مجله رویکردهای نوین در تحقیقات علوم پایه، فنی و مهندسی
سال اول، شماره ۱، دی ۱۳۹۷
ISSN: ۲٦٤٥-٥٤٣٩
www.jonarbset.ir

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی متانولی در گیاهان درمنه(*Artemisia*) و کلپوره (*Teucrium polium*) روی هلیکوباکتر پیلوری

مریم گنجعلی ، رقیه قلی زاده دوران محله ، قاسم بلوچ ریگی نسب ، محمد حسین حبیب الهی

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری پاتوژنی که می تواند در قسمت آنتروم معده در انسان کلونیزه شده و باعث گاستریت، زخم پپتیک و حتی سرطان معده شود. هدف از انجام این پژوهش، بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاهان درمنه و کلپوره بر روی هلیکوباکتر های جداسازی شده از بیماران با علایم بیماری دیس پپسی بود.

مواد و روش ها: ۱۴۶ نمونه جمع آوری شده از بیماران با علایم دیس پپسی با انجام تست های بیوشیمیایی از لحاظ آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری بررسی شدند و جداسازی و خالص سازی باکتری ها در محیط کلمبیا آگار در شرایط بی هوازی صورت گرفت. سپس عصاره گیری از گیاهان درمنه و کلپوره در حلال متانول ۹۶ درصد انجام شد. MIC و MBC هلیکوباکتر پیلوری نسبت به عصاره گیاهان ارزیابی شد و حساسیت میکروبی ۶ آنتی بیوتیک منتخب به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: عصاره درمنه نسبت به عصاره کلپوره بر رشد هلیکوباکتر پیلوری ها اثر مهاری قابل توجهی را نشان داد. حساسیت باکتری ها و مقایسه آنها با جدول استاندارد آنتی بیوگرام (CLSI) به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، تتراسیکلین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین به ترتیب ۲۸ درصد، ۲۵ درصد،۱۵ درصد و ۱۰ درصد می باشد.

نتیجه گیری: بررسی ها نشان داد که هلیکوباکتر پیلوری های جدا شده بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین و کمترین حساسیت را نسبت به سیپروفلوکساسین داشته و عصاره درمنه اثر بازدارندگی مناسبی بر رشد این باکتری ها از خود نشان داد ولی در مورد عصاره کلپوره این تاثیر قابل ملاحظه نبود.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، آنتی بیوتیک، عصاره درمنه، عصاره کلپوره، اثرات ضد میکروبی.

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری مارپیچی شکل گرم منفی است که میکروآئروفیلیک بوده و می تواند به طور شایع در قسمت های عمیق موکوس مخاط معده یا بین لایه موکوسی و اپی تلیوم معده کلونیزه شود. این باکتری توانایی مقاومت در برابر اسید معده را دارد و شیوع آن در سراسر جهان یکسان نیست و به استاندارد کیفیت زندگی (*QOL*[1]) در یک منطقه بستگی دارد. روش های تشخیصی مهاجم و غیر مهاجم برای تعیین عفونت هلیکوباکتر پیلوری استفاده می شود، از روش های تهاجمی می توان به اندوسکپی، بیوپسی، تست اوره آز و کشت دادن باکتری اشاره کرد و از تست های غیر تهاجمی می توان به تشخیص آنتی بادی در خون و تست تنفسی اوره اشاره نمود (Nowrozi et al., ۲۰۱۰ و Bazzoli et al., ۲۰۰۲) دیس پپسی اصطلاحی است که به احساس ناراحتی حمله ای یا دائم در قسمت فوقانی شکم با منشاء دستگاه فوقانی گوارش اطلاق می گردد. دیس پپسی علامت شایعی است و می تواند توسط عوامل مختلفی مثل بیماری زخم پپتیک اعم از زخم معده یا اثنی عشر، ریفلاکس معده - مری و بدخیمی و آلودگی به باکتری هلیکوباکتر پیلوری و مصرف بعضی از داروها مثل داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی و اثرات بعضی از بیماری ها مثل دیابت و افسردگی ایجاد شود. در بررسی این بیماران اکثراً ضایعه خاصی در قسمت فوقانی گوارش دیده نمی شود که این حالت دیس پپسی عملکردی می گویند و عارضه مهم این بیماری خونریزی معده است. در آلودگی معده به میکروب هلیکوباکتر پیلوری که علت اصلی این بیماری است، درمان اصلی، از بین بردن این میکروب است (Bazzoli et al., ۲۰۰۲ و Chamanrokh et al., ۲۰۱۷).

