

## Investigating the Effect of Synergistic *Glycyrrhiza glabra* and *Astragalus gossypinus* on Improvement of Gastrointestinal Wound in Rats

Mohaddeseh Larypoor\*<sup>1</sup> , Elham Akhavan Sepahy<sup>2</sup> , Anitasadat Tabatabaee Alavi<sup>2</sup> 

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
2. Farzanegan 2 Highschool, Tehran, Iran

 [10.30699/ijmm.14.4.314](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.4.314)



### ABSTRACT

**Background:** Due to the increase in gastrointestinal diseases, the use of low-potency herbal medicines for treatment has increased. The synergistic effect of *Glycyrrhiza glabra* and *Astragalus gossypinus* on the healing of gastric ulcers is the aim of this study.

**Materials & Methods:** The both plants were harvested and extracted. The most appropriate dose for the use of *G. glabra* extract in experiments, 200 mg/kg/day, was determined by performing writing tests and carrageenan. Then, to create of gastric ulcer in rats, rats were gavaged for 3 days with a dose of 200 mg/kg/day of dissolved aspirin in 1% Carbocyte methylcellulose. The groups were treated with dose 200 mg/kg/day (Concentration of 0.363 mg/mL) of both extracts and distilled water for 14 days. Four gastric ulcer rat groups, respectively, received both extracts, *G. glabra* extract, omeprazole and distilled water as a positive control group, and the fifth group or negative control group Without gastric ulcer received distilled water. After the treatment period, the rats were described and ulcers were examined under microscopic and pathological examination.

**Results:** Both extracts together (200 mg/kg/day) reduced the wound coefficient significantly ( $P<0.01$ ) compared to the two control groups. The percentage of wound healing was increased than the positive control group (omeprazole) 90.27% and the negative control group (distilled water) 91.53%. Pathologic examination confirms microscopic findings.

**Conclusion:** The statistical evaluation of the results shows that the effects of gastric ulcer as a result of the consumption of *G. glabra* are very low and valuable ( $P<0.01$ ). Also, the use of both extracts together is not synergistic.

**Keywords:** *Glycyrrhiza glabra*, *Astragalus gossypinus*, Gastric ulcer

Received: 2020/03/12; Accepted: 2020/04/25; Published Online: 2020/07/20

**Corresponding Information:** Mohaddeseh Larypoor, Assistant Professor of Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran. Email: [m.larypoor@iau-tnb.ac.ir](mailto:m.larypoor@iau-tnb.ac.ir)



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Larypoor M, Akhavan Sepahy E, Tabatabaee Alavi A. Investigating the Effect of Synergistic *Glycyrrhiza glabra* and *Astragalus gossypinus* on Improvement of Gastrointestinal Wound in Rats. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (4) :314-341

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

### Introduction

Licorice with the scientific name of *Glycyrrhiza glabra* is a plant native to the Mediterranean region and grows in most parts of Iran. This perennial herbaceous plant has numerous underground stems and its leaves are compound. Its flowers are bluish and its fruits contain 5 to 6 rosary-shaped and brown seeds. This plant belongs to the butterfly family and has been one of the most important native medicinal plants in Iran since ancient

times, which grows in most regions of Iran. Two varieties named *glabra* and *glandulifera* (Waldst & Kit) Boiss have been identified and the most important collection areas are Fars province. It is widely used in traditional medicine and treatment of digestive problems (1). *G. glabra* rhizomes contain many active ingredients including triterpene, saponins, glycyrrhizin and 2,4-hydroxyglycyrrhizin, which have a sweetening power of

100-50 times higher than sugar cane. Flavonoids such as isoliquiritigenin, liquiritigenin, isolicoflavonol, and isoflavones such as glabren, glabridin, glabrol, 3-hydroxyglabrol, and glycyrrhisoflavone are also abundant in this plant root. Other compounds, including hydroxycoumarin include herniarin, umbelliferone, glycy coumarin, licopyranocoumarin and cumarin derivatives, including glycerol, isoglycerol, liqoumarin and steroids, including sterols, beta-sterols, stigmasterol and fructose oils including anethole, Licorice is found. Licorice has a mild nature in terms of ancient Iranian medicine. The most important newly discovered property of licorice, used in Germany, Europe and the United States, is to treat stomach ulcers and stomach cancer. Licorice rhizome and its components can have beneficial effects in the prevention and treatment of gastrointestinal diseases, especially gastric ulcer, bloating, constipation, tonsillitis and hepatitis. On the other hand, the effects of licorice and its active components on the respiratory system and elimination of cough, asthma, and chest infections have been observed in studies (2).

Today, the anti-cancer effects of some *Glycyrrhiza glabra* compounds have been identified. Also, the beneficial effects of licorice on the treatment of depression indicate a wide range of capabilities of this plant. Licorice and its active ingredients have a wide range of beneficial antioxidant, anti-inflammatory and anti-allergic effects. Therefore, in Phytotherapy, special attention should be paid to this plant. (5, 6 and 25) According to the articles, excessive consumption of licorice causes high blood pressure, so it is better to consume tragacanth to eliminate the blood pressure caused by eating licorice plants to eliminate this complication (7). Khoshnam *et al.* In 2016 proved in a study that the combination of licorice (90 mg/kg) with LNAME has synergistic effects on lowering blood pressure (8).

Tragacanth with the scientific name of *Astragalus gossypinus*, is the gum and sap of a plant called *Astragalus*, which has different species in the form of shrubs or perennial and annual herbaceous plants. This plant has more than 200 species that are mostly grown in steppe and mountainous areas of Iran.

Tragacanth also has a warmer nature. This gum flows spontaneously or usually due to a crack in the stem and dries after a short time, which is collected and marketed in two main forms. The start of operation is usually from late spring to early September. Operators first empty around the stem and then make incisions parallel to the stem (parallel to the phloem) with special blades.

After a few days, the sap (tragacanth) seeps out due to an incision made in the stem, and the sap loses its water and hardens when exposed to sunlight. Operators collect tragacanth twenty days after cutting and repeat the

process. In the past, people used tragacanth to wash dry hair. This compound is used to strengthen normal and oily hair and to strengthen dry hair, cough and sputum. Tragacanth contains 10-15% water, 3-4% minerals and 3% starch, and the molecular weight of tragacanth is over eight hundred thousand daltons. Tragacanth is an odorless substance that does not dissolve 60-70% in water, but by absorbing moisture, it becomes a sticky glaze in which starch particles can be seen.

In tragacanth there are generally two types of significant active substances, one is a substance that is soluble in water called tragacanthine, and the second is a substance that is insoluble in cold water and is called basorin. Tragacanthine is composed of galacturonic acid, which is attached to the sugars galactose and xylose. Basorin also contains galacturonic acid bound to the sugars galactose and xylose. These effective substances prevent the prolongation of the stoppage time of feces in the intestine and ultimately prevent the adverse effects of toxins on intestinal tissue and thus prevent the carcinogenic effects of fecal matter (7). Due to the nativeness, it was cheap and the availability of this herb, these plants can be a good alternative to chemical drugs effective in the treatment of gastric ulcer and have the least side effects after consumption.

Gastric or peptic ulcer is one of the most important diseases in which many people in the community are affected. Gastric or peptic ulcer: It is a painful lesion that occurs on the inner wall of the stomach or at the beginning of the small intestine called the duodenum. No known single cause of gastric ulcer has been found. However, it is now clear that gastric ulcer is the result of an imbalance of gastrointestinal and duodenal fluids. One of the causes of stomach ulcers is an infection caused by a bacterium called *Helicobacter pylori*. Also, the use of painkillers called nonsteroidal anti-inflammatory drugs or NSAIDs, including aspirin, naproxen, ibuprofen and many other drugs can also be effective in treating the symptoms of gastric ulcer (3). Family history of gastric ulcer, other diseases such as liver, kidney or lung diseases, frequent drinking of alcohol and over 50 years of age are also effective in this disease (7).

Some symptoms of stomach ulcers include burning pain in the middle or upper part of the stomach between meals or at night, bloating, heartburn, nausea or vomiting, black or dark stools (due to bleeding), high blood pressure, weight loss, and severe pain. It is in the middle or upper part of the stomach (7).

Half of the people in the community suffer from stomach problems and do not have a proper treatment plan. There are methods for treating stomach ulcers such as antibiotics, endoscopy and surgery. Drugs such as Prilosec, Prevacid, Aciphex, Protonix, Zegerid are used in

the treatment of gastric ulcers, which have many side effects and are expensive (9).

Providing a suitable herbal medicine can be a good alternative to chemical treatments for this disease and this is very important. In addition, herbal medicines have the least side effects compared to chemical medicines. The use of native medicinal plants can be the cheapest and available to the patient and reduce the cost of importing medicinal plants and chemical drugs.

## Materials and Methods

This study is related to a two-person experimental study of seventh grade students of Farzanegan Two High School under the guidance of Ms. Bozorgzadeh, High School Research Secretary and Dr. Larypoor, an Assistant Professor of the faculty of Islamic Azad University, North Tehran Branch is done.

### Evaluation of Effective Doses of *Glycyrrhiza glabra*

In order to evaluate the anti-ulcer effects of aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra*, rating and teal flick tests were used. Also, Lorek's method was used to evaluate the acute toxicity of the extract (21). The results of these tests show that the aqueous extract of licorice at a dose of 200 mg/kg clearly showed the anti-ulcer effect on the writing and teal flick tests. Dad. ( $P < 0.01$ )

### Rating Test

In this experiment, adult male NMRI mice weighing 25-35 g were used and on the day of the experiment, in order to accustom the animals to the environment, each of them was placed in the standard glass box 30 minutes before the start of the experiment. Aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* was dissolved in sterile saline and injected intraperitoneally at doses of 100, 200 and 300 mg / kg body weight (4, 22). After 15 minutes, acetic acid in a volume of 0.1 ml / kg was injected at a concentration of 0.6%, and after intraperitoneal injection of acetic acid, the number of abdominal contractions was counted for 30 minutes. In addition, each animal was used only once in the control group, after intraperitoneal injection of saline, a rating test was performed (21-23).

### Carrageenan test

To perform the carrageenan test, first, adult male NMRI mice weighing 25-35 g in seven groups were treated with the desired substance (saline, extract, dexamethasone) in the amount of 0.2 mL intraperitoneally. One hour later, 0.1 mL of 1% carrageenan was injected subcutaneously into the dorsal surface of the animal's right foot. Four hours after carrageenan injection, mice were killed by chloroform and their legs were amputated. Inflammation index was assessed (24). All data were

statistically analyzed using one-way ANOVA and Tukey test. Results were presented as a mean  $\pm$  standard deviation (S.E.M  $\pm$  Mean). The criterion for statistical inference is ( $P < 0.05$ ) (24).

### Preparation of Medicinal Plant

The root of licorice identified with the number IAUNT17333 was prepared from the herbarium of Islamic Azad University, North Tehran Branch and after cleaning, it was divided into 1 cm pieces and ground. It was then poured onto a cloth and 300 mL of 70% methanol was poured into a Soxhlet balloon. After 24 hours, the solvent was gradually evaporated by heat and the active ingredients were transferred to the solvent. The extract was then filtered and transferred to a rotary apparatus at 45 ° C and 45 ° C for one hour to separate the solvent. The extract was then transferred to a dark container and stored in the refrigerator for subsequent experiments (10, 3).

Edible tragacanth with the number IAUNT17334 was prepared from the herbarium of Islamic Azad University, North Tehran Branch, and after powdering, it was dissolved in sterile distilled water at a temperature of 45°C and used. In this study, based on the rating test, carrageenan and determination of toxicity dose and also based on the results of research of Sepehri *et al.* (2007), the dose of these two herbal medicines was determined to be 200 mg / kg. (4, 22) All solutions were stored at 4°C for later use.

### (LD50) Determination of Acute Toxicity

This test was performed based on the method of Dietrich Lorke (1983) (21). After intraperitoneal injection of dilutions of the extract at doses of 10, 100, 1000, 1600, 2900 and 5000 kg / mg, the mortality rate (LD50) of 50% of mice up to 72 hours after injection was evaluated.

### The Effect of Aqueous Extract of *Glycyrrhiza glabra* and Tragacanth in vivo

31 NMRI rats weighing 200-230 g were obtained from Pasteur Institute of Iran. The animals were kept in cages with long mesh floors to prevent defecation and at a temperature of 22-25°C and a period of light and darkness for 12 hours and were fed with normal food and free access to water. In order to empty the stomach, all animals except the negative control were kept hungry for 48 hours and fed with 8% sucrose solution during the starvation period to avoid dehydration. Then 4 groups of mice were gavaged for 3 days with aspirin at a dose of 200 mg dissolved in 1 cc of solvent (1% carboxymethylcellulose) based on daily weight of mice. The absence of halal wound healing effect has already been confirmed (3, 4).

Depending on the type of treatment for 14 days, each group received a veterinary licorice extract (concentration

of 0.036 mg/mL per compound) and distilled water at a dose of 200 mg by gavage (10, 19). These mice were classified into five groups and each group had 6 mice and were treated for two weeks. The experimental groups were:

1- The first group of mice with gastric ulcer that were treated with licorice extract of *Tragacanth* at a dose of 200 mg based on daily weight of mice.

2- The second group of mice with gastric ulcer that were treated with licorice extract at a dose of 200 mg based on daily weight of mice.

3- The third group of mice with gastric ulcer that were treated with omeprazole at a dose of 200 mg based on daily weight of mice.

4- The fourth group or positive control of mice with gastric ulcer that were treated with distilled water at a dose of 200 mg based on daily weight of mice.

5. The fifth group or negative control who did not have gastric ulcer and were treated with distilled water at a dose of 200 mg based on daily weight of rats.

A rat was diagnosed with a gastric ulcer after a period of aspirin administration and was sent to a pathology laboratory for gastric ulcer confirmation. The manner of gavage in different groups is shown in Figure 1.



Figure 1. How to gavage extracts in mice

Three hours after the last injection, animals in all groups were killed and their incoming stomach was quickly removed and cut from a large curvature, and then the pathologist examined the type of wound, bleeding, and inflammation. After preparing paraffin sections, the

samples were observed with a stereomicroscope (Lica Zoom 2000). Incoming gastric lesions were examined separately and measured using mm using Wild Heerbrugg, Switzerland (Graticule) and their mean was determined. Spotted lesions (petechiae) with a size of one mm were also counted and all five spotted lesions were considered as one mm wounds.

1-2 = 2mm

3-4 = 3mm

6-5 = 4mm

Losses larger than 6 mm were considered equal to 5. The sum of the total amount obtained for wounds was calculated and considered as the wound coefficient (3, 11). The recovery coefficient was calculated from the following formula:

$$\text{Healing coefficient} = \frac{100\% \text{ Wound control coefficient}}{\text{Treatment wound coefficient} - \text{Wound control coefficient}}$$

After microscopic calculations, the stomachs and intestines were placed in the neutral formalin buffer and stabilized and prepared for tissue sections. Six-micron sections were prepared and stained by hematoxylin-eosin method and given to the pathologist for interpretation blindly without knowing the tested groups. Microscopic images were taken with the Olympus CH30 camera and microscope, and macroscopic images were taken directly with the digital camera.

#### Statistical Analysis

The results were analyzed by one-way Anova test using SPSS 11 software and the difference was considered significant with  $P\text{-value} < 0.01$ .

## Results

### Acute toxicity results

According to the results of Table 1, injection of the aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* (AEGg) in the mentioned doses did not show any acute toxicity. The results are shown in Table 1.

Table 1. Results of acute toxicity determination and evaluation of LD50

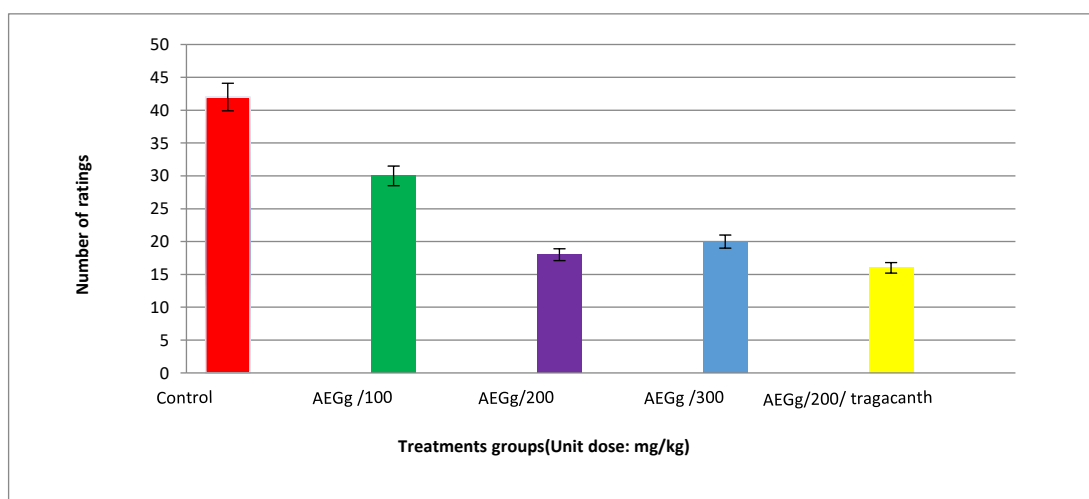
The second stage of the acute toxicity test		The first step of the acute toxicity test	
Dosage and substance	Number of animals / mortality	Dosage and substance	Number of animals / mortality
AEGg 1600 mg/kg	11•/	AEGg 10 mg/kg	3•/
AEGg 2900 mg/kg	11•/	AEGg 100 mg/kg	3•/
AEGg 5000 mg/kg	11•/	AEGg 1000 mg/kg	3•/

LD<sub>50</sub> > 5000mg/kg / Aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* (AEGg)

### Rating Test Results

The results of this test showed that injections of 100, 200 and 300 mg/kg of aqueous extract of *G. glabra* decreased compared to the control group, but the dose of 200 mg/kg showed a significant decrease compared to other treatment groups ( $P < 0.01$ ). Therefore, the dose of 200 mg/kg was selected for further experiments. The results of this test are shown in Figure 1. As shown in Figure 2, the addition of

tragacanth at a dose of 200 mg/kg, which, according to the articles is the best dose for the treatment of gastric ulcer, shows a significant decrease compared to the control group, but this decrease compared to the group receiving aqueous extract of *G. glabra* at a dose of 200 and 300 does not show a significant difference.



