa</sup>	۲۳۴۷±۱۵۴/۵۲ <sup>Aa</sup>	۲۴۵۴±۵۶/۱۰۷ <sup>Aa</sup>	۲۴۷۲±۶۲/۸ <sup>Aa</sup>
عصاره آبی ۱٪	۹۳۳/۳±۱۱۵/۴۷ <sup>Db</sup>	۱۵۳۳/۳±۵۷/۷۳ <sup>Cb</sup>	۱۷۵۰±۱۳۲/۲۸ <sup>Bb</sup>	۱۸۶۶/۶±۱۱۵/۴۷ <sup>Ab</sup>
عصاره الکلی ۱٪	۱۴۶۶/۶±۵۷/۷۳ <sup>Cc</sup>	۱۴۶۶/۶±۱۱۵/۴۷ <sup>Cbc</sup>	۱۶۶۶/۶±۱۱۵/۴۷ <sup>Bb</sup>	۱۸۳۳/۳±۵۷/۷۳ <sup>Abc</sup>
عصاره آبی ۲٪	۹۶۶/۶۷±۵۷/۷۳ <sup>Dbd</sup>	۱۴۳۳/۳±۱۱۵/۴۷ <sup>Cc</sup>	۱۶۳۳/۴±۵۷/۷۳ <sup>Bb</sup>	۱۷۳۳±۱۱۵/۴۷ <sup>Ab</sup>
عصاره الکلی ۲٪	۱۰۰۰/۰±۱۰۰/۰ <sup>DD</sup>	۹۶۶/۶۷±۲۰۸/۱۶۷ <sup>Cd</sup>	۱۲۶۶/۶۷±۱۱۵/۴۷ <sup>Bb</sup>	۱۳۰۰/۰±۱۰۰/۰ <sup>Ad</sup>
عصاره آبی ۵٪	۸۵۰/۰±۱۰۵/۰ <sup>De</sup>	۱۲۶۶/۶۷±۱۵۲/۷۵ <sup>Ce</sup>	۱۳۳۳/۳±۵۷/۷۳ <sup>Bb</sup>	۱۴۶۶/۶۷±۱۵۲/۷۵ <sup>Ae</sup>
عصاره الکلی ۵٪	۶۶۶/۶±۱۱۵/۴۷ <sup>Df</sup>	۷۳۳/۳±۵۷/۷۳ <sup>Cf</sup>	۸۶۶/۶۷±۱۵۲/۷۵ <sup>Bd</sup>	۱۲۶۶/۶۷±۲۳۰/۹۴ <sup>Af</sup>

حروف غیرمشابه انگلیسی بزرگ در هر ردیف و حروف غیرمشابه انگلیسی کوچک در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).

جدول ۲) نتایج مطالعه اثر رقت‌های مختلف عصاره آبی و الکی شیرین‌بیان بر اووسیت‌های غیر اسپروله آیمیریا تنلا

غلظت	زمان (ساعت)			
	۴۸	۲۴	۱۲	۱
کنترل	۲۲۵۸±۱۲۳/۶۶Aa	۲۳۴۷±۱۵۴/۵۲Aa	۲۴۵۴±۵۶/۱۰۷Aa	۲۴۷۲±۶۲/۸۶Aa
عصاره آبی ۱%	۱۴۶۵±۱۱۶/۹۴Bb	۱۲۵۴±۵۰/۴۷Bbc	۲۰۳۲±۵۸/۹۲Ab	۲۱۵۶±۵۱/۰۶Ab
عصاره الکی ۱%	۱۳۴۶±۵۰/۴۷Cb	۱۴۸۹/۶۷±۸۴/۹۳Cb	۱۴۷۷±۶۸/۴۶Bc	۱۸۱۳±۸۱/۲۸Ac
عصاره آبی ۲%	۱۲۶۹±۵۹/۸۵Cb	۱۳۸۹±۳۴/۸۲Cb	۱۴۰۰±۱۰۰/Bcd	۲۰۹۷±۱۰۰/۱۳Ab
عصاره الکی ۲%	۱۲۷۸±۳۸/۱Bb	۱۲۳۳/۳±۵۷/۷۳Bbc	۱۲۳۸±۵۴/۱۴Bd	۱۷۴۵±۱۲۶/۷۸Ac
عصاره آبی ۵%	۱۰۱۲±۱۰۲/۱۳Cc	۱۴۱۴±۷۲/۰۲Bb	۱۵۲۳±۶۸/۴۶Bc	۱۶۱۰±۱۷/۳۲Ac
عصاره الکی ۵%	۹۷۲±۴۸/۴۹Cc	۱۱۹۲±۱۰۰/۹۵Bc	۱۲۸۸±۲۰/۷۸Bd	۱۴۶۶/۶±۵۷/۷۳Ad