**Figure 2.** Comparison of mean rat ratings with different concentrations of Aqueous extract of Glycyrrhiza glabra (AEGg) in acetic acid test ( $P < 0.01$ )

### Carrageenan Test Results

In this test, the anti-inflammatory effect of aqueous extract of *G. glabra* on carrageenan-induced edema in adult male rats in seven groups was investigated. Aqueous extract of *G. glabra* was injected intraperitoneally at doses of 100, 200 and 300 mg / kg

body weight and dexamethasone at doses of 10 mg / kg body weight. The results were presented as a mean  $\pm$  standard deviation in Table 2.  $P$ -value  $< 0.001$  and  $P$ -value  $< 0.05$  indicate the difference with the control group.

**Table 2.** Evaluation of the anti-inflammatory effect of aqueous extract of Glycyrrhiza glabra on carrageenan-induced edema in adult male rats

Group	Weight difference between right and left foot
Control	3.79 $\pm$ 59
Witness	3.50 $\pm$ 60
Root extract (100 mg / kg body weight)	*15/2 $\pm$ 11/58
Root extract (200 mg / kg body weight)	***84/2 $\pm$ 50/18
Root extract (300 mg / kg body weight)	***88/0 $\pm$ 32
Dexamethasone	***73/1 $\pm$ 33/10

\*\*\* Significant difference with control and control group ( $P < 0.001$ ), \* Significant difference with control and control group ( $P < 0.05$ )

The results of the present study showed that the treatment of aqueous extract of *G. glabra*, *G. glabra* on carrageenan-induced edema at doses of 100, 200, 300 mg/kg body weight and dexamethasone at a dose of 10 mg/kg body weight, significantly reduced the rate of edema. The animal shows feet compared to the

control group. The results of the present study showed that the treatment of licorice at a dose of 200 mg/kg body weight caused a significant change in the rate of edema in the animal compared to the control and control groups and even the rate of edema in mice that They have received doses of 100 and 300 mg/kg,

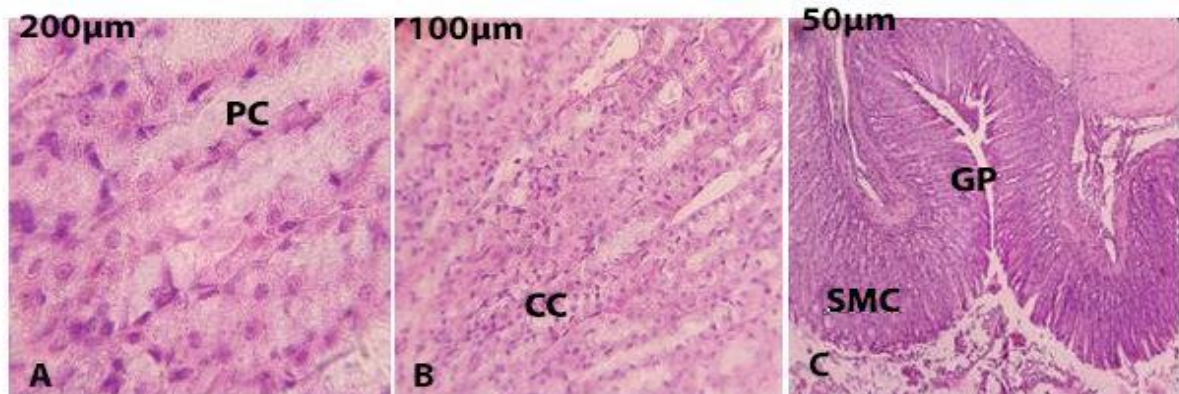


this difference in edema is more significant and therefore is chosen as the most appropriate dose for subsequent tests, because carrageenan causes edema and as a result, weight gain in the right leg and inflammation.

#### Pathological Examination Results

Receiving three consecutive doses of aspirin could cause mucosal lesions in the stomach of mice treated with mucosal lesions and cause bleeding inflammation in the intestine. On macroscopic examination, multiple hemorrhagic lesions of various sizes were

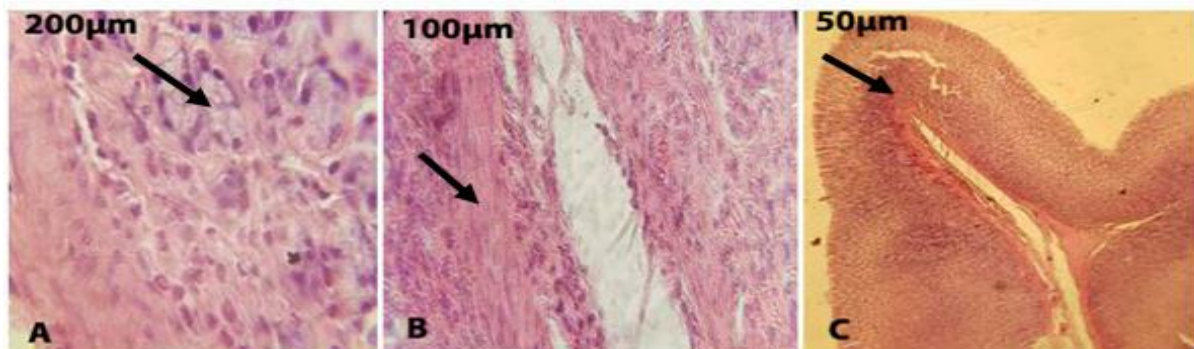
observed in the gastric endocrine glands, covering a large portion of the rat gastric gland. On microscopic examination, obvious wounds were seen passing through the mucosal layer and destruction of the epithelial tissue in the entrance stomach. As seen in Figure 3, in the negative control sample of the stomach, the mucosal layer of the gastric mucosa and muscle has a regular and normal appearance and histologically the epithelial and pores are completely healthy. Pathological images of normal rat stomach tissue are shown in Figure 3.



**Figure 3.** Observation of regular, normal and perfectly healthy appearance of rat gastric epithelial lining as a negative control, PC: gastric wall cells, SMC: superficial mucosal cells, CC: main gastric cells, GP: gastric glands

Figure 4 shows histopathological changes in the gastric tissue of aspirin-treated mice compared to normal gastric tissue. As can be seen in the pictures, the epithelial lining is completely destroyed and the inflammatory cells and

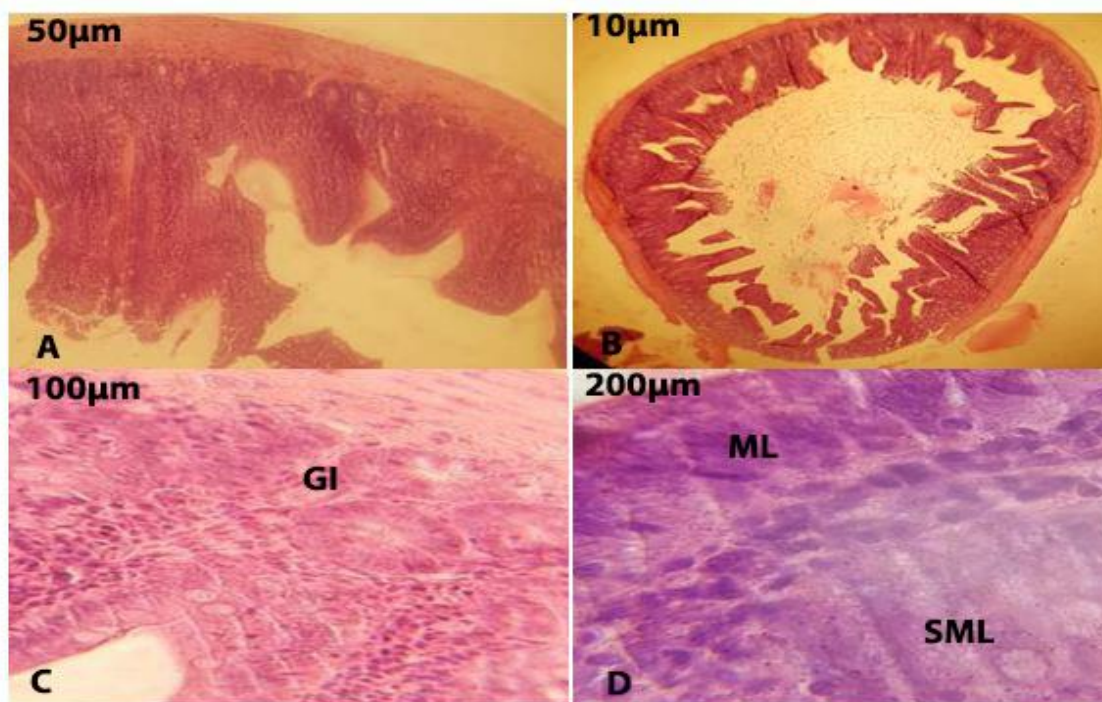
lymphocytes are completely visible and the gastric glands are destroyed. The mucosal area of the mucosal minister is completely inflamed. Edema, bleeding and dilation of blood vessels in the stomach are observed.



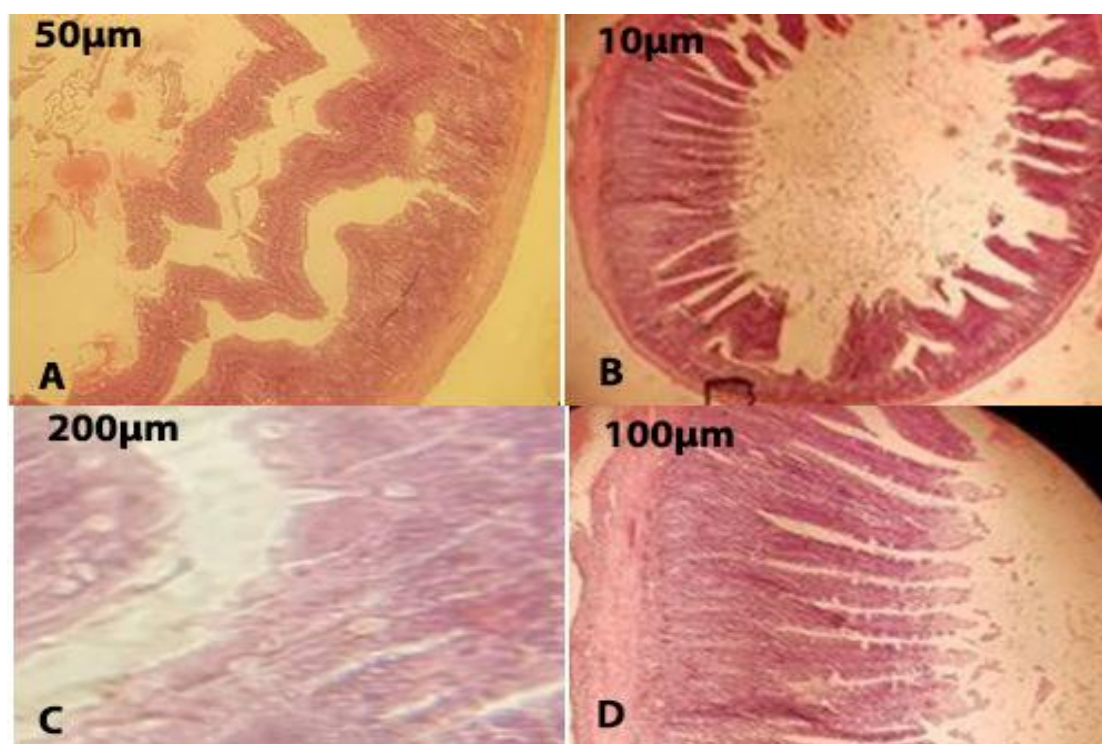
**Figure 4.** Observation of rat gastric ulcer in comparison with Figure 3: Completely destroyed epithelium (B) and destruction of the endocrine glands (GP) and gastric epithelium (PC) in Figures (A) and (B) are quite evident

In the negative and normal control sample of rat intestine, villi appearance is observed in the surface layer of the intestine, which is completely regular, the muscular layer of the muscle minister and the normal intestinal gland. The stained cross section of a normal rat intestine is shown in Figure 5. In the positive histopathological specimen of the intestine, inflammation

and lymphocyte proliferation in the stained tissue section are quite evident. Increased inflammatory cells such as neutrophils are seen in multiple ducts of the intestinal lining. Lymphocytes are found in the superficial villi of the intestine along with a medium-sized microvacuum with complete edema. Figure 6 shows the inflamed intestinal tissue as a positive control



**Figure 5.** Observation of normal intestinal tissue of mice as a negative control is clearly shown in section (C) of the intestinal glands (GI)



**Figure 6.** Observation of intestinal inflammation in rats or positive intestinal control under the influence of aspirin (a) Observation of intestinal periphery and an increase in inflammation (C), (D) Specific inflammation and leukocyte secretion in multiple canals and edema have been observed at the surface of epithelial cells at the site of the arrows

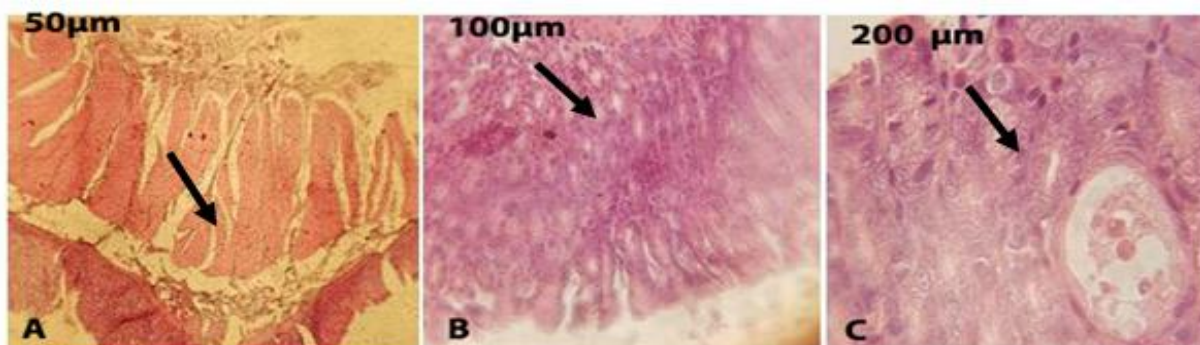
In the group receiving licorice, in comparison with the control group of gastric ulcers, the gastric mucosal area is seen as completely normal and compared to

the control group of gastric ulcers, only slight blood diffusion and slight neutrophil secretion are seen. The positive effect of aqueous extract of *G. glabra* on

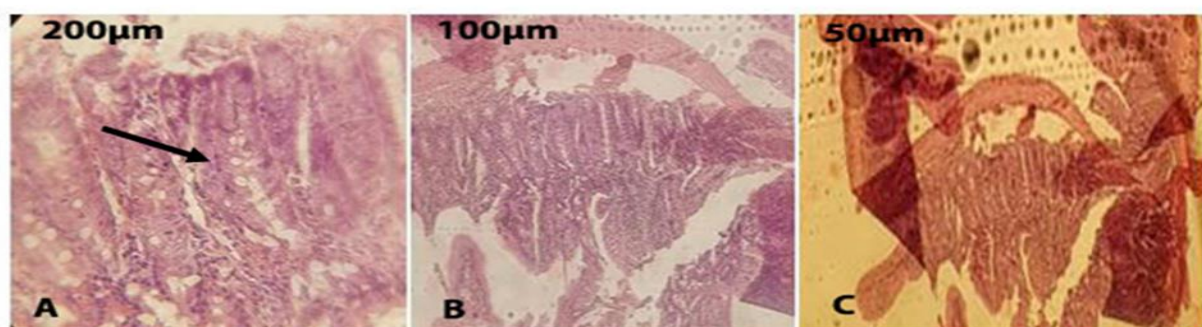


improving the quality of pathological lesions was also observed, but it had less effect than the stomach. Figure 7 shows the effect of aqueous extract of *G.*

*glabra* on gastric ulcer and Figure 8 shows the effect of aqueous extract of *G. glabra* on intestinal ulcer.



**Figure 7.** Effect of aqueous extract of *G. glabra* on gastric ulcer. In Figure (b), the amount of inflammation is reduced compared to the ulcer control sample and the histological structure is completely normal, but a slight exudation of neutrophil cells is observed at the flash.