حروف غیرمشابه انگلیسی بزرگ در هر ردیف و حروف غیرمشابه انگلیسی کوچک در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).

نتایج اثر رقت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکی شیرین‌بیان بر اووسیت‌های غیر اسپروله آیمیریا در جدول ۲ نشان داده شده است. در گروه کنترل هیچ تفاوت معنی‌داری در تعداد اووسیت‌های غیر اسپروله آیمیریا تنلا در بین هیچ یک از زمان‌های مورد آزمایش مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). این در حالی بود که در زمان‌های مختلف، در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده عصاره‌های آبی و الکی شیرین‌بیان با درصد‌های مختلف، تعداد اووسیت‌های غیر اسپروله کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ( $p < 0.05$ ). همچنین با افزایش زمان، تعداد اووسیت‌های غیر اسپروله در هر یک از گروه‌های دریافت‌کننده عصاره‌های آبی و الکی شیرین‌بیان کاهش یافت که این کاهش در مورد عصاره آبی ۱% در ساعت‌های ۱ و ۱۲ با ساعت‌های ۲۴ و ۴۸، در مورد عصاره‌های ۱% الکی و ۲% آبی در ساعت ۱ با سایر زمان‌ها و در ساعت ۱۲ با ساعت‌های ۲۴ و ۴۸، در مورد عصاره الکی ۲% در ساعت اول با سایر زمان‌های مورد آزمایش و در مورد عصاره‌های ۵% آبی و الکی در ساعت اول با سایر زمان‌ها و بین ساعات ۱۲ و ۲۴ با ساعت ۴۸ معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

طبق جدول ۲، در ساعت اول آزمایش اختلاف معنی‌داری در تعداد اووسیت‌های غیر اسپروله بین غلظت‌های ۱ و ۲% آبی با سایر عصاره‌ها و بین عصاره‌های الکی با غلظت ۱ و ۲% و عصاره آبی ۵% با عصاره ۵% الکی وجود داشت ( $p < 0.05$ ). در ساعت ۱۲ نیز تفاوت بین عصاره ۱% آبی با سایر عصاره‌ها و نیز بین عصاره‌های ۲ و ۵% آبی و ۱% الکی با عصاره‌های ۲ و ۵% الکی معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). تنها تفاوت معنی‌دار مشاهده شده در تعداد اووسیت‌های غیر اسپروله در ساعت ۲۴ فقط بین عصاره‌های ۱% الکی و ۲ و ۵% آبی با عصاره ۵% الکی بود ( $p < 0.05$ ). در ساعت ۴۸ پس از شروع آزمایش نیز تنها اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌های ۱ و ۲% آبی و الکی با غلظت‌های ۵% آنها بود ( $p < 0.05$ ).

#### بحث

با وجود اجرای برنامه‌های تغذیه‌ای، شیمی‌درمانی، مدیریتی و ژنتیکی بیماری کوکسیدیوز هنوز هم یکی از پرهزینه‌ترین و

طبق جدول ۱، در گروه کنترل هیچ تفاوت معنی‌داری در تعداد اووسیت‌های اسپروله آیمیریا تنلا در بین هیچ یک از زمان‌های مورد آزمایش مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). این در حالی بود که در زمان‌های مختلف بررسی‌شده، در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده عصاره‌های آبی و الکی شیرین‌بیان با درصد‌های مختلف، تعداد اووسیت‌های اسپروله کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ( $p < 0.05$ ). همچنین با افزایش زمان اختلاف معنی‌داری در تعداد اووسیت‌ها، در هر یک از گروه‌های دریافت‌کننده عصاره‌های آبی و الکی شیرین‌بیان مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