**Figure 8.** The effect of aqueous extract of *G. glabra* on intestinal ulcers is shown. The accumulation of blood cells in the intestinal villi is observed at the flash and the spread of inflammatory cells is observed at the tip of the intestines.

As shown in Figure 8, based on pathological studies, in the group receiving aqueous extract of *G. glabra* in the intestine, mild diffusion of lymphocytes in the submucosal and mucosal region with mild necrosis and inflammation at the tip of the intestinal villi was seen, indicating less effect of licorice on intestinal tissue than It has a beneficial effect on gastric ulcer, but it has significantly reduced the severity of inflammation compared to the positive intestinal control group.

Pathological examinations and calculation of wound coefficient showed that aqueous extract of *G. glabra* significantly reduced wound coefficient compared to the control group. This lower wound coefficient was also shown in the group receiving tragacanth and aqueous extract of *G. glabra* ( $P < 0.01$ ).

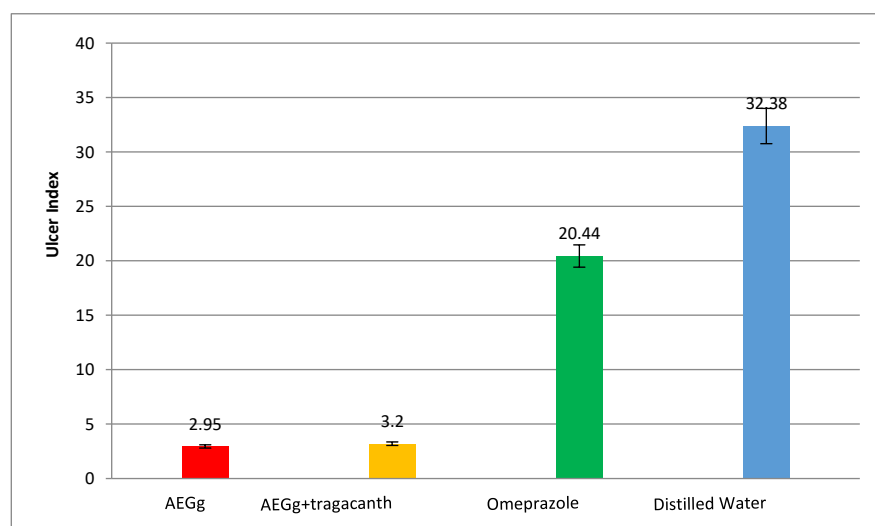
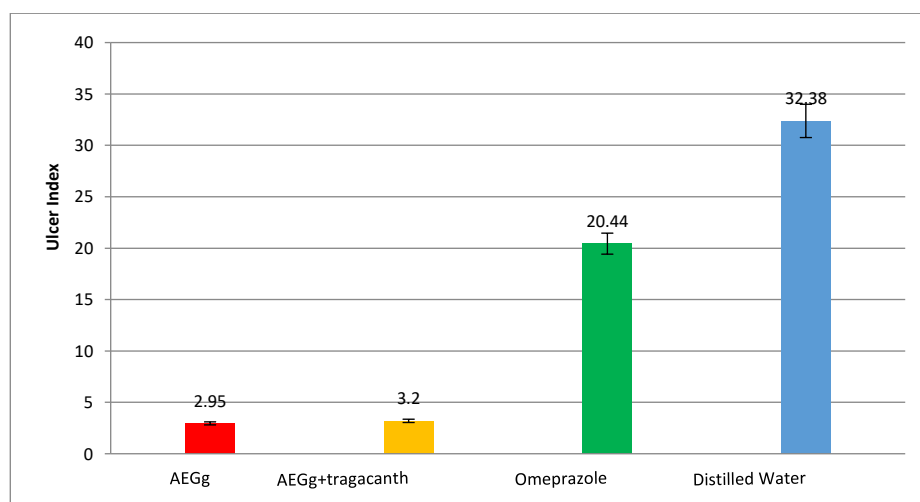
Also, in the group receiving the aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra*, the wound healing percentage compared to the negative control group (distilled water) was 9.53% and in the group receiving omeprazole was 90.27%. Also, in the group receiving the composition of licorice extract and veterinary, there

was no significant difference in wound healing rate compared to the group receiving licorice alone, while it had almost the same effect on increasing the wound healing percentage. ( $P > 0.05$ ) The results of the wound coefficient are consistent with the pathology results. In pathological examinations in the group receiving the aqueous extract of *G. glabra* in the stomach, gastric mucus was completely normal and mild lymphocyte proliferation and less bleeding were observed than in the control group, which indicates the positive effect of aqueous extract of *G. glabra* on wound healing. In the positive control group, the wound healing ratio with omeprazole was 69%, which was lower than the groups receiving the aqueous extract of *G. glabra* and aqueous extract of *G. glabra* with tragacanth groups. Morphometric evaluation to measure wound spread showed that the wound coefficient in the control groups of distilled water and omeprazole decreased less to the other two treatment groups. The results are shown in Table 3 and Figure 9. In Figure 10, the percentage of wound healing in the treatment groups is compared.



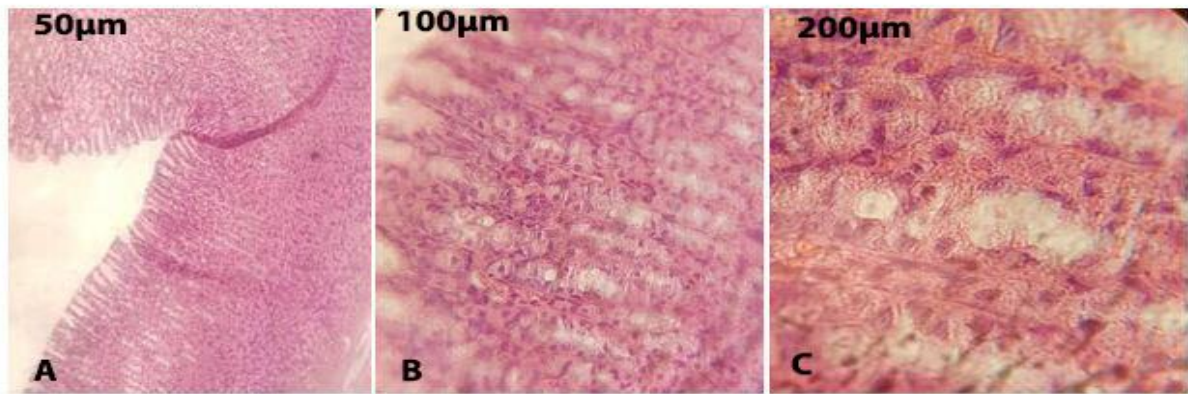
**Table 3.** Comparison of aspirin-induced macroscopic wound coefficient in treatment groups and wound healing ratio

Groups	Ulcer Index	Recovery ratio compared to omeprazole	Recovery ratio compared to distilled water
AEGg	2.95	90.27%	91.53%
AEGg+Tragacanth	3.2	91.85%	93.12%
Omeprazole (Positive Control)	20.44	-	69%
Distilled Water (Negative Control)	32.38	-	0

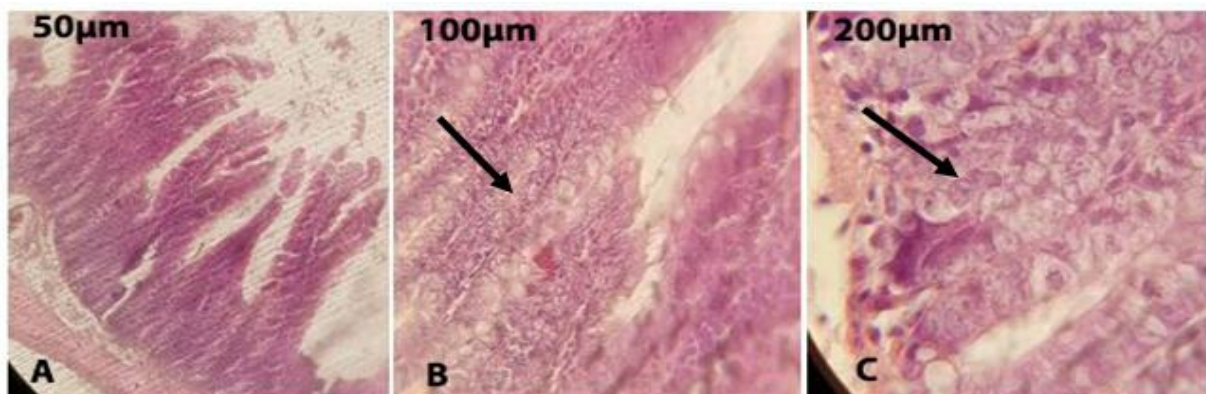
Aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra*(AEGg)**Figure 9.** Comparison of wound coefficient in the treatment groups compared with control groups ( $P<0.01$ )**Figure 10.** Comparison diagram of recovery percentage in the treatment groups compared with control groups ( $P<0.01$ )

In the treatment group of aqueous extract of *G. glabra* and tragacanth, the pathological changes in the stomach completely disappear and the histopathological pattern is completely normal, which shows the synergistic effect of tragacanth and aqueous extract of *G. glabra*. It is seen at the tips of the villi, which is associated with an increase in polymorphonuclear cells. Mild diffusion of

lymphocytes is seen in the submucosa and mucosa, which is a sign of very mild inflammation, but there is mild necrosis in the tips of the villi, which compared to the positive control group, the synergistic effect of tragacanth and aqueous extract of *G. glabra* in improving inflammation is quite evident. The results are shown in Figures 11 and 12.



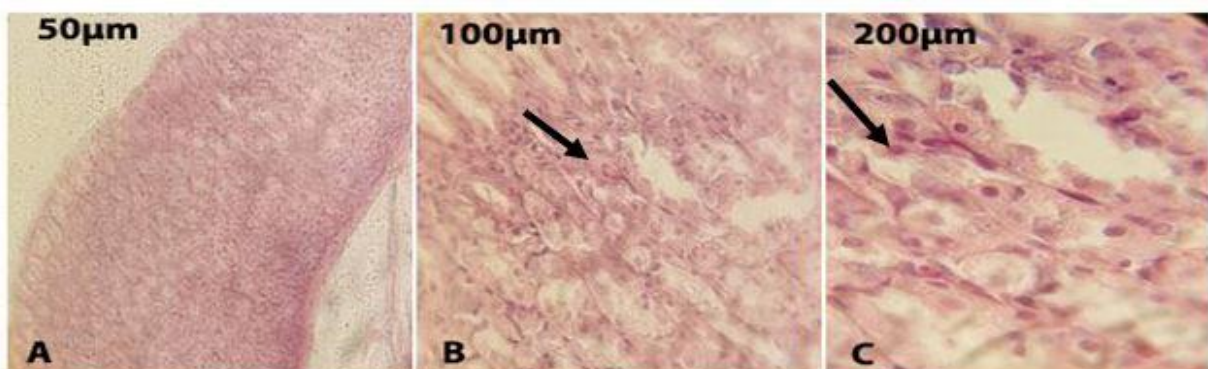
**Figure 11.** Effect of aqueous extract of *G. glabra* and tragacanth detoxification of gastric tissue. According to the figure above, the histopathological pattern is completely normalized



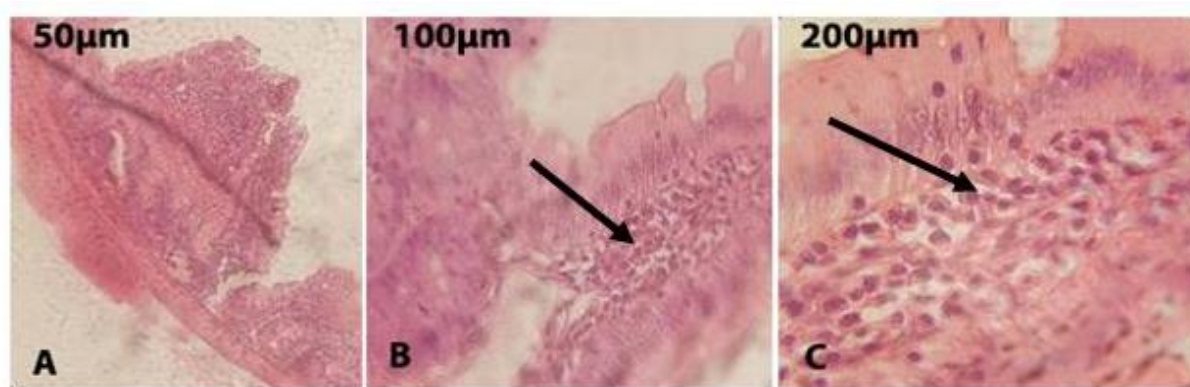
**Figure 12.** Effect of aqueous extract of *G. glabra* and veterinary detoxification on intestinal tissue. Mild inflammation and necrosis of a number of lymphocyte (PMN) cells are still seen at the site of Willy swelling after consuming the aqueous extract of *G. glabra*.

In the omeprazole group, no swelling was seen in the epithelial cells. Regular muscle mass was seen, but lymphocytes were still seen in the submucosal layer, indicating that omeprazole did not heal 100% of

gastric ulcer. The results of the effect of omeprazole on gastric and intestinal tissues are shown in Figures 13 and 14, respectively.



**Figure 13.** Microscopic picture of pathological ulcer in the stomach in the omeprazole treatment group (Flash: shows a slight lymphocyte infiltration, indicating that the omeprazole treatment does not improve 100%).



**Figure 14.** Microscopic picture of pathological ulcer in the intestine in the omeprazole treatment group (flash: shows high neutrophil infiltration with dilation of blood vessels in the intestinal villi, indicating a percentage reduction in improvement as a result of omeprazole treatment).

## Discussion

Aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* (200 mg / kg) has anti-ulcer protective activity in the stomach and anti-inflammatory properties in the intestine and significantly reduces the wound coefficient compared to the two groups of negative control (distilled water) and positive control (omeprazole) ( $P < 0.01$ ) decreases. It also improves wound healing rate compared to 90.27% positive group and 9.53% negative control group. Diagnosis of acute toxicity of various unknown compounds, including aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra*, was evaluated using LD50. In fact, the LD50 is an important indicator for detecting the minimum allowable dose in order to kill 50% of the animals (23, 25). In the present study, no mortality occurred after 72 hours after injection of different doses of the extract, so it is possible that the aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* is completely safe and harmless in both stages of acute toxicity testing, at least in doses between 10 and 5000 mg/ kg. Rating test is used to identify environmental mechanisms and acetic acid used in this test can activate endogenous compounds such as bradykinin, serotonin, histamine.

The results showed that the aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* prevented abdominal contractions caused by acetic acid. Therefore, a possible cause of the anti-inflammatory and anti-infiltration effect of neutrophils, the extract may be due to inhibition of the release of endogenous compounds (arachidonic acid metabolites) and it is speculated that its sedative effects are supported by environmental mechanisms (23). The results of the present study showed that the aqueous extract of licorice root at a dose of 200 mg / kg was able to reduce the inflammation induced by carrageenan and rating tests, whose anti-inflammatory effect was not comparable to dexamethasone. Aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* contains glycyrrhizin, liquoricidine, saponin,

glycyrrhizic acid, a toxic glycyrrhizin, lactic acid, which, according to current sources suggest that a phenolic substance called glycyrrhizin, which is one of the main constituents of licorice, It has a positive effect on inflammation caused by gastric ulcer in rats and has caused its partial treatment (18).

This is probably due to a change in the antioxidant activity of the plant, which has reduced inflammation by inhibiting protein kinase C, phospholipase A and phosphodiesterase, as well as other inflammatory factors such as prostaglandins and histamine (16, 25).

Factors such as gastric ulcers enter the body through mechanisms that increase calcium and free radicals, and in the process leading to the release of arachidonic acid and the enzyme cyclooxygenase, which converts it into a prostaglandin precursor, which in turn causes inflammation. The results of the present study show that the aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* inhibits inflammation in the rating test and carrageenan, but more research is needed to determine the exact mechanisms of their effect and possible pathways of anti-inflammatory action (23, 24).

In the study of Jalilzadeh-amin *et al.* (2015), alcoholic extract of licorice with a dose (50-150 mg/ kg) was able to show the anti-ulcer effects of gastric ulcer, which differs from the dose used in this study. Of course, the results of this study are consistent with the results of the present study regarding the percentage of wound healing, but due to the use of ethanolic extract in Jalilzadeh's research on reducing the inflammatory effects differ from the results of this study, because in this study aqueous extract was used and ethanol effect. As a separate parameter, it could be effective in reducing the rate of inflammation. On the other hand, the dose of 200 mg/ kg was given as peritoneal injection, but in this study, the dose was



used as a gavage and was directly related to intestinal and gastric cells. The place has been effective, which of course requires more research (12). In the microbiological studies, there was no significant difference between the results obtained in the group that received an aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* and tragacanth together with the group that received only aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* ( $P > 0.05$ ), but in the pathological studies, this difference was significant. This result indicates that the association of tragacanth with aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* is not only effective in relieving histopathological symptoms in the stomach and intestines to some extent, but also according to articles can reduce the side effects of licorice consumption such as high blood pressure. Proves the superiority of licorice over existing chemical drugs such as omeprazole. ( $P < 0.01$ ) Of course, the synergistic effect of tragacanth and licorice, using different doses, should be investigated in another study.

In a study by Kjayyal *et al.* (2001), they studied the effects of aqueous extracts of Lemongrass, Siberian, Chamomile, Cumin, Mint, Licorice, Angelica and Marianlu thistle on the anti-ulcer activity of these extracts in combination in the gastrointestinal tract. The results of antitumor activity of the extracts were confirmed histologically and studies showed that the use of several extracts together based on the dose can reduce the amount of acid and increase mucin secretion, increase the release of prostaglandin E2 and decrease leukotrienes. The effect on pepsin content was relatively variable and did not appear to be related to antitumor activity. The most effective effect of aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* and asparagus at a dose of 10 mg / kg of rat body compared to 100 mg / kg of cimetidine was shown on the rat gastric ulcer, which differs from the dose of aqueous extract in this study. In this study, a combined aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* and tragacanth at a dose of 200 mg / kg was used in comparison with omeprazole. The difference between the dose in this study and the above study shows that based on the type of active ingredients in each plant, even with the same efficiency, the dose is different and the synergistic effect of plant extracts is very different based on their dose and even possible side effects. Extracts can be combined with a dose-based manner that requires extensive laboratory research (10).

In the study of Nafeeza *et al.* (2002), aspirin was very effective in causing ulcers only in the gastric lining and had no effect on intestinal tissue, but However, in this study, according to the results, tissue changes occurred in the intestinal tissue, which was less severe than in the stomach and is quite evident in the pathology images taken. The rate of inflammation has decreased, but the aqueous extract of *Glycyrrhiza*

*glabra* continues to reduce the wound rate in the gut and increase the healing rate. ( $P < 0.01$ ) The results of this study are different from the present study. (13) The etiology of gastric ulcer is still debated, but there is an imbalance between invasive factors and gastric mucosal defense mechanisms. Many people use NSAIDs daily to relieve digestive problems, especially stomach pain, and recent studies show that between taking this Pill and the occurrence of gastrointestinal lesions are associated with the release of free radicals (14).

Some herbs can have a positive effect on gastrointestinal function. According to some studies, herbs such as *Glycyrrhiza glabra* by inhibiting acid, increasing mucus production, stabilizing superficial epithelial cells and interfering with the production of prostaglandins in preventing ulcers and They are effective in wound healing (15).

Ramirez *et al.* (2004) also showed that the extract of some plants that have similar compounds in *Glycyrrhiza glabra* has an anti-ulcer effect on gastric ulcer, which the results of this study confirm this, of course, the effect of *Glycyrrhiza glabra*. In the intestine, it is only to the extent of reducing inflammation and complete recovery in intestinal lesions has not been achieved. (16) *Glycyrrhiza glabra* is a genus of herbaceous plants and due to the active compounds present in the rhizome of this plant, it has known anti-ulcer properties and often has compounds of flavonoids, isoflavones, hydroxycoumarin, alkali derivatives, steroids and Fragile oils such as estragole and hexanoic acid have many fatty properties, including antioxidant properties. In the studies of Nolan *et al.* (2005) the protective effect of flavonoids on the improvement of wound ulcers in the gastric lining has been shown to be pathologically consistent with the present study (17).

A study by Jia, T *et al.* (2017) found that another flavonoid called licoriceidin is present in *Glycyrrhiza glabra* root, which has anti-inflammatory effects on chondrocyte osteoarthritis. It is oxidized to prostaglandins and nitric oxide, followed by the Nrf2 pathway, a lotion-based protein and transcription factor encoded in humans by the NFE2L2 gene, by inhibiting oxidative compounds from free electron production and increasing extracellular calcium, thereby causing inflammation. Prevent. Liquoridine is an antispasmodic and anti-inflammatory, antioxidant found in *Glycyrrhiza glabra* root (20).

The results of this study had an inhibitory effect on chondrocyte inflammation and in this study the use of aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* in the stomach reduced lymphocyte diffusion and bleeding compared to the control group which indicates the positive effect of aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* on wound healing. The use of aqueous extract of *Glycyrrhiza*

glabra and tragacanth completely erases the pathological changes and shows a completely normal histopathological pattern, which clearly shows the synergistic effect of aqueous extract of Glycyrrhiza glabra and tragacanth compared to the results of Jia T research (20).

### Conclusion

Although the anti-ulcer effect of aqueous extract of Glycyrrhiza glabra can be attributed to the chemical compounds in the plant extract, its exact mechanism remains unknown due to the few studies available. Increasing free radicals as a result of aspirin consumption and the effect of vitamin C in reducing them and the protective effect of flavonoids, sterol and isoflavones by strengthening the mucosal barrier are some of the things that protect the plant against aspirin ulcers in the stomach and reduce aspirin-induced inflammation in the intestine. The cheapness, nativeness and availability of these plants are important factors that lead researchers to use medicinal plants in the treatment of infections. The results of the present study show that the aqueous extract of Glycyrrhiza glabra is effectiveness of healing of gastric ulcer and the relative effect on the healing of intestinal ulcers. The synergy of tragacanth and Glycyrrhiza glabra completely eliminates the pathological changes and

creates a normal histopathological pattern in the stomach and a relatively normal one in the intestine. In future studies, the possible pathways of anti-inflammatory action should be identified by accurately identifying the active ingredient of Glycyrrhiza glabra and tragacanth and determining the exact mechanisms that improve their effect in the treatment of gastrointestinal infections. According to the results of this study and the mentioned properties of Glycyrrhiza glabra and the absence of side effects on the body, the use of Glycyrrhiza glabra and tragacanth is recommended based on the instructions of experts.

### Acknowledgment

This research is one of the research projects of the Sampad High School in Tehran, which has been carried out in the laboratory of the Islamic Azad University, North Tehran Branch and the boarding house of Baqiyatallah University. The authors thank Dr. Barkhordari and Dr. Amini.

### Funding

Funding for this research has been entirely the responsibility of the authors.

### Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



## بررسی اثر هم‌افزایی شیرین‌بیان و کتیرا بر بهبود زخم دستگاه گوارشی موش صحرایی

محدثه لاری پور<sup>۱\*</sup>، الهام اخوان سپهری<sup>۲</sup>، آنتی‌تاسادات طباطبایی علوی<sup>۲</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران  
 ۲. دبیرستان استعدادهای درخشان دو، تهران، ایران

## چکیده

## اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** باتوجه به افزایش بیماری‌های دستگاه گوارشی، استفاده از داروهای گیاهی کم‌عارضه جهت درمان افزایش یافته است. لذا این مطالعه به بررسی اثر هم‌افزایی شیرین‌بیان و کتیرا بر بهبود زخم معده پرداخت.

**مواد و روش کار:** گیاهان دارویی شیرین‌بیان و کتیرا جمع‌آوری و عصاره‌گیری شد. با انجام آزمون‌های رایتینگ و کاراگینان، مناسب‌ترین دوز برای استفاده از عصاره شیرین‌بیان در آزمایشات ۲۰۰ mg/kg/day تعیین شد. سپس برای ایجاد زخم معده چهارگروه موش به مدت ۳ روز با دوز ۲۰۰ mg/kg/day اسپرین محلول در یک سی‌سی کربوکسی متیل سلولز ۱٪ گاوآذ شدند. این گروه‌ها به مدت ۱۴ روز با دوز ۲۰۰ mg/kg/day (غلظت هر ترکیب ۰/۳۶ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره شیرین‌بیان و کتیرا و آب مقطر تیمار شدند. چهار گروه مبتلا به زخم معده به ترتیب عصاره شیرین‌بیان و کتیرا، عصاره شیرین‌بیان، امپرازول و آب مقطر بعنوان گروه شاهد مثبت دریافت کردند و گروه شاهد منفی که به زخم معده مبتلا نبود، فقط آب مقطر دریافت کرد. پس از دوره تیمار، موش‌ها تشریح شده و بافت معده و روده تحت بررسی میکروسکوپی و پاتولوژی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** عصاره شیرین‌بیان همراه کتیرا ضریب زخم را نسبت به دو گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد ( $P < 0/05$ ). درصد بهبودی زخم نیز نسبت به گروه شاهد مثبت (امپرازول) ۰/۲۷٪ و گروه شاهد منفی (آب مقطر) ۹۱/۵۳٪ افزایش داشت. بررسی‌های پاتولوژیک یافته‌های میکروسکوپی را تقریباً تایید می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** ارزیابی آماری نتایج نشان می‌دهد که آثار زخم معده در نتیجه مصرف شیرین‌بیان بسیار کاهش یافته است. همچنین مصرف کتیرا به همراه شیرین‌بیان در مورد زخم معده اثر هم‌افزایی دارد، اما در مورد التهاب روده اثر هم‌افزایی ندارد ( $P < 0/05$ ).

**کلیدواژه‌ها:** کتیرا، شیرین‌بیان، زخم معده، موش

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

**تاریخچه مقاله**  
**دریافت:** ۱۳۹۸/۱۲/۲۲  
**پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۵/۰۴  
**انتشار آنلاین:** ۱۳۹۹/۰۵/۲۴  
**موضوع:**  
 مواد ضد میکروبی  
**نویسنده مسئول:**

محدثه لاری پور،

استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران  
[m.larypooor@iau-tmb.ac.ir](mailto:m.larypooor@iau-tmb.ac.ir)

## مقدمه

قدرت شیرین‌کنندگی آنها ۵۰-۱۰۰ برابر بیشتر از نیشکر است. فلاونونوئیدهایی مثل Isoliquiritigenin Liquiritigenin, Isolicoflavonol و ایزوفلاونونوئیدهایی مثل glabren, glabridin, glycyrrhisoflavone-3-hydroxyglabro I نیز در این ریشه گیاهی به وفور یافت می‌شوند. ترکیبات دیگری از جمله هیدروکسی کومارین‌ها شامل herniarin umbelliferone, glycycomarin, licopyranocoumarin و مشتقات کومستان شامل glycyrol, isoglycyrol, liqoumarin sterols، و استروئیدها شامل stigmasterol beta-sitosterol و روغن‌های فرار شامل anethole, estragole, eugenol, hexanoic acid نیز در ساختار شیرین‌بیان یافت می‌شوند. شیرین‌بیان از نظر طب قدیمی ایران

شیرین‌بیان (*Licorice*) با نام علمی *Glycyrrhiza glabra*، گیاهی بومی مناطق مدیترانه است و در اکثر نقاط ایران می‌روید. این گیاه علفی چند ساله، ساقه‌های زیرزمینی متعدد دارد و برگ‌های آن مرکب است. گل‌های آن، مایل به آبی و میوه‌اش شامل ۵ تا ۶ دانه تسبیحی شکل و قهوه‌ای است. این گیاه از خانواده پروانه آسا است و از قدیم یکی از مهمترین گیاهان دارویی بومی ایران است. دو وارپته به نام‌های *Glabra* و *Glandulifera Boiss* (Waldst & Kit) از آن شناسایی شده است و مهمترین منطقه جمع‌آوری آن، استان فارس است. در طب سنتی و درمان مشکلات گوارشی کاربرد وسیع دارد (۱). ریزوم شیرین‌بیان دارای مواد موثره فراوانی شامل تریترپن، ساپونین، گلیسیریزین و ۲ و ۴-هیدروکسی گلیسیریزین است که



بهره برداران بیست روز پس از برش به جمع‌آوری کتیرا می‌پردازند و این عمل را مجدداً تکرار می‌کنند. در گذشته مردم از کتیرا برای شستن موهای خشک استفاده می‌کردند. این ترکیب بعنوان تقویت کننده موهای معمولی و چرب و تقویت کننده موهای خشک و ضد سرفه و خلط آواراست. کتیرا دارای ۱۵-۱۰ درصد آب، ۴-۳ درصد مواد معدنی و ۳ درصد نشاسته است. وزن مولکولی کتیرا بالغ بر هشتصد هزار دالتون است. کتیرا ماده‌ای است بی بو که ۶۰-۷۰ درصد آن در آب حل نمی‌شود ولی با جذب رطوبت به صورت لعاب چسبنده در می‌آید که ذرات نشاسته در داخل آن دیده می‌شود. در کتیرا به طور کلی دو نوع ماده مؤثر قابل توجه وجود دارد، یکی ماده‌ای است که در آب محلول است به نام تراگاکانتین، دوم ماده‌ای است که در آب سرد غیر محلول است و با سورین نامیده می‌شود. تراگاکانتین متشکل از اسید گالاکتورونیک است. که به قندهای گالاکتوز و گزیلوز متصل است. با سورین هم واجد گالاکتورونیک اسید متصل به قندهای گالاکتوز و گزیلوز می‌باشد. این مواد مؤثره مانع از طولانی شدن زمان توقف مدفوع در روده و در نهایت جلوگیری از تاثیر سوء سموم بر بافت روده و در نتیجه جلوگیری از عوارض سرطانزا مواد مدفوعی می‌شود (۷). با توجه به بومی بودن، ارزان بودن و در دسترس بودن این دو گیاه، این گیاهان می‌توانند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی مؤثر بر درمان زخم معده باشند و پس از مصرف کمترین عوارض را داشته باشند.

زخم معده از مهمترین بیماری‌هایی است که تعداد زیادی از افراد جامعه با آن درگیر هستند. زخم معده به جراحات دردناکی گفته می‌شود که در جداره داخلی معده و یا قسمت آغازین روده کوچک که اثنی عشر نامیده می‌شود، وجود دارد. هیچ دلیل مشخص و واحدی برای بروز زخم معده یافت نشده است. با این حال، امروزه روشن شده است که زخم معده نتیجه عدم توازن مایعات گوارشی معده و اثنی عشر است. از جمله دلایل بروز زخم معده می‌توان به عفونت در اثر نوعی باکتری که *Helicobacter pylori* نامیده می‌شود، اشاره کرد. همچنین استفاده از مسکن‌هایی که داروهای ضد تورمی غیر استروئیدی یا NSAIDs نامیده می‌شوند، از جمله آسپیرین، ناپروکسن، ایبوپروفن و داروهای بسیار دیگر نیز می‌تواند در بروز علائم زخم معده مؤثر باشد (۳). سابقه خانوادگی ابتلا به زخم معده، ابتلا به بیماری‌های دیگری همچون بیماری‌های کبدی، کلیوی یا ریوی، نوشیدن مکرر مشروبات الکلی و سن بالای ۵۰ سال نیز در بروز این بیماری مؤثر است (۷). برخی از علائم زخم معده شامل درد سوزشی در قسمت میانی یا بالایی معده در فواصل وعده‌های غذایی یا به هنگام شب، نفخ، سوزش معده، تهوع یا

طبعی معتدل دارد. مهمترین خاصیت شیرین بیان که به تازگی کشف شده است و در اروپا و امریکا استفاده می‌شود، درمان زخم معده و سرطان معده است. ریزوم شیرین بیان و اجزای آن می‌توانند در پیشگیری و درمان بیماری‌های گوارشی به خصوص زخم معده، نفخ شکم، یبوست، ورم لوزه و هیپاتیت اثرات مفیدی داشته باشد. ازسوی دیگر اثرات شیرین بیان و اجزای فعال آن برسیستم تنفس و رفع سرفه، آسم و عفونت های قفسه سینه در مطالعات دیده شده است (۲). امروزه اثرات ضدسرطانی برخی از ترکیبات شیرین بیان مشخص شده است. همچنین، اثرات مفید شیرین بیان بر درمان افسردگی حاکی از طیف وسیع قابلیت‌های این گیاه می‌باشد. شیرین بیان و اجزای فعال آن دارای طیف وسیعی از اثرات مفیدآنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآلرژی می‌باشند. بنابراین در فیتوتراپی باید توجه ویژه‌ای به این گیاه شود (۵، ۶، ۲۵). برطبق پژوهش‌های قبلی، مصرف بیش از اندازه شیرین بیان باعث بالا رفتن فشار خون می‌شود، لذا بهتر است برای از بین بردن فشار خونی که با خوردن گیاه شیرین بیان ایجاد می‌شود، کتیرا مصرف شود که این عارضه از بین برود (۷). Khoshnam و همکاران در سال ۱۳۹۵ در تحقیقی اثبات کردند که همراه شدن شیرین بیان (90mg/kg) همراه با داروی LNAME اثرات سینرژیک بر کاهش فشار خون دارد (۹).