جدول ۱ نشان می‌دهد که در ساعت اول پس از اضافه‌کردن عصاره‌های شیرین‌بیان تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۱% عصاره آبی با غلظت‌های ۲ و ۵% عصاره‌های آبی و الکی وجود داشت ( $p < 0.05$ ). در این ساعت اختلاف مشاهده شده بین غلظت ۱% عصاره الکی و ۲% عصاره آبی با عصاره‌های ۲ و ۵% الکی و ۵% آبی معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). تفاوت مشاهده شده در ساعت اول آزمایش بین عصاره‌های الکی با غلظت ۲ و ۵% و عصاره آبی ۵% نیز معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در ساعت دوازدهم، تفاوت مشاهده شده بین عصاره‌های ۱ و ۲% آبی و ۱% الکی با سایر عصاره‌ها معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در این زمان تفاوت بین عصاره‌های ۲% الکی و ۵% آبی با عصاره ۵% الکی معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در ساعت ۲۴ پس از شروع آزمایش نیز تفاوت در تعداد اووسیت‌های اسپروله بین عصاره ۱% آبی شیرین‌بیان با سایر عصاره‌ها به جز عصاره الکی با غلظت ۱% معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در این زمان اختلاف بین عصاره‌های ۱% الکی و ۲% آبی با عصاره‌های الکی با غلظت ۲ و ۵% و عصاره آبی ۵% معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). همچنین در این زمان تفاوت بین عصاره‌های ۲ و ۵% الکی و ۵% آبی با همدیگر نیز معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). نتایج مشاهده شده در ساعت ۴۸ آزمایش به این صورت بود که تفاوت در تعداد اووسیت‌های اسپروله بین عصاره‌های ۱ و ۲% آبی شیرین‌بیان و نیز بین عصاره‌های ۲% آبی و الکی این گیاه معنی‌دار نبود، در سایر موارد اختلاف دیده شده معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).



کاهش مرگ‌ومیر و بهبود ضریب تبدیل غذایی در جوجه‌های مبتلا به کوکسیدیوز می‌شود. همچنین فعالیت ضدکوکسیدیوزی شیرین بیان که قابل مقایسه با داروی بایوکوکس است ممکن است مربوط به مقدار زیاد مواد آنتی‌اکسیدان در این گیاه باشد که باعث کاهش استرس اکسیداتیو ایجاد شده هنگام کوکسیدیوز در پرنده می‌شود. همچنین بیان کردند که دیگر ترکیبات مانند فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی گیاه شیرین بیان ممکن است به میکروفلور دستگاه گوارش پرنده کمک کنند و باعث بهبود جذب مواد مغذی و سیستم ایمنی شوند [35].

از ترکیبات مهم در گیاه شیرین بیان با اثرات ضدانگلی، لیکوکالکون آ است این ماده ۱ تا ۱/۵٪ ریشه شیرین بیان را تشکیل می‌دهد و در مطالعات مختلفی نقش ضدانگلی آن به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که این ماده دارای فعالیت ضدانگلی علیه پلاسمودیوم است و استفاده از این ماده با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم علیه انگل *P. yoelii* در موش باعث از بین رفتن کامل بیماری می‌شود [36].

چن و همکاران نشان دادند که استفاده از لیکوکالکون آ، سرعت آلوده شدن ماکروفاژهای مشتق از انسان به انگل *لشمانیا ماژور* را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد و دارای اثرات از بین بردگی روی انگل است. آنها این فرضیه را مطرح کردند که لیکوکالکون آ با مهار میتوکندری و ایجاد تغییر در عملکرد و ساختار آن باعث اعمال اثرات مهاری می‌شود. این اثرات مهاری در میتوکندری در دوزی که روی سلول‌های میزبان توکسیک نیست صورت می‌گیرد [34].

از دیگر ترکیبات گیاه شیرین بیان با خواص میکروبی بتاگلیسریتینک اسید است. در پژوهش‌های پیشین دیده شده است که بتاگلیسریتینک اسید از طریق مهار سنتز DNA، RNA و پروتئین موجب بروز اثرات ضدباکتریایی می‌شود [37]. همچنین شیرین بیان از طریق القای اینترفرون گاما در سلول‌های T و مهار فیوز شدن ویروس با غشای سلولی موجب اثرات ضدویروسی بر علیه HIV می‌شود [38].