کتیرا با نام علمی *Astragalus gossypinus*، صمغ و شیرۀ گیاهی به نام گون است که گونه‌های مختلفی دارد. گون به صورت درختچه یا گیاه علفی چند ساله و یکساله می‌باشد. این گیاه بیش از ۲۰۰ گونه دارد که بیشتر در مناطق استپی و کوهستانی ایران می‌روید. کتیرا به دو نوع مفتولی و خرمنی تقسیم می‌شود، یک نوع کتیرای زرد است که مانند تارها و یا نوارهای پیچیده و دودی شکل است و نوع دیگر کتیرای سفید است که به کتیرای صدفی و یا کتیرای خوراکی که به شکل پارچه عریضی به رنگ سفید صدفی می‌باشد. کتیرا به لحاظ اقتصادی و همچنین به لحاظ بیوتکنولوژی، مصرف دارویی و صنعتی دارد. همچنین کتیرا طبیعت گرم و تر دارد. این صمغ خودبخود و یا معمولاً بر اثر شکافی که در ساقه گون ایجاد می‌شود، جاری می‌گردد و پس از مدت کوتاهی خشک می‌شود که آن را جمع‌آوری کرده و به دو صورت عمده در بازار عرضه می‌کنند. شروع بهره برداری معمولاً از اواخر فصل بهار است تا اوایل شهریور ماه ادامه دارد. بهره برداران ابتدا اطراف ساقه گون را خالی می‌کنند و سپس با تیغ‌های مخصوصی برش موازی با ساقه (موازی با آوندهای آبکش) ایجاد می‌کنند. شیره گون (کتیرا) پس از چند روز به مرور بر اثر برشی که به ساقه وارد شده به بیرون تراوش می‌کند و شیره در معرض نور آفتاب، آب خود را از دست می‌دهد و سفت می‌شود.

میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن با غلظت ۰/۶ درصد تزریق شد و پس از تزریق درون صفاقی اسید استیک، تعداد انقباضات شکمی به مدت ۳۰ دقیقه شمارش شد. در ضمن هر حیوان فقط یکبار مورد استفاده قرار گرفت (۲۳، ۲۲، ۲۱). در گروه کنترل نیز بعد از تزریق درون صفاقی سرم فیزیولوژی، آزمون ریتینگ انجام شد.

### آزمون کاراگینان

برای انجام آزمون کاراگینان، ابتدا موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزن ۳۵ - ۲۵ گرم در هفت گروه با ماده مورد نظر (سرم فیزیولوژی، عصاره، دگزامتازون) به میزان ۰/۲ میلی لیتر به صورت درون صفاقی تیمار گردیدند. یک ساعت بعد ۰/۱ میلی لیتر کاراگینان ۱٪ به صورت زیر جلدی به سطح پشتی پای راست حیوان تزریق شد، چهار ساعت بعد از تزریق کاراگینان موش‌ها توسط کلروفورم کشته و پای آن‌ها را قطع کرده و اختلاف وزن پای راست و چپ به عنوان شاخص التهاب ارزیابی گردید (۲۴). تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one - way ANOVA) و آزمون Tukey بررسی شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (S.E.M  $\pm$  Mean) ارائه گردید. ملاک استنتاج آماری  $P < 0.05$  است (۲۴).

### تهیه گیاه دارویی

ریشه گیاه شیرین بیان شناسایی شده با شماره IAUNT17333 از هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تهیه شد و پس از پاکسازی به قطعات یک سانتی متری تقسیم شد و آسیاب گردید. سپس بر روی پارچه‌ای ریخته شد و ۳۰۰ میلی لیتر متانول ۷۰٪ در بالن دستگاه سوکسله ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت به تدریج حلال بر اثر حرارت بخار شد و مواد موثر به حلال منتقل گردید. سپس عصاره، صاف شد و به داخل دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و دور ۴۵ در دقیقه، به مدت یک ساعت منتقل شد تا حلال آن جدا گردد. سپس عصاره به ظرف تیره‌ای منتقل شد و برای آزمایشات بعدی در یخچال نگهداری شد (۱۰، ۳).

کتیرای خوراکی با شماره IAUNT17334 از هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تهیه شد و پس از پودر کردن در آب مقطر استریل با دمای ۴۵ درجه سلسیوس حل شده و مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق، بر اساس آزمایش ریتینگ، کاراگینان و تعیین دوز سمیت و همچنین بر اساس نتایج تحقیقات Sepehri و همکاران (۱۳۸۶)، دوز مصرف این دو داروی گیاهی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تعیین شد (۴، ۲۲). تمامی

استفراغ، مدفوع سیاه یا تیره (به دلیل خونریزی)، بالا آوردن خون، کاهش وزن و درد شدید در ناحیه میانی یا بالای معده می‌باشد (۷). نیمی از مردم اجتماع از مشکلات معده رنج می‌برند و راهکار مناسبی جهت درمان ندارند. برای درمان زخم معده روش‌هایی مثل استفاده از آنتی بیوتیک، اندوسکوپی و جراحی وجود دارد. از جمله داروهایی مثل *Prilosec*, *Prevacid*, *Aciphex*, *Protonix*, *Zegerid* در درمان زخم معده استفاده می‌شود که هم عوارض زیادی دارد و هم گران تمام می‌شود (۹). ارائه یک داروی گیاهی مناسب می‌تواند جایگزین خوبی برای درمان شیمیایی این بیماری باشد و این امر بسیار مهم است. ضمن اینکه داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی کمترین عوارض را دارند. استفاده از گیاهان بومی دارویی می‌تواند ارزان تر باشد و در دسترس بیمار باشد و هزینه واردات گیاهان دارویی و داروهای شیمیایی را کاهش دهد.

### روش پژوهش

این مطالعه مربوط به یک پژوهش تجربی دو نفر از دانش آموزان کلاس هفتم دبیرستان فرزاتگان دو تحت راهنمایی سرکار خانم بزرگ‌زاده دبیر پژوهش دبیرستان و خانم دکتر لاری پور عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است و در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و حیوانخانه بیمارستان بقیه الله تهران انجام شده است.

### ارزیابی دوزهای موثر شیرین بیان

به منظور ارزیابی اثرات ضد اولسری عصاره شیرین بیان از آزمون‌های ریتینگ، تیل فلیک استفاده شد. همچنین به منظور ارزیابی سمیت حاد عصاره از روش لورک استفاده شد (۲۱). نتایج این آزمون‌ها نشان می‌دهد، عصاره آبی شیرین بیان با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور آشکاری اثر ضد زخم معده را در آزمون‌های ریتینگ و تیل فلیک نشان داد. ( $P < 0.01$ )

### آزمون ریتینگ

در این آزمایش از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزن ۳۵ - ۲۵ گرم استفاده شد و در روز آزمایش به منظور عادت کردن حیوانات به محیط، هر یک از آنها ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش در جعبه استاندارد شیشه‌ای مذکور قرار داده شدند. عصاره آبی شیرین بیان در سرم فیزیولوژی استریل حل شده و با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن موش به صورت درون صفاقی تزریق شد (۲۲، ۴). پس از گذشت ۱۵ دقیقه، اسید استیک به حجم ۰/۱

۴- گروه چهارم یا شاهد مثبت موش‌های مبتلا به زخم معده که با آب مقطر با دوز ۲۰۰ میلی گرم براساس وزن موش روزانه تیمار شدند.

۵- گروه پنجم یا شاهد منفی که زخم معده نداشتند و با آب مقطر با دوز ۲۰۰ میلی گرم براساس وزن موش روزانه تیمار شدند.

یک موش هم برای تعیین ایجاد زخم معده بعد از دوره مصرف آسپرین تشریح شد و به آزمایشگاه پاتولوژی جهت تایید زخم معده ارسال شد. نحوه گاوژ موش‌ها در شکل ۱ دیده می‌شود.



شکل ۱. نحوه گاوژ عصاره‌ها در موش

سه ساعت پس از آخرین دوز تزریق، حیوانات همه گروه‌ها کشته شدند و معده و روده آنها سریعاً خارج شده و از انحنای بزرگ برش داده شد و سپس توسط پاتولوژیست نوع زخم و خونریزی و التهاب بررسی شد. پس از تهیه برش‌های پارافینی نمونه‌ها با استریومیکروسکوپ (Lica Zoom 2000) مشاهده شدند. ضایعات معده و روده، بطور جداگانه بررسی و با کمک گراتیکول Wild (Heerbrugg switzerland) بر اساس میلی متر اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها تعیین شد. ضایعات لکه‌ای (پتشی) با ابعاد یک میلی متر نیز شمارش شد و هر پنج ضایعه لکه‌ای به عنوان زخم یک میلی متری در نظر گرفته شد.

۲mm=۱-۲      ۳mm=۳-۴      ۴mm=۵-۶

ضایعات بزرگتر از ۶ میلی متر برابر با ۵ در نظر گرفته شد. حاصل جمع کل اعداد بدست آمده برای زخم‌ها محاسبه شده و بعنوان ضریب زخم در نظر گرفته شد (۱۱، ۳). ضریب بهبودی از فرمول ذیل محاسبه گردید:

ضریب بهبودی =  $100 \times \text{ضریب کنترل زخم} - \text{ضریب تیمار} - \text{ضریب کنترل زخم}$

پس از محاسبات میکروسکوپی، معده‌ها و روده‌ها در بافر فرمالین خنثی تثبیت شد و برای تهیه مقاطع بافتی آماده گردید. مقاطع شش میکرونی تهیه شده با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شده و برای تفسیر به صورت کور و بدون اطلاع از گروه‌های

محلول‌ها جهت استفاده‌های بعدی، در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

### LD50 تعیین سمیت حاد

این تست بر اساس متد (Dietrich Lorke, 1983) انجام شد (۲۱). پس از تزریق درون صفاقی رقت‌های عصاره با دوزهای ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۶۰۰، ۲۹۰۰ و ۵۰۰۰ کیلوگرم بر میلیگرم، میزان (LD50) مرگ و میر ۵۰ درصد از موش‌ها تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق بررسی شد.

### بررسی اثرات عصاره آبی شیرین بیان و کتیرا در شرایط

#### in Vivo

۳۱ سر موش صحرایی نر جوان از نژاد NMRI با وزن ۲۳۰ - ۲۰۰ گرم از حیوانخانه انیسیتو پاستور ایران تهیه شد. حیوانات در قفس‌های دارای کف توری بلند به منظور ممانعت از مدفوع خواری و در دمای ۲۲-۲۵ درجه سلسیوس و دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری و با غذای معمولی تغذیه و دسترسی آزاد به آب داشتند.

به منظور تخلیه معده، همه حیوانات بغیر از شاهد منفی به مدت ۴۸ ساعت گرسنه نگه داشته شدند و در طول دوره گرسنگی و برای اجتناب از تحلیل آب بدن با محلول سوکروز ۸٪ تغذیه شدند. سپس ۴ گروه موش به مدت ۳ روز با آسپرین با دوز ۲۰۰ میلی گرم محلول در ۱ سی سی حلال (کربوکسی متیل سلولز ۱٪) براساس وزن موش روزانه گاوژ شدند. فقدان اثر زخم‌زایی حلال قبلاً تایید شده است (۴، ۳). هر گروه بر اساس نوع تیمار به مدت ۱۴ روز، عصاره شیرین بیان و کتیرا (غلظت هر ترکیب ۰/۳۶ میلی گرم/میلی لیتر) و آب مقطر را با دوز ۲۰۰ میلی گرم از طریق گاوژ دریافت کردند (۱۹، ۱۰). این موش‌ها در پنج گروه و هر گروه واجد ۶ سرموش طبقه بندی شدند و به مدت دو هفته تیمار شدند. گروه‌های مورد آزمایش عبارت بودند از:

۱- گروه اول موش‌های مبتلا به زخم معده که با عصاره شیرین بیان و کتیرا با دوز ۲۰۰ میلی گرم براساس وزن موش روزانه تیمار شدند.

۲- گروه دوم موش‌های مبتلا به زخم معده که با عصاره شیرین بیان با دوز ۲۰۰ میلی گرم براساس وزن موش روزانه تیمار شدند.

۳- گروه سوم موش‌های مبتلا به زخم معده که با امپرازول با دوز ۲۰۰ میلی گرم براساس وزن موش روزانه تیمار شدند.



## یافته‌ها

آزمایش در اختیار پاتولوژیست قرار داده شد. تصاویر میکروسکوپی با دوربین و میکروسکوپ Olympus CH30 گرفته شد و تصاویر ماکروسکوپی مستقیماً با دوربین دیجیتال گرفته شد.

### نتایج سمیت حاد

با توجه به نتایج جدول تزریق عصاره گیاه شیرین بیان در بازه دوزهای ذکر شده، هیچ سمیت حادی را از خود نشان نداد. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

### تحلیل آماری

نتایج با آزمون Anova یک طرفه وبا استفاده از نرم افزار spss11 بررسی و اختلاف با  $p < 0.01$  معنی دار در نظر گرفته شد.

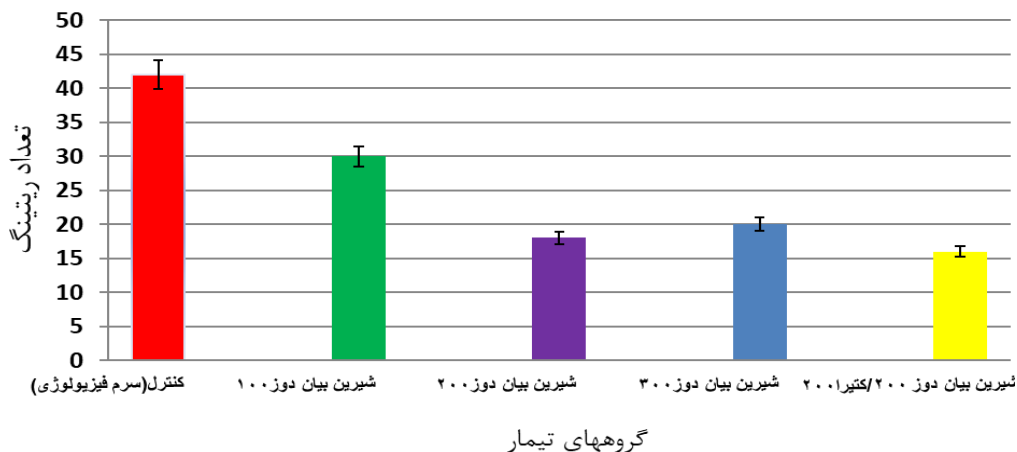
جدول ۱. نتایج تعیین سمیت حاد و ارزیابی میزان LD<sub>50</sub>

دومین مرحله از تست سمیت حاد		اولین مرحله از تست سمیت حاد	
ماده و دوز مصرفی	تعداد حیوانات / مرگ و میر	ماده و دوز مصرفی	تعداد حیوانات / مرگ و میر
AEGg 1600 mg/kg	۰/۱۱	AEGg 10 mg/kg	۰/۳
AEGg 2900 mg/kg	۰/۱۱	AEGg 100 mg/kg	۰/۳
AEGg 5000 mg/kg	۰/۱۱	AEGg 1000 mg/kg	۰/۳

### نتایج آزمون رایتینگ

نمودار ۱ نشان داده شده است. چنانچه در نمودار ۱ مشاهده می شود، افزودن کتیرا با دوز ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم که بر طبق مقالات بهترین دز درمان زخم معده محسوب می شود، کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد ولی این کاهش در مقایسه با گروه دریافت کننده شیرین بیان با دوز ۲۰۰ و ۳۰۰ تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد.

نتایج این آزمون نشان داد که تزریق دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم عصاره شیرین بیان در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد، اما دوز ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم نسبت به گروه های تیمار دیگر، کاهش معنی داری را نشان می دهد. (P<0/01) بنابراین دوز ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم، برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. نتایج این آزمون در



نمودار ۱. مقایسه میانگین تعداد رایتینگ موش صحرایی با غلظت های مختلف عصاره آبی شیرین بیان در آزمون اسیداستیک ( $p < 0.01$ )

### نتایج آزمون کاراگینان

دگزامتازون در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی تزریق گردید. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در جدول ۲ ارائه گردید.  $P < 0.001$  و  $P < 0.05$  نشان دهنده اختلاف با گروه کنترل می باشد.

در این آزمون اثر ضد التهابی عصاره آبی گیاه شیرین بیان بر ادم القا شده توسط کاراگینان در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ در هفت گروه بررسی شد. عصاره آبی گیاه شیرین بیان، در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و

جدول ۲. بررسی اثر ضد التهابی گیاه شیرین بیان بر ادم القا شده توسط کاراگینان در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ

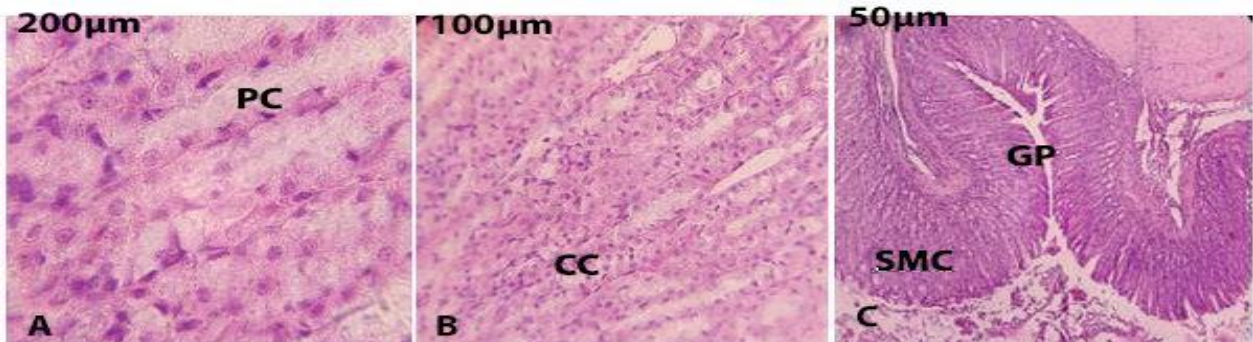
اختلاف وزنی پا راست و چپ	گروه
۳±۵۹/۷۹	کنترل
۳±۶۰/۵۰	شاهد
۵۸/۲±۱۱/۱۵*	عصاره ریشه (میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) ۱۰۰
۱۸/۲±۵۰/۸۴***	عصاره ریشه (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)
۰±۲۲/۸۸***	عصاره ریشه (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)
۱۰/۱±۲۳/۷۳***	دگزامتازون

\*\*\* اختلاف معنی دار با گروه شاهد و کنترل (P < ۰/۰۰۱)، \* اختلاف معنی دار با گروه شاهد و کنترل (P < ۰/۰۰۵)

### نتایج بررسی پاتولوژی

دریافت سه دوز متوالی آسپرین توانست در معده موشهای تحت تیمار ضایعات مخاطی و زیر مخاطی ایجاد کرده و سبب ایجاد التهابات خونریزی دهنده در روده شود. در بررسی میکروسکوپی، ضایعات خونریزی دهنده متعدد با اندازه های مختلف در بخش های غددی معده مشاهده شد، به صورتی که بخش وسیعی از بخش غددی معده موش را در بر گرفته بود. در بررسی میکروسکوپی، زخم های آشکار از لایه مخاطی گذشته و تخریب بافت پوششی در معده وروده دیده شد. چنانچه در شکل ۴ مشاهده می شود، در نمونه شاهد منفی معده، لایه مخاطی و زیر مخاطی و ماهیچه ایی معده ظاهری منظم و نرمال دارد و از نظر هیستولوژیک پوشش اپیتلیال و منافذ کاملاً سالم دیده می شود. تصاویر پاتولوژیک از بافت نرمال معده موش در شکل ۲ نشان داده شده است.

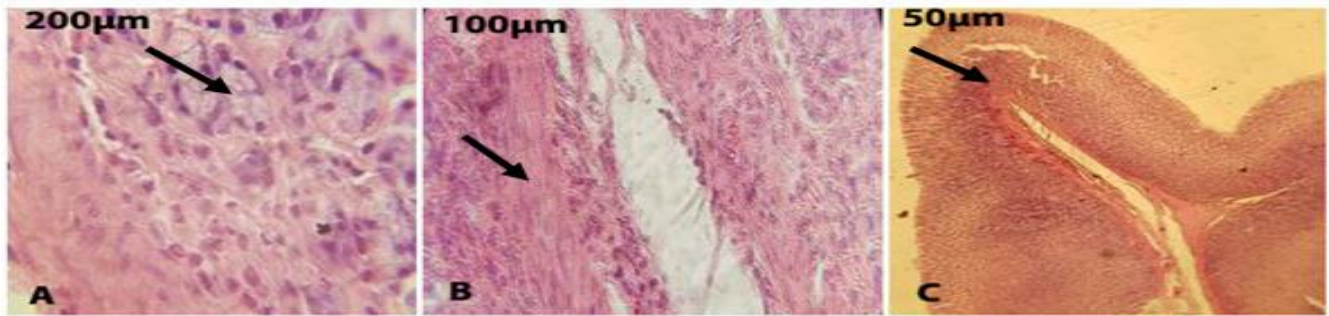
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار عصاره گیاه شیرین بیان بر ادم القا شده توسط کاراگینان در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و دگزامتازون در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، کاهش معنی داری در میزان ادم ایجاد شده در پای حیوان در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار گیاه شیرین بیان با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، موجب تغییر معنی دار در میزان ادم ایجاد شده در پای حیوان در مقایسه با گروه کنترل و گروه شاهد شده و حتی نسبت به میزان ادم در موشهایی که دوزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم را دریافت کرده اند، این اختلاف ادم معنی دار تر است و لذا بعنوان مناسب ترین دوز برای آزمایشات بعدی انتخاب می شود، زیرا کاراگینان باعث ادم و در نتیجه افزایش وزن پای راست و التهاب شده است.



شکل ۲. مشاهده ظاهر منظم و نرمال و کاملاً سالم پوشش اپیتلیال معده موش بعنوان شاهد منفی PC: سلول های جدار معده، SMC: سلول های مخاطی سطحی، CC: سلول های اصلی معده، GP: غدد معده

رفته و سلول های التهابی و لنفوسیتها قابل مشاهده می باشند. ناحیه مخاطی و زیرمخاطی نیز کاملاً به صورت ملتهب دیده می شود. ادم، خونریزی و اتساع رگها در معده گزارش گردید.

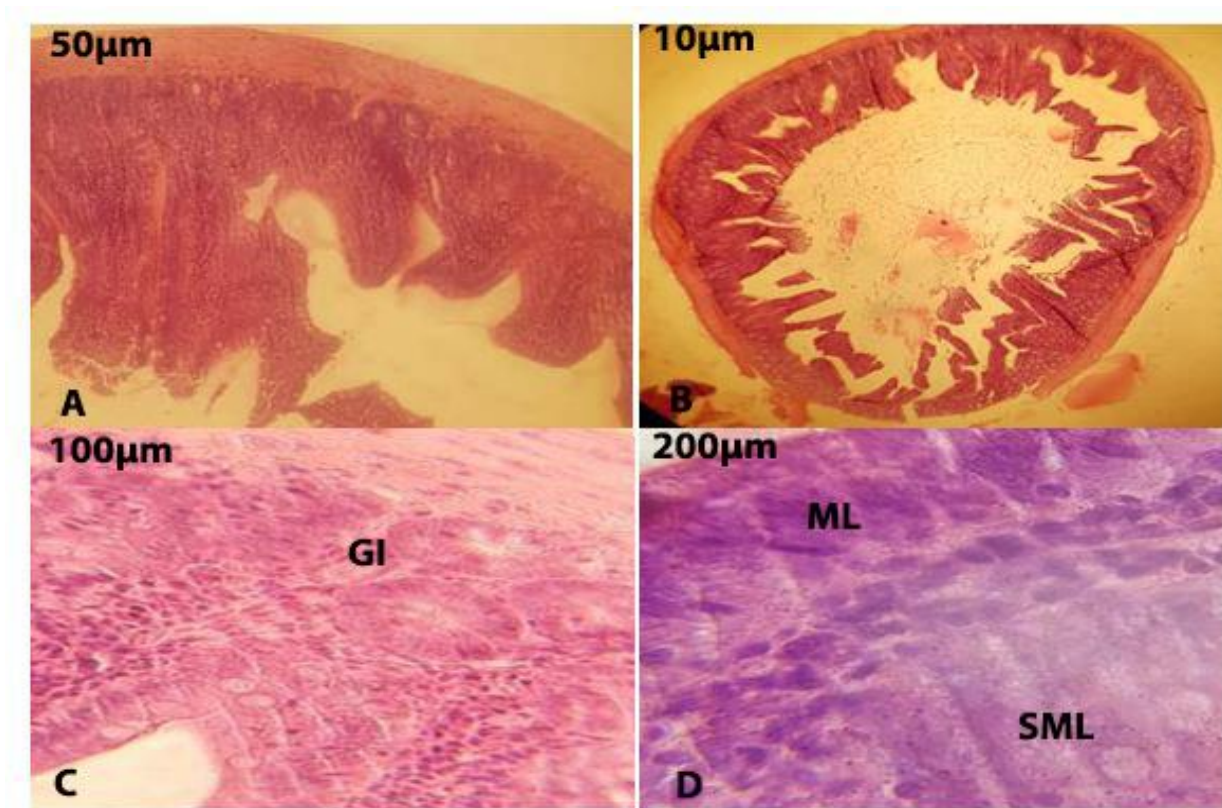
در شکل ۳ تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت معده موش تیمار شده با آسپرین در مقایسه با بافت نرمال معده مشاهده می شود. در تصاویر مشخص است که پوشش اپیتلیومی و غدد معدی کاملاً از بین



شکل ۳. مشاهده زخم معده موش در مقایسه با شکل ۲: اپیتلیوم کاملاً از بین رفته (B) و از بین رفتن غده معدوی (GP) و اپیتلیوم معده (PC) در شکل (A) و (B) کاملاً مشهود است.

روده ایی نرمال مشاهده می شود. مقطع رنگ شده روده نرمال موش در شکل ۴ دیده می شود.

در نمونه شاهد منفی و نرمال روده موش نمای پرزها در لایه سطحی روده کاملاً منظم، لایه ماهیچه ایی و زیرماهیچه ایی و غدد



شکل ۴. مشاهده بافت نرمال روده موش بعنوان شاهد منفی، در شکل (C) غدد روده ایی (GI) کاملاً مشخص است. در شکل (D) لایه منظم ماهیچه ایی (ML) و لایه زیر ماهیچه ایی (SML) کاملاً نرمال قابل مشاهده است.

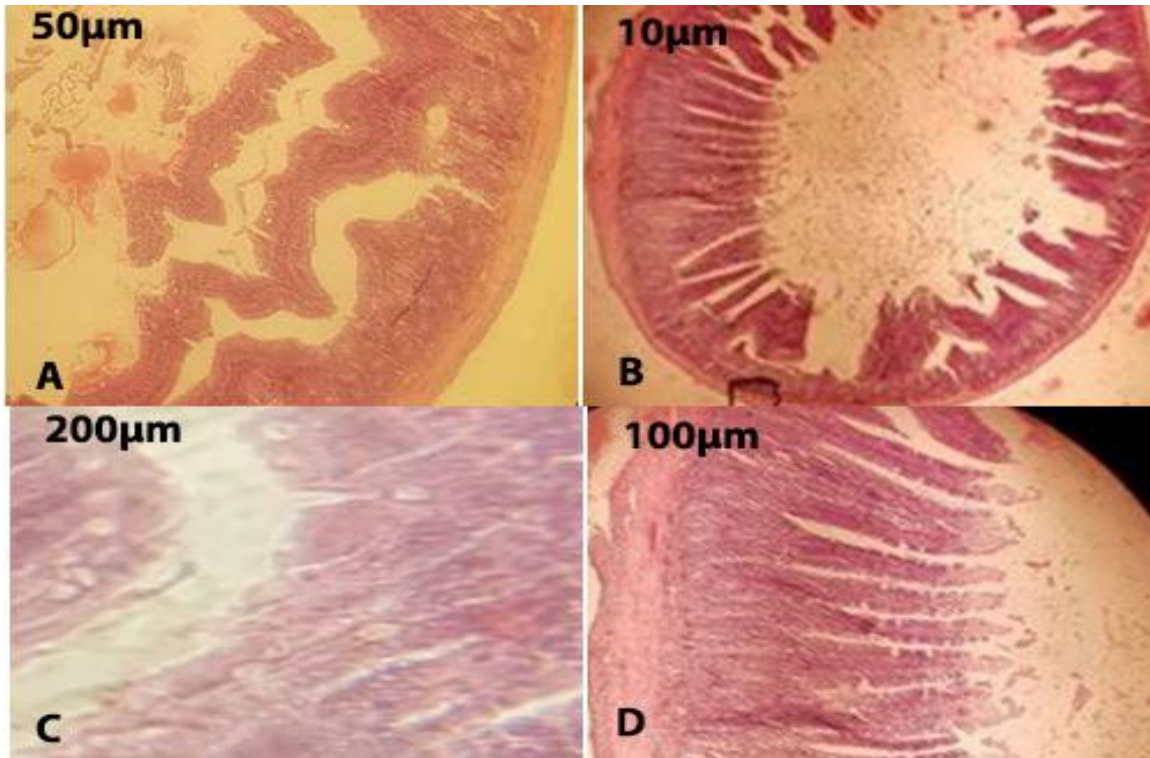
می شود. در شکل ۵ بافت ملتهب روده بعنوان شاهد مثبت دیده می شود. در گروه دریافت کننده شیرین بیان، در مقایسه با گروه شاهد زخم معده، ناحیه موکوس معده کاملاً نرمال دیده می شود و نسبت به گروه شاهد زخم فقط کمی انتشار خون و تراوش خفیف نوتروفیل ها دیده می شود. تاثیر مثبت شیرین بیان بر روی بهبود

در نمونه هیستوپاتولوژیک شاهد مثبت روده، التهابات و ارتشاح لنفوسیت ها در مقطع رنگ شده بافتی کاملاً مشهود است. در کانال های چندگانه پوشش روده افزایش سلول های التهابی مثل نوتروفیل مشاهده می شود. لنفوسیت ها در پرزهای سطحی روده به همراه میکروواکوئل با اندازه ایی متوسط به همراه ادم کاملاً مشاهده

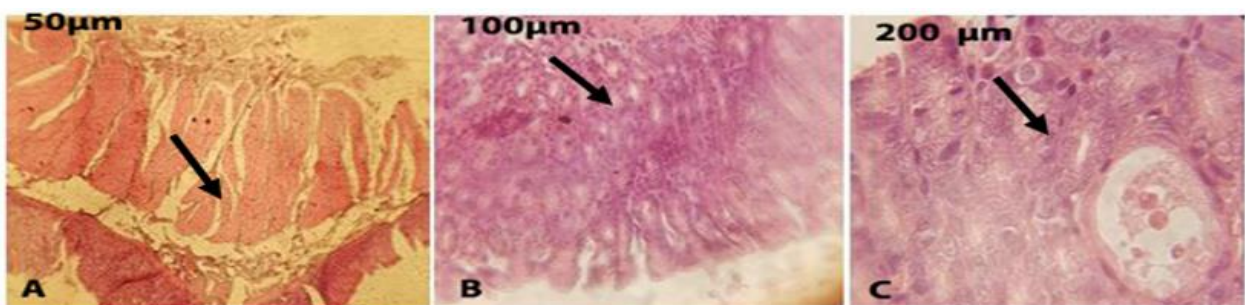


نوک ویلی‌ها قابل مشاهده بود. در شکل ۶ تاثیر شیرین‌بیان بر روی زخم معده و در شکل ۷ تاثیر شیرین‌بیان بر روی زخم روده نشان داده شده است.

کیفیت ضایعات پاتولوژیک هم مشاهده شد، اما نسبت به معده تاثیر کمتری داشت و در ناحیه نوک پرزهای روده، در قیاس با نمونه شاهد مثبت، تراکم خون کمتر دیده شد و انتشار سلول‌های التهابی در



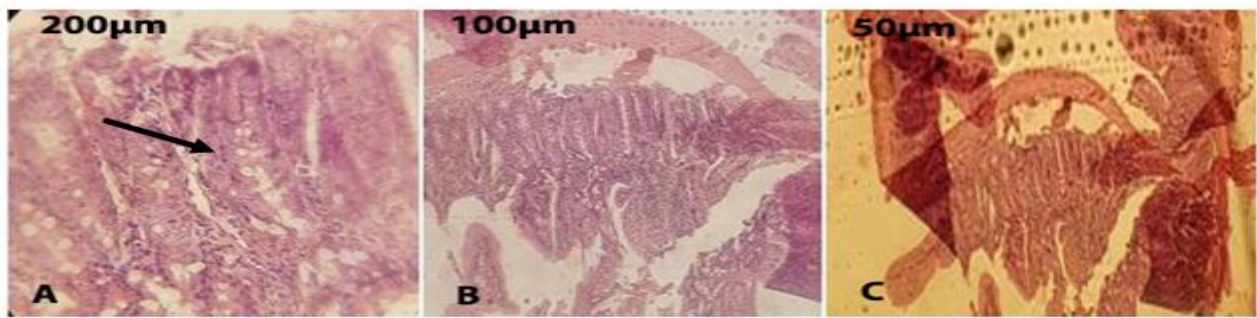
شکل ۵. مشاهده التهابات روده موش یا شاهد مثبت روده تحت تاثیر آسپرین (a) مشاهده حاشیه روده و افزایش التهاب، در شکل (C),(D) التهابات اختصاصی و ترشح لوکوسیت‌ها در کانال‌های چندگانه و مشاهده ادم در سطح سلول‌های پوشش در محل فلش‌ها نشان داده شده است.



شکل ۶. تاثیر شیرین‌بیان بر روی زخم معده. در شکل (b) میزان التهاب نسبت به نمونه شاهد زخم کاهش داشته و ساختار هیستولوژیک کاملاً نرمال دیده می‌شود اما در محل فلش تراوش خفیف سلول‌های نوتروفیل مشاهده می‌شود.

خفیف در نوک پرزهای روده دیده شد که نشانگر تاثیر کمتر شیرین‌بیان بر بافت روده نسبت به تاثیر مناسب آن بر زخم معده است، اما از شدت التهابات در مقایسه با گروه شاهد مثبت روده، بسیار کاسته است.

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود و بر اساس بررسی‌های پاتولوژیک، در گروه دریافت کننده شیرین‌بیان در روده، انتشار خفیف لنفوسیت‌ها در ناحیه زیر مخاطی و مخاطی به همراه نکروز و التهاب



شکل ۷. تاثیر شیرین بیان بر روی زخم روده نشان داده شده است. انتشار سلول‌های خونی در پرزهای روده در محل فلش مشاهده می‌شود و انتشار سلول‌های التهابی در نوک میلی‌ها مشاهده می‌شود.