بسیاری از ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان مانند ترپن‌ها، فلاونوئیدها، زانتون‌ها و آنتراکوئینون‌ها و غیره دارای خاصیت ضد میکروبی هستند [36]. فوکای و همکاران نشان دادند که گلیسرینیک اسید به‌عنوان یکی از فلاونوئیدهای مشتق شده از شیرین بیان دارای اثرات ضدهیلکوباکتر پیلوری در معده است [39]. گوپتا و همکاران نیز در تحقیقات خود نشان دادند که فلاونوئیدهای موجود در ریشه شیرین بیان دارای فعالیت ضدباکتریایی وسیعی هستند [18]. به نظر می‌رسد اثرات ضدانگلی شیرین بیان در مطالعه حاضر مربوط به ترکیبات فلاونوئید موجود در آن باشد.

در زمینه تاثیر سایر گیاهان دارویی روی انگل آیمیریا نیز تحقیقات زیادی انجام شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که استفاده از عصاره پونه کوهی در جیره طیور گوشتی مبتلا به *آیمیریا تنلا* باعث

متداول‌ترین بیماری‌ها در صنعت طیور است. تخمین زده شده است که سالانه ۳۰۰ میلیون دلار در جهان برای پیشگیری دارویی این بیماری هزینه می‌شود. از طرفی مقاومت دارویی انگل علیه داروهای جدید نیز رو به افزایش و نیاز به عرضه داروهای جدیدتر را ضروری کرده است [30]. از مواردی که در سال‌های اخیر به آن توجه ویژه‌ای شده است استفاده از گیاهان به‌منظور پیشگیری و درمان این بیماری بوده است. شیرین بیان از گیاهان پرکاربرد در طب سنتی و خواص متعددی از آن به اثبات رسیده است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات ضدکوکسیدیوزی این گیاه انجام نشده است.

نتایج مطالعه حاضر بیانگر این نکته بود که در شرایط آزمایشگاهی هر چه غلظت عصاره‌های آبی و الکلی شیرین بیان افزایش یابد در یک زمان معین میانگین درصد کشندگی عصاره نیز بر روی اووسیست‌های *آیمیریا تنلا* افزایش می‌یابد. همچنین در این مطالعه با افزایش زمان تماس عصاره‌های آبی و الکلی با اووسیست‌ها، میزان اثر کشندگی عصاره‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. یعنی به عبارتی اثر کشندگی عصاره شیرین بیان با غلظت و گذشت زمان رابطه مستقیمی دارد و هر چه زمان تماس انگل با عصاره بیشتر باشد ترکیبات فعال گیاه فرصت بیشتری برای نفوذ به درون انگل دارند [31]. این نتایج، همسو با مطالعه رجایی و همکاران است که نشان دادند عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گل برنجاسف باعث کاهش تعداد اووسیست‌های اسپوروله و غیر اسپوروله *آیمیریا ماکزیمیا* به‌صورت وابسته به دوز و زمان می‌شوند [32]. به علاوه در مطالعه حاضر مشاهده شد که با افزایش زمان مجاورت انگل با عصاره، غلظت‌های کمتر عصاره نیز باعث کاهش قابل توجه تعداد اووسیست‌ها می‌شوند که این یافته همسو با برخی پژوهش‌های پیشین است [33].

در این مطالعه، بیشترین تاثیر مربوط به عصاره ۵٪ الکلی بوده است. موثرترین عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی احتمالاً مربوط به حلالیت بیشتر ترکیبات ضدانگلی گیاه شیرین بیان در اتانول است. این نتایج نیز همسو با نتایج رجایی و همکاران است که بیان کردند عصاره الکلی گیاه برنجاسف اثر بهتری از عصاره آبی آن دارد [32].

در مورد اثرات ضدانگلی گیاه شیرین بیان مطالعات مختلفی انجام شده است. چن و همکاران به بررسی اثرات ضدلشمانیوزی ریشه شیرین بیان پرداختند و مشاهده کردند که پروماستیگوت‌های *لشمانیا ماژور* پس از ۲۴ ساعت در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان به‌طور کامل مهار می‌شوند [34].

در مطالعه‌ای به بررسی و مقایسه اثرات ضدکوکسیدیوزی و تنظیم‌کنندگی ایمنی سه گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، درمنه سیبری (*Artemisia sieberi*) و گل ابری (*Ageratum houstonianum*) در جوجه‌های گوشتی مبتلا به کوکسیدیوز پرداخته شد. نتایج نشان داد که عصاره شیرین بیان در مقایسه با دو گیاه دیگر در دوزهای بالا باعث اثرات بهتری در

**تأییدیه اخلاقی:** این مطالعه توسط کمیته اخلاق حیوان دانشگاه شهرکرد (شماره ردیف: ۱۳۹۴/۹۳۰) تصویب شد.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** نازنین رجائی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۰٪)؛ سعید حبیبیان دهکردی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ رسول رحیمی جونقانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ محمدرضا علیجانی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ ندا ساسان‌نژاد (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)

**منابع مالی:** هزینه‌های مربوط به مطالعه حاضر توسط دانشگاه شهرکرد تأمین شده است.

### منابع

- 1- Dalloul RA, Lillehoj HS. Poultry coccidiosis: Recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2006;5(1):143-63.
- 2- Abbas RZ, Iqbal Z, Blake D, Khan MN, Saleemi MK. Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: The state of play revisited. *World's Poult Sci J*. 2011;67(2):337-50.
- 3- Olejnik M, Szprengier-Juskiewicz T. Coccidiostat residues in poultry tissues and eggs. *Medycyna Weterynaryjna*. 2007;63(12):1539-45. [Polish]
- 4- Hashemi SR, Davoodi H. Phytochemicals as new class of feed additive in poultry industry. *J Anim Vet Adv*. 2010;9(17):2295-304.
- 5- Abbas RZ, Iqbal Z, Khan MN, Zafar MA, Zia MA. Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broilers. *Braz Arch Biol Technol*. 2010;53(1):63-7.
- 6- Chandrakesan P, Muralidharan K, Dinesh Kumar V, Ponnudurai G, Jeyagopal Harikrishnan T, Senthil Veland Natarajan Rani K. Efficacy of a herbal complex against caecal coccidiosis in broiler chickens. *Veterinarski Arhiv*. 2009;79(2):199-203.
- 7- Haq IU, Pasha TN, Khalique A. Comparative efficacy of herbal and allopathy drugs against coccidiosis in poultry. *Ital J Anim Sci*. 2011;10(1):e3.
- 8- Lee SH, Jang SI, Kim DK, Ionescu C, Bravo D, Lillehoj HS. Effect of dietary *Curcuma*, *Capsicum*, and *Lentinus* on enhancing local immunity against *Eimeria acervulina* infection. *J Poult Sci*. 2010;47(1):009025.
- 9- Youn HJ, Noh JW. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol*. 2001;96(4):257-63.
- 10- Eddouks M, Chattopadhyay D, De Feo V, Cho WC. Medicinal plants in the prevention and treatment of chronic diseases. *Evid Based Complement Altern Med*. 2012;2012:458274.
- 11- Li W, Asada Y, Yoshikawa T. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry*. 2000;55(5):447-56.
- 12- Mori K, Sakai H, Suzuki S, Akutsu Y, Ishikawa M, Imaizumi M, et al. Effects of glycyrrhizin (SNMC: Stronger Neo-Minophagen C®) in hemophilia patients with HIV-1 infection. *Tohoku J Exp Med*. 1990;162(2):183-93.
- 13- Chang CZ, Wu SC, Kwan AL. Glycyrrhizin attenuates proinflammatory cytokines through a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -dependent mechanism and experimental vasospasm in a rat model. *J Vasc Res*. 2015;52(1):12-21.