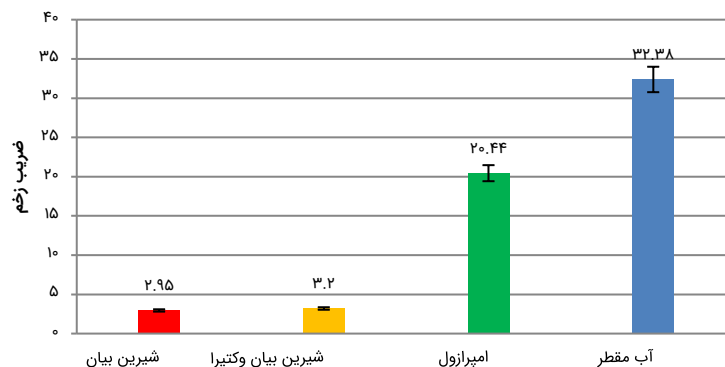
نتایج بررسی ضریب زخم با نتایج پاتولوژیک همخوانی دارد. در بررسی‌های پاتولوژیک در گروه دریافت کننده شیرین بیان در معده، موکوس معده کاملا نرمال مشاهده شد و انتشار خفیف لنفوسیت‌ها و خونریزی کمتری نسبت به گروه شاهد زخم دیده شد که نشانگر تاثیر مثبت شیرین بیان در بهبود زخم می‌باشد. در گروه کنترل مثبت نسبت بهبودی زخم با امپرازول ۶۹ درصد بدست آمد که نسبت به گروه‌های دریافت کننده شیرین بیان و شیرین بیان همراه کتیرا، کمتر ارزیابی شد. ارزیابی مورفومتریک برای سنجش گسترش زخم نشان داد که ضریب زخم در گروه‌های کنترل آب مقطر و امپرازول کاهش کمتری به دو گروه تیمار دیگر دارد. نتایج در جدول ۳ و نمودار ۲ نشان داده شده است. در نمودار ۳ نیز درصد بهبودی زخم در گروه‌های تیمار مقایسه شده است.

بررسی‌های پاتولوژیک و محاسبه ضریب زخم نشان داد که عصاره شیرین بیان ضریب زخم را نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری پایین آورده است. در گروه دریافت کننده شیرین بیان و کتیرا این ضریب زخم پایین تر هم نشان داده شد ( $P < 0.01$ ).

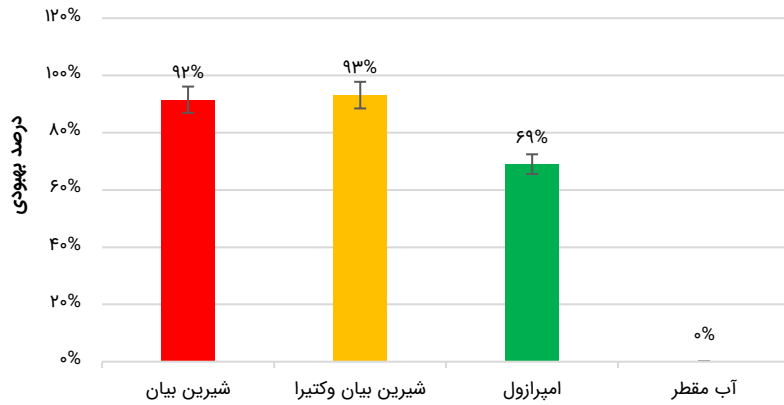
همینطور در گروه دریافت کننده عصاره شیرین بیان، درصد بهبودی زخم نسبت به گروه کنترل منفی (آب مقطر) ۹۱/۵۳ درصد و گروه دریافت کننده امپرازول ۹۰/۲۷ درصد افزایش یافته بود. همچنین در گروه دریافت کننده ترکیب عصاره شیرین بیان و کتیرا تفاوت معنی داری در درصد بهبودی زخم در قیاس با گروه دریافت کننده شیرین بیان به تنهایی دیده نشد در حالیکه تقریبا همان تاثیر را در افزایش درصد بهبودی زخم داشت ( $P > 0.05$ ).

جدول ۳. مقایسه ضریب زخم ماکروسکوپی ناشی از آسیب‌ها در گروه‌های تیمار و نسبت بهبودی زخم

گروه‌ها	ضریب زخم Ulcer Index	نسبت بهبودی در مقابل امپرازول	نسبت بهبودی در برابر آب مقطر
شیرین بیان	۲/۹۵	۹۰/۲۸٪	۹۱/۵۳٪
شیرین بیان و کتیرا	۳/۲	۹۱/۸۵٪	۹۳/۱۲٪
امپرازول (کنترل مثبت)	۲۰/۴۴	-	۶۹٪
آب مقطر (کنترل منفی)	۳۲/۳۸	-	۰



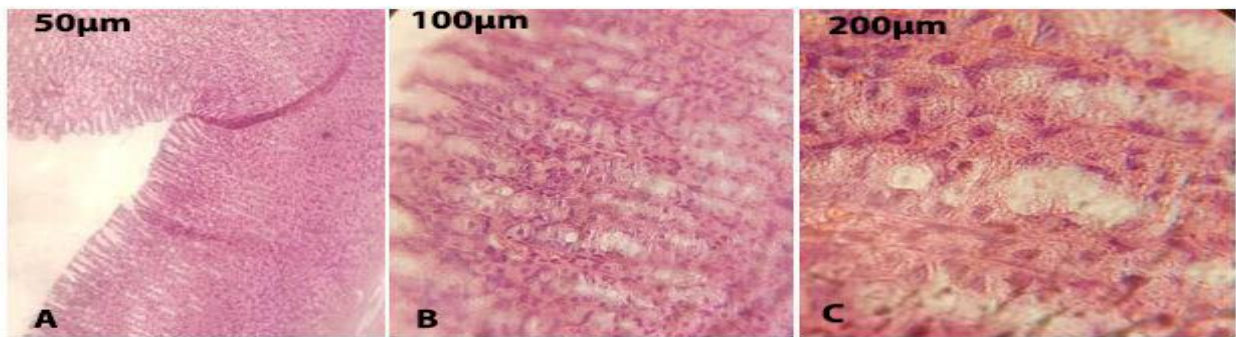
نمودار ۲. نمودار مقایسه ضریب زخم در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه‌های شاهد ( $p < 0.01$ )



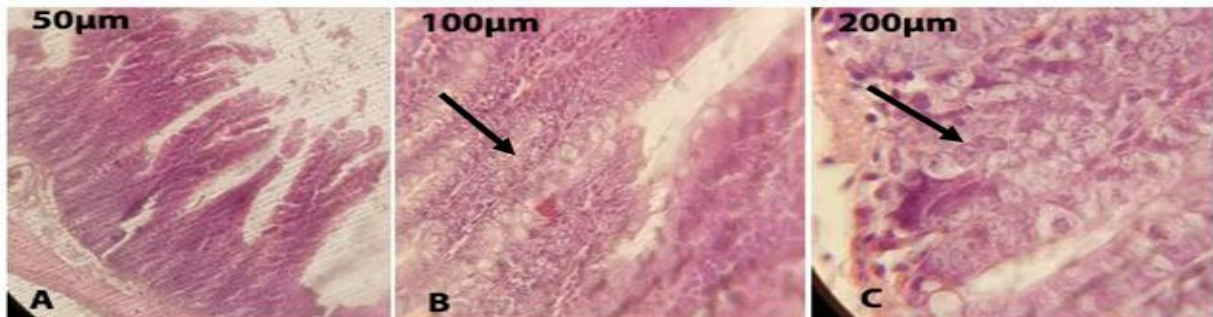
نمودار ۳. نمودار مقایسه درصد بهبودی در گروههای تیمار در مقایسه با گروههای شاهد ( $P < 0.01$ )

ناحیه زیر مخاطی و مخاطی دیده می‌شود که نشانه وجود التهابات بسیار خفیف است، اما در نوک پرزها نکروز خفیف مشاهده می‌شود که در مقایسه با گروه شاهد مثبت، اثر هم افزایی کتیرا و شیرین بیان در بهبود التهابات کاملاً مشهود است. نتایج در شکل ۹ و ۸ نشان داده شده است.

در گروه تیمار شیرین بیان و کتیرا، تغییرات پاتولوژیک در معده کاملاً محو شده و الگوی هیستوپاتولوژیک کاملاً نرمال بوده که اثر هم افزایی کتیرا و شیرین بیان را نشان می‌دهد و در روده تراوش خفیف سلول‌های ایمنی در ناحیه مخاطی و زیر مخاطی دیده می‌شود و التهاب خفیف در نوک ویلی ها مشاهده می‌شود که با افزایش سلول‌های پلی مورفونکلئر همراه است. انتشار خفیف لنفوسیت‌ها در



شکل ۸. تاثیر زخم زدایی شیرین بیان و کتیرا بر روی بافت معده. با توجه به شکل بالا الگوی هیستوپاتولوژی کاملاً نرمال شده است.

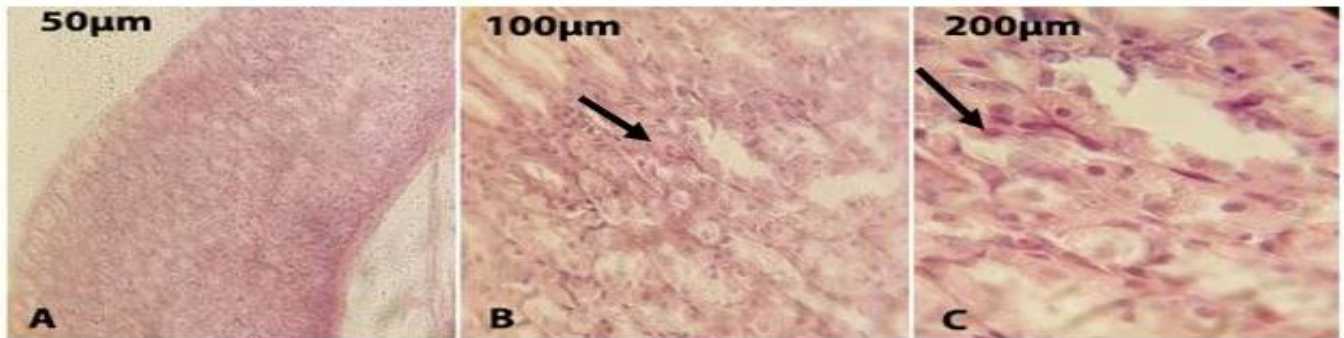


شکل ۹. تاثیر زخم زدایی شیرین بیان و کتیرا بر روی بافت روده. التهاب و نکروز خفیف تعدادی سلول لنفوسیتی (PMN) همچنان بعد از مصرف شیرین بیان و کتیرا در محل تورم ویلی مشاهده می‌شود.

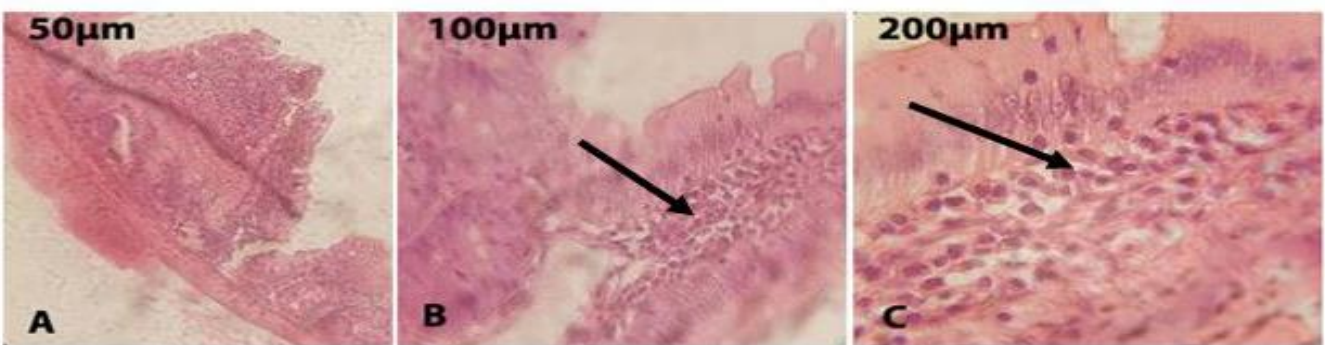


عدم بهبود صد درصد زخم معده با امپرازول است. نتایج تاثیر امپرازول بر روی بافت معده و روده به ترتیب در شکل ۱۰ و ۱۱ نشان داده شده است.

در گروه دریافت کننده امپرازول هیچ تورمی در سلول‌های اپیتلیال دیده نشد و لایه ماهیچه ایی منظم دیده شد، اما لنفوسیت‌ها همچنان در لایه زیر مخاطی دیده می شوند که نشانه



شکل ۱۰. تصویر میکروسکوپی از زخم پاتولوژیک در معده در گروه تیمار با امپرازول (فلش: ارتشاح خفیف لنفوسیتی را نشان می‌دهد که حاکی از عدم بهبود صد درصد در نتیجه تیمار با امپرازول است.)



شکل ۱۱. تصویر میکروسکوپی از زخم پاتولوژیک در روده در گروه تیمار با امپرازول (فلش: ارتشاح زیاد نوتروفیلی همراه با اتساع رگها در پرزهای روده را نشان می‌دهد که حاکی از درصد کاهش بهبود در نتیجه تیمار با امپرازول است.)

## بحث

در پژوهش حاضر بعد از ۷۲ ساعت هیچگونه مرگ و میری پس از تزریق دوزهای مختلف عصاره ایجاد نشد، پس احتمالاً عصاره آبی شیرین بیان حداقل در بازه دوزهای ۱۰ - ۵۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، در هر دو مرحله تست سمیت حاد، کاملاً ایمن و بی خطر است. آزمون ریتینگ به منظور شناسایی مکانیسم‌های محیطی استفاده شده و اسید استیک در این آزمون می‌تواند سبب فعالسازی ترکیبات اندوژنی همانند برادی کینین، سرتونین، هیستامین شود. نتایج حاصله نشان داد که عصاره آبی شیرین بیان مانع انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک شد. بنابراین احتمال دارد، در ایجاد اثر ضدالتهابی و ضد انفیلتراسیون نوتروفیل‌ها، عصاره سبب مهار آزادسازی ترکیبات اندوژن

عصاره آبی گیاه شیرین بیان (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) فعالیت حفاظتی آنتی اولسری در معده و خاصیت ضد التهابی در روده دارد و ضریب زخم را نسبت به دو گروه کنترل منفی (آب مقطر) و کنترل مثبت (امپرازول) به طور معنی داری ( $P < 0/01$ ) کاهش می‌دهد. همچنین درصد بهبودی زخم را نسبت به گروه کنترل مثبت ۹۰/۲۷ درصد و گروه کنترل منفی ۹۱/۵۳ درصد بهبود می‌بخشد. تشخیص سمیت حاد ترکیبات مختلف و ناشناخته از جمله عصاره شیرین بیان، با استفاده از میزان LD50 ارزیابی شد. در واقع LD50 یک شاخص مهم به منظور تشخیص حداقل دوز مجاز به منظور کشتن ۵۰ درصد از حیوانات است (۲۳).



به صورت گاوآژ استفاده شده است و به طور مستقیم با سلول‌های روده و معده مرتبط بوده است. شاید بتوان گفت که در تغییرات بافتی و کاهش اینفلتراسیون سلول‌های التهابی در مکان موثر بوده است که البته نیازمند تحقیقات وسیع‌تری می‌باشد (۱۲).

در بررسی‌های میکروبیولوژی نتایج حاصل در مورد گروهی که شیرین بیان و کتیرا را با هم دریافت کردند، اختلاف معنی‌داری با گروهی که فقط شیرین بیان دریافت کردند، وجود نداشت (۰/۰۵ > P) اما در بررسی‌های پاتولوژیک این اختلاف معنی‌دار بود و این نتیجه بیانگر آن است که همراهی کتیرا با شیرین بیان نه تنها در رفع علائم هیستوپاتولوژیک در معده به طور کامل و در روده تا حدی تاثیرگذار است، بلکه بر طبق مقالات می‌تواند عوارض ناشی از مصرف شیرین بیان مثل افزایش فشار خون را پایین بیاورد که این خصوصیت برتری مصرف شیرین بیان را به جای داروهای شیمیایی حاضر مانند امپرازول راه اثبات می‌نماید (۰/۰۱ < P). البته اثرهم افزایی کتیرا و شیرین بیان، با استفاده از دوزهای مختلف، باید در تحقیقی دیگر بررسی شود.