بهبود زخم‌های روده‌ای، بهبود عملکرد و کاهش تعداد اوسیت دفعی می‌شود، اما این بهبود در مقایسه با داروی کوکسیدیواستات‌لازالوسید کمتر است [40]. تحقیقات نشان داده است که مکمل‌های غذایی حاوی ۱/۵ تا ۵/۵٪ گیاه سرخارگل در طول دو هفته اول زندگی طیور باعث بهبود قابل توجه در میزان ضریب تبدیل غذایی و کاهش زخم‌های روده‌ای حاصل از واکسیناسیون آیمیریا در طیور می‌شوند. همچنین گیاه سرخارگل باعث بهبود وضعیت ایمنی طیور در جوجه‌های گوشتی مبتلا به کوکسیدوز می‌شود [41]. آلن و همکاران یک بررسی در خصوص اثرات ضدکوکسیدیوزی اندام‌های مختلف گیاه درمنه در جوجه مرغ انجام و اثرات ضدکوکسیدیایی برگ و اجزای شیمیایی گیاه را از نظر ایجاد پروفیلاکسی تغذیه‌ای مورد آزمایش قرار دادند. نتایج این تجربیات نشان داد که برگ خشک گیاه (۵٪) در طول سه هفته به‌طور معنی‌داری مانع از بروز جراحات آیمیریا تنلا در جوجه‌ها می‌شود، ولی اثر ممانعتی در برابر گونه‌های آیمیریا ماکزیمیا و آیمیریا آسرولینا ندارد. آنها همچنین نشان دادند که استفاده از زردچوبه به میزان ۱٪ باعث کاهش دفع اوسیت می‌شود و در درمان و بهبود زخم‌های روده‌ای حاصل از آیمیریا ماکزیمیا موثر است ولی در مورد گونه‌های آیمیریا تنلا اثر چندانی ندارد [42].

رجایی و همکاران به بررسی اثر کشندگی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه برنجاسف بر روی اوسیت‌های آیمیریا ماکزیمیا در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. آنها نتیجه‌گیری کردند که عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گل برنجاسف در همه غلظت‌های مورد استفاده در مقایسه با کنترل قادر به کاهش تعداد اوسیت‌های اسپوروله و غیر اسپوروله آیمیریا ماکزیمیا است که این میزان کاهش ارتباط مستقیم با زمان دارد و به‌طور مداوم پس از ساعات ۱۲، ۲۴ و ۴۸ افزایش می‌یابد [32].

نتایج مطالعه حاضر بیانگر این نکته بود که عصاره‌های آبی و الکلی گیاه شیرین‌بیان در مقایسه با گروه کنترل در همه غلظت‌های مورد استفاده از اثر بهتری در کاهش تعداد اوسیت‌های اسپوروله و غیر اسپوروله آیمیریا تنلا برخوردار هستند ( $p < 0.05$ ) که این اثر کشندگی با زمان ارتباط مستقیم دارد و به‌طور مداوم با گذشت زمان افزایش می‌یابد.

### نتیجه‌گیری

عصاره الکلی شیرین‌بیان در مقایسه با عصاره آبی اثر بهتری داشت، به‌طوری که بهترین تأثیر در بین گروه‌های مختلف مربوط به عصاره ۵٪ الکلی بود. با این حال شناخت بهترین دوز برای بیشترین اثرات ضدکوکسیدیایی عصاره شیرین‌بیان همچنان اثرات آن بر سایر گونه‌های آیمیریا و مدل‌های حیوانی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

**تشکر و قدردانی:** مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

- 29- Yakhchali M, Khosravi AR. In vitro and in vivo assessment of plant essence (Artemisia Sieberl) coccidiocidal effect on rabbit coccidiosis. PAJOUHESH & SAZANDEGI. 2004;17(3):48-51. [Persian]
- 30- Conway DP, McKenzie ME. Poultry coccidiosis: Diagnostic and testing procedures. 3<sup>rd</sup> Edition. Hoboken: John Wiley & Sons; 2007.
- 31- Kumar P, Singh DK. Molluscicidal activity of *Ferula asafoetida*, *Syzygium aromaticum* and *Carum carvi* and their active components against the snail *Lymnaea acuminata*. Chemosphere. 2006;63(9):1568-74.
- 32- Rajaei N, Piralı K, Habibian S, Azizi H. Evaluation of lethal effect of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Achillea talagonica* on the *Eimeria maxima* oocysts in vitro. Iran J Vet Clin Sci. 2017;11(1):15-26. [Persian]
- 33- Bahri Najafi R, Motazedian M, Azadbakht M, Sodagar R. Effect of essential oils from some medicinal plants on giardia lambelia cyst in comparison with metronidazol. Esfahan Univ Res J. 2003;17(2):199-206.
- 34- Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(12):2550-6.
- 35- Hussain K. Evaluation of anticoccidial and immunomodulatory effects of crude herbal extracts in chicken [Dissertation]. Faisalabad: University of Agriculture; 2016.
- 36- Schwikkard S, Van Heerden FR. Antimalarial activity of plant metabolites. Nat Product Rep. 2002;19(6):675-92.
- 37- Kim HK, Park Y, Kim HN, Choi BH, Jeong HG, Lee DG, et al. Antimicrobial mechanism of  $\beta$ -glycyrrhetic acid isolated from licorice, *Glycyrrhiza glabra*. Biotechnol Lett. 2002;24(22):1899-902.
- 38- Fiore C, Eisenhut M, Krausse R, Ragazzi E, Pellati D, Armanini D, et al. Antiviral effects of *Glycyrrhiza* species. Phytother Res. 2008;22(2):141-8.
- 39- Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. Life Sci. 2002;71(12):1449-63.
- 40- Giannenas I, Florou-Paneri PC, Papazahariadou M, Christaki E. Dietary oregano essential oil supplementation on performance of broilers challenged with *Eimeria tenella*. Arch Anim Nutr. 2003;57(2):99-106.
- 41- Allen PC. Dietary supplementation with Echinacea and development of immunity to challenge infection with coccidia. Parasitol Res. 2003;91(1):74-8.
- 42- Allen PC, Danforth HD, Augustine PC. Dietary modulation of avian coccidiosis. Int J Parasitol. 1998;28(7):1131-40.
- 14- Huang WF, Ouyang S, Li SY, Lin YF, Ouyang H, Zhang H, et al. Effect of quercetin on colon contractility and L-type  $Ca^{2+}$  channels in colon smooth muscle of guinea-pig. Acta Physiol Sin. 2009;61(6):567-76.
- 15- Liu B, Yang J, Wen Q, Li Y. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro and in vivo: role of cGMP/PKG pathway. Eur J Pharmacol. 2008;587(1-3):257-66.
- 16- Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Kenawy SA, Seif-El-Nasr M, Mahran LG, Kafafi YA, et al. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. Drug Res. 2001;51(7):545-53.
- 17- Tai CJ, Wang WC, Wang CK, Wu CH, Yang MD, Chang YJ, et al. Fermented wheat germ extract induced cell death and enhanced cytotoxicity of cisplatin and 5-fluorouracil on human hepatocellular carcinoma cells. Evid Based Complement Altern Med. 2013;2013:121725.
- 18- Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, et al. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. J Ethnopharmacol. 2008;116(2):377-80.
- 19- Krausse R, Bielenberg J, Blaschek W, Ullmann U. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of *Extractum liquiritiae*, glycyrrhizin and its metabolites. J Antimicrob Chemother. 2004;54(1):243-6.
- 20- Saxena S. *Glycyrrhiza glabra*: Medicine over the millennium. Nat Prod Rad. 2005;4(5):358-67.
- 21- Badam L. In vitro antiviral activity of indigenous glycyrrhizin, licorice and glycyrrhizic acid (Sigma) on Japanese encephalitis virus. J Commun Dis. 1997;29(2):91-9.
- 22- Hoever G, Baltina L, Michaelis M, Kondratenko R, Baltina L, Tolstikov GA, et al. Antiviral Activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS- Coronavirus. J Med Chem. 2005;48(4):1256-9.
- 23- Ram A, Mabalirajan U, Das M, Bhattacharya I, Dinda AK, Gangal SV, et al. Glycyrrhizin alleviates experimental allergic asthma in mice. Int Immunopharmacol. 2006;6(9):1468-77.
- 24- Račková L, Jančinová V, Petříková M, Drábíková K, Nosál R, Štefek M, et al. Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin. Nat Product Res. 2007;21(14):1234-41.
- 25- J Mason T, Chemat F, Vinatoru M. The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. Curr Org Chem. 2011;15(2):237-47.
- 26- Zaman MA, Iqbal Z, Abbas RZ, Khan MN. Anticoccidial activity of herbal complex in broiler chickens challenged with *Eimeria tenella*. Parasitology. 2012;139(2):237-43.
- 27- Fudge AM. Laboratory medicine: avian and exotic pets. 1<sup>st</sup> Edition. Philadelphia: Saunders; 2000.
- 28- Beynen A, Gärtner K, Van Zutphen L. Principles of laboratory animal science. Philadelphia: Elsevier; 2003.