در تحقیقی Kjayyal و همکاران (۲۰۰۱) به بررسی اثرات عصاره‌های آبی بادرنجوبه، اسبیریس، بابونه، زیره سیاه، نعناع، شیرین بیان، گلپر و خار ماریانلو با هم پرداختند و بر روی فعالیت ضد زخم این عصاره‌ها به صورت ترکیبی در دستگاه گوارش کار کردند. نتایج فعالیت ضد زخم عصاره‌ها از نظر بافت شناسی تایید شد و بررسی‌ها نشان داد که استفاده از چند عصاره با هم بر اساس دوز مصرفی می‌تواند به کاهش میزان اسید و افزایش ترشح موسین، افزایش رهاسازی پروستاگلاندین E2 و کاهش لکوترین‌ها منجر شود. اثر بر محتوی پپسین نسبتاً متغییر بوده و به نظر نمی‌رسید که با فعالیت ضد زخم رابطه داشته باشد. بیشترین تاثیر را عصاره آبی گیاه شیرین بیان و اسبیریس در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن رت در مقایسه با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سایمیتیدین بر روی زخم معده رت نشان داد که با دوز مصرفی عصاره آبی در این تحقیق اختلاف دارد. در این تحقیق از عصاره ترکیبی شیرین بیان و کتیرا با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با داروی امپرازول استفاده شده است. اختلاف میزان دوز مصرفی در این تحقیق و مطالعه فوق نشان می‌دهد که بر اساس نوع مواد موثره موجود در هر گیاه حتی با کارایی یکسان، دوز مصرفی متفاوت است و اثر سینرژیک عصاره‌های گیاهی بر اساس دوز آنها بسیار متفاوت است و حتی عوارض احتمالی مصرف

(متابولیت‌های اسید آراشیدونیک) شده و اثرات تسکینی آن با مکانیسم‌های محیطی حمایت می‌شود (۲۳، ۲۵).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره آبی ریشه گیاه شیرین بیان با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، قادر به کاهش التهاب القا شده توسط آزمون کاراگینان و آزمون ریتینگ می‌باشد که اثر ضد التهابی آن قابل مقایسه با دگزامتازون نبوده است. گیاه شیرین بیان دارای ترکیبات گلیسرین، لیکوریسیدین، ساپونین، گلیسرینیک اسید، آتوکسی گلیسرینیک، اسید لاکتیک است که در توافق با منابع حاضر احتمال داده می‌شود که ماده فنولی به نام گلیسرین که از ترکیبات اصلی گیاه شیرین بیان می‌باشد بر روی التهاب ناشی از زخم معده در موش‌های صحرایی اثر مثبت داشته و موجب درمان نسبی آن گردیده است (۱۸). این امر احتمالاً از تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مذکور صورت گرفته است که از طریق مهار پروتئین کیناز C و فسفولیپاز A و فسفودی استراز و نیز عوامل التهابی دیگر مثل پروستاگلاندین و هیستامین سبب کاهش التهاب شده است (۱۶، ۲۵).

عواملی همچون اولسرهای معده وروده طی مکانیسم‌هایی سبب افزایش کلسیم و رادیکال آزاد می‌گردد و طی فرایندی منجر به آزاد شدن اسید آراشیدونیک شده و آنزیم سیکلوآکسیژناز موجب تبدیل آن به پیش ساز پروستاگلاندین می‌شود و این عوامل موجب التهاب می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره اتانولی شیرین بیان باعث مهار التهاب در آزمون رایتینگ و کاراگینان می‌گردد، اما تحقیقات بیشتری برای تعیین مکانیسم‌های دقیق اثر آن‌ها و مسیرهای احتمالی عملکرد ضد التهابی لازم است و با توجه به خواص ذکر شده به همگان استفاده از شیرین بیان توصیه می‌شود (۲۳، ۲۴).

در تحقیق Jalilzadeh و همکاران (۲۰۱۵) عصاره الکلی شیرین بیان با دوز (۱۵۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) توانست اثرات آنتی‌اولسری بر روی زخم معده را نشان دهد که با دوز مصرفی در این تحقیق اختلاف دارد. البته نتایج این تحقیق با نتایج بررسی حاضر در ارتباط با درصد بهبودی زخم همخوانی دارد اما بدلیل استفاده از عصاره اتانولی در تحقیق Jalilzadeh در زمینه میزان کاهش اثرات التهابی با نتایج این تحقیق اختلاف دارد، زیرا در این تحقیق از عصاره آبی استفاده شده و احتمال تاثیر اتانول بعنوان یک پارامتر مجزا بر روی کاهش میزان التهاب می‌توانسته تاثیر گذار باشد. از طرفی استفاده از دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به صورت تزریق صفاقی بوده است ولی در این تحقیق دوز مصرفی

در تحقیق Jia T و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که فلاونوئیدی دیگری به نام لیکوریسیدین در ریشه گیاه شیرین بیان وجود دارد که اثرات ضد التهابی در استئوآرتریت کندروسیت‌ها ایجاد می‌کند، طی این تغییرات اینترلوکین 1 بتا، توسط لیکوریسیدین تحریک شده و موجب مهار پروستاگلاندین و نیتریک اکساید می‌گردد. سپس از مسیر Nrf2 که یک پروتئین پایه‌ای لوسیونی و فاکتور رونویسی در انسان است و توسط ژن *nfe2l2* کدگذاری می‌شود با مهار ترکیبات اکسیدانی از تولید الکترون آزاد و افزایش کلسیم خارج سلولی و طی آن پدیده التهاب جلوگیری می‌کنند. لیکوریسیدین یک آنتی‌اکسیدان ضداسپاسم و ضد التهاب است که در ریشه شیرین بیان یافت می‌شود. نتایج این تحقیق بر روی التهاب کندروسیت‌ها نشان دهنده اثر مهارى بود و در این تحقیق نیز استفاده از عصاره شیرین بیان در معده انتشار خفیف لنفوسیت‌ها و خونریزی را نسبت به گروه شاهد کاهش داد که نشانگر تاثیر مثبت شیرین بیان در بهبود زخم بود. استفاده از شیرین بیان و کتیرا، تغییرات پاتولوژی را کاملا محو کرده و الگوی هیستوپاتولوژی کاملا نرمال را نشان دادند که نسبت به نتایج تحقیق Jia T اثر هم افزایی شیرین بیان و کتیرا را به وضوح نشان می‌دهد (۲۰).

### نتیجه‌گیری

اگر چه اثر آنتی اولسری عصاره شیرین بیان را می‌توان به ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گیاه مربوط دانست، با توجه به مطالعات اندک، مکانیسم دقیق آن هنوز ناشناخته است. افزایش رادیکال‌های آزاد در نتیجه مصرف آسپرین و تاثیر ویتامین C در کاهش آنها و تاثیر حفاظتی فلاونوئیدها، استرگول و ایزوفلاوون‌ها از طریق تقویت سد مخاطی از مواردی است که اثر محافظتی این گیاه را در مقابل زخم زای آسپرین در معده و کاهش التهابات ناشی از آسپرین در روده، افزایش می‌دهد.

ارزان بودن، بومی بودن و در دسترس بودن این گیاهان از فاکتورهای مهمی است که محققان را به استفاده از گیاهان دارویی در درمان عفونت‌ها سوق می‌دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره آبی شیرین بیان، نشانگر موثر بودن شیرین بیان در بهبود زخم معده و تاثیر نسبی در بهبود زخم روده می‌باشد. هم‌افزایی کتیرا و شیرین بیان، تغییرات پاتولوژی را کاملا محو کرده و الگوی هیستوپاتولوژی نرمال در معده و نسبتا نرمال در روده را ایجاد کرد. در مطالعات آتی با شناسایی دقیق ماده موثره شیرین بیان، کتیرا و تعیین مکانیسم‌های دقیق بهبود دهنده اثر آنها در درمان عفونت‌های

عصاره‌ها به صورت ترکیبی بر اساس دوز تغییر می‌نماید که نیازمند تحقیقات وسیع در آزمایشگاه می‌باشد (۱۰).

در مطالعه Nafeeza و همکاران (۲۰۰۲) آسپرین در ایجاد زخم پوشش معده بسیار موثر بود و تاثیر بر روی بافت روده نداشت اما در این مطالعه طبق نتایج بدست آمده تغییرات بافتی در بافت روده هم اتفاق افتاد که شدت بروز آن نسبت به معده کمتر بوده است و در تصاویر پاتولوژی، گزارش گردید. همچنین میزان التهابات، کاهش داشت اما شیرین بیان همچنان در روده ضریب زخم را کاهش و درصد بهبودی را افزایش داده است (۰/۱) <math>p</math>. نتایج مطالعه Nafeeza با تحقیق حاضر تفاوت دارد (۱۳).

اتیولوژی زخم معده هنوز مورد بحث است، اما عدم تعادل بین فاکتورهای مهاجم و مکانیسم‌های دفاع مخاطی معده مطرح می‌باشد. روزانه تعداد افراد زیادی از قرص‌های NSAIDs برای تسکین مشکلات گوارشی بالاخص درد معده استفاده می‌کنند و مطالعات اخیر نشان می‌دهد بین مصرف این قرص‌ها و بروز ضایعات گوارشی ارتباط وجود دارد که مرتبط با رها شدن رادیکال‌های آزاد است (۱۴).

برخی از گیاهان دارویی می‌توانند بر عملکرد دستگاه گوارشی تاثیر مثبت داشته باشند. بر طبق برخی از تحقیقات، گیاهانی مثل شیرین بیان با مهار اسید، افزایش تولید موکوس، تثبیت سلول‌های پوششی سطحی و با تداخل در تولید پروستاگلاندین‌ها در ممانعت از ایجاد زخم و تاثیر در بهبود زخم موثر هستند (۱۵).

همچنین Ramirez و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که عصاره استخراج شده برخی از گیاهان که ترکیبات مشابهی با شیرین بیان دارد، اثر آنتی اولسری بر زخم معده دارد که نتایج حاصل شده در این تحقیق هم این مسئله را تایید می‌کند، البته تاثیر شیرین بیان در روده فقط در حد کاهش التهابات می‌باشد و بهبود کامل در ضایعات روده حاصل نشده است (۱۶).

گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* از تیره سبزی آسها است و با توجه به ترکیبات موثر که در ریزوم این گیاه وجود دارد، خواص آنتی اولسری شناخته شده دارد. این ترکیبات از فلاونوئیدها، ایزوفلاوون‌ها، هیدروکسی‌کومارین‌ها، مشتقات کومستان، استروئیدها و روغن‌های فراری مثل استراگول و هگزانوئیک اسید تشکیل شده و آنتی‌اکسیدان فراوانی دارند. در بررسی‌های Nolan و همکاران (۲۰۰۵) اثر حفاظتی فلاونوئیدها بر بهبود آثار زخم در پوشش معده از نظر پاتولوژی نشان داده شد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۷).

## منابع مالی

تامین منابع مالی این تحقیق به طور کامل بعهده نویسندگان بوده است.

## تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

## Referance

- Khanahmadi M, Naghdi Badi H, Akhondzadeh S, Khalighi - Sigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S, Hajiaghade R. A Review on Medicinal Plant of *Glycyrrhiza glabra* L. *J Med Plants*. 2013; 2(46):1-12.
- Khoshnam SE, Farzaneh M, Valipour M, Bahaoddini A, Valipour A. Review of the phytochemical, pharmacological and physiological properties of Licorice (*Glycyrrhizaglabra*). *J Clin Excel*. 2015; 4(1): 56-71.
- Kazemi A, Nowrozi H, Oral vitamin E effect on Aspirin-induced gastric ulcers by oral and parenteral administration in rats. *J Urmia Univ Med Sci*. 2015; 26(7): 542-549.
- 6 (4) :237-244. 5- Mesut S, Thaer H, Betul O. Comparative effectiveness of *Glycyrrhiza glabra* vs.omeprazole and misoprostol for the treatment of aspirin-induced gastric ulcers. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 2009
- Shahabi Nezhad M, Rahmani MR, Khaksari Hadad M, Sepehri GH.R, Mahmoudi M, Karim Ghasemi E. The Effect of Licorice Root Extract on Blood Sugar Level in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Rafsanjan Univ. Med. Sci*. 2007; 6
- (4) :237-244. 5- Mesut S, Thaer H, Betul O. Comparative effectiveness of *Glycyrrhiza glabra* vs.omeprazole and misoprostol for the treatment of aspirin-induced gastric ulcers. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 2009; 3(12):615-620.
- Nugroho AE, Wijayanti A, Mutmainah M, Susilowati R, Rahmawati N. Gastroprotective Effect of Combination of Hot Water Extracts of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*), Pulasari Stem Bark (*Alyxia reinwardtii*), and Sembung Leaf (*Blumea balsamifera*) Against Aspirin-Induced Gastric Ulcer Model Rats. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016; 21(4):77-84. [DOI:10.1177/2156587216637469] [PMID]
- Farzaneh N, Faraz M, Mehran H-R, Kowsar B. Large scale screening of commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease activity. *DARU J. Pharm. Sci*. 2012; 20(72):2-9. [DOI:10.1186/2008-2231-20-72] [PMID] [PMCID]
- Khoshnam SE, Farzaneh M, Bahaoddini AA, Savary F, Shabani S. Evaluation of the Interactive Effects of *Glycyrrhiza Glabra* Hydroalcoholic Extract and LNAME Drug on Blood Pressure and Heart Rate of Male Rats. *J Babol Univ Med Sci*. 2016; 18(6):59-65. 9- Byron C, Kenneth W M. Gastrointestinal ulcers, the role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnosis, and treatment. *J Multidiscip Healthcare*. 2014; 7: 137-146.
- Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Kenawy SA, Seif-el-Nasr M, Mahran LG, Kafafi YA, Okpanyi SN. *Arzneimittelforschung*. Effect of Some Gastrointestinally Acting Plant Extracts and their Combination. 2001; 51(7): 545-553. [DOI:10.1055/s-0031-1300078] [PMID]
- Jiang H, Paul K, Whelton, MD, Brian V, Michael J, Klag MD, Aspirin and Risk of Hemorrhagic Stroke, A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *JAMA*. 1998; 280(22):1930-1935. [DOI:10.1001/jama.280.22.1930] [PMID]
- Jalilzadeh-amin Gh, Najarnezhad V, Anassori E, Mostafavi M, Keshipour H. Antiulcer properties of *Glycyrrhiza glabra* L. extract on experimental models of gastric ulcer in mice. *Iran J Pharm Res*. 2015;14(4): 1163-1170.
- Nafeeza MI, Fauzee AM, Kamiah J, Gapor MT. Comparative effects of a tocotrienol-rich fraction and tocopherol in aspirin-induced gastric lesions in rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition banner. Asia Pac J Clin Nutr*. 2002;11(4): 309-313. [DOI:10.1046/j.1440-6047.2002.00298.x] [PMID]
- Langman MJ, Weil J, Wainwright P, Lawson DH, Rawlins MD, Logan RF, Murphy M, Vessey MP, Colin-Jones DG. Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*.

- 1994; 343( 8905) : 1075-1078. [[DOI:10.1016/S0140-6736\(94\)90185-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90185-6)]
15. Bafna PA, Balaraman R. Anti-ulcer and anti-oxidant activity of Pepticare, a herbomineral formulation. *Phytomedicine*. 2005;12(4):264-270. [[DOI:10.1016/j.phymed.2003.12.009](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.009)] [[PMID](#)]
16. Ramirez RO, Roa CC Jr. The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/ethanol-induced gastric mucosal injury in Sprague-Dawley rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003;29(3-4):253-61.
17. Linda LN, Ronald GN. Future of Natural Products from Plants in the Struggle with Emerging Diseases: Case of Food-Borne Pathogens and Leishmaniasis. *J Herbs Spices Med Plants*. 2005;11(1-2):161-190. [[DOI:10.1300/J044v11n01\\_06](https://doi.org/10.1300/J044v11n01_06)]
18. McAlindon ME, Muller AF, Filipowicz B, Hawkey CJ. Effect of allopurinol, sulphasalazine, and vitamin C on aspirin-induced gastroduodenal injury in human volunteers. *Gut*. 1996;38(4): 518-524. [[DOI:10.1136/gut.38.4.518](https://doi.org/10.1136/gut.38.4.518)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
19. Ghayedi N, Bahaoddini A, Khoshnam SE, Gholampour F, Khosravi AR, Moein MR. Evaluation of the effect of hydro-alcoholic extract of *Glycyrrhiza Glabra* rhizome on the isolated colon contractions of male rats. *J of University Sadoughi Shahid of Medical Sciences*. 2016;24(7):576-586.
20. Jia T, Qiao J, Guan D, Chen T. Anti-inflammatory effects of licochalcone a on il-1 $\beta$ -stimulated human osteoarthritis chondrocytes. *J. Inflammation*. 2017;40(6): 1894-1902. [[DOI:10.1007/s10753-017-0630-5](https://doi.org/10.1007/s10753-017-0630-5)] [[PMID](#)]
21. Lorke DA. New approach to acute toxicity testing. *Archives of Toxicol*. 1983; 54 (4): 275 - 87. [[DOI:10.1007/BF01234480](https://doi.org/10.1007/BF01234480)] [[PMID](#)]
22. Golshani Y, Mohammadi S. Antinociceptive and Acute Toxicity Effects of *Erigeron acer* L. In Adult Male Rats. 2016;16(62):1393-96.
23. Bentley GA, Newton SH, Starr J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *British J. Pharmacol*. 1981; 73: 325 - 32. [[DOI:10.1111/j.1476-5381.1981.tb10425.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1981.tb10425.x)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
24. Sharifi Soltani M, Eidi A, Haeri Rouhani SA. Anti-Inflammatory Effect of *Glycyrrhizaglabra* Ethanolic Extract. In Adult Male NMRI Mice. 1397;11(3):15-25.
25. Larypoor M, Bayat M, Zuhair MH, Akhavan Sepahy A, Amanlou M. Evaluation of The Number of CD4+ CD25+ FoxP3+ Treg Cells in Normal Mice Exposed to AFB1 and Treated with Aged Garlic Extract. *Cell journal*. 2013;15(1):37-44.