گیاهان دارویی به طور گسترده در تمامی مناطق جهان مورد استفاده قرار می گیرند. از آن جایی که این گیاهان تقریبا فاقد عوارض جانبی هستند هم اکنون مورد استقبال فراوان قرار گرفته اند. گیاهان یکی از مهم ترین منابع طبیعی محسوب می شوند آنها علاوه بر تامین مواد غذایی فیبر، چوب، بسیاری از ترکیبات شیمیایی مثل روغن ها، فلاونوئیدها، رنگ ها و ترکیبات دارویی از جمله آلکالوئیدها را فراهم می کنند. در سال های اخیر تحقیقاتی متعددی در زمینه ی اثر بازدارندگی مواد طبیعی در برابر میکروارگانیسم ها صورت گرفته است با توجه به خواص ضد میکروبی که در عصاره بعضی گیاهان وجود دارد می توان از این فرآورده ها به عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی بیوتیک ها استفاده نمود ([Chamanrokh et al., ۲۰۱۷ و Shirazi et al., ۲۰۰۳ و Mahbobi et al., ۲۰۰۹). در هیچ زمانی توجه به گیاهان دارویی و اثرات و کاربردهای آنها کاملا قطع نشده است. پیدایش گونه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و هم چنین پیشرفت علم داروسازی، سنتز داروهای شیمیایی و کاربرد وسیع آنها در درمان و وجود مشکل پیچیده ای به نام اثرات جانبی داروهای شیمیایی، موجب شده که تحقیقات مستمر در مورد یافتن داروهای ضد میکروبی جدید از منابع طبیعی یک نیاز اساسی به حساب آید (Muqtatdar et al., ۲۰۱۳ و Saeidi et al., ۲۰۱۷)گیاه کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* برای درمان روماتیسم، تشنج، التهاب کاربرد دارد و دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی می باشد که در رفع سردرد، ضعف عمل دستگاه گوارش موثر است (Mashayekhi et al., ۲۰۱۴). گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia* به واسطه بلوک کانال های کلسیم دارای اثرات آنتی اسپاسمودیک بوده و به گشاد کردن برونش ها کمک می کند. اسانس درمنه دارای خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی می باشد و هم چنین رشد باکتری های مسبب بوی نامطبوع عرق را مهار می کند (Saeidi et al., ۲۰۱۷ و Allahtavakoli et al., ۲۰۱۲). از یک طرف با توجه به شایع بودن عفونت ها و بیماری های مرتبط با معده که عامل بیشتر این بیماری ها باکتری هلیکوباکتر پیلوری می باشد و از طرف دیگر با توجه به مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به داروهای شیمیایی این باکتری، استفاده از گیاهان دارویی در درمان و پیشگیری از عفونت های ناشی از این باکتری مورد توجه می باشد. گیاهان درمنه وکلپوره از جمله گیاهان دارویی بومی ایران به خصوص استان سیستان و بلوچستان و کشورهای آسیایی است و استفاده از این گیاهان در طب سنتی برای درمان عفونت های معده توصیه شده ولی تا به امروز تحقیق علمی مدونی در زمینه تاثیرات آنها بر روی باکتری مذکور صورت نگرفته است. در کنار درمان گیاهی استفاده از انواع داروهای کنترل کننده اسید معده نیز

[1] Quality of life

اهمیت دارند. در روش های تعیین حساسیت میکروبی برای حصول نتیجه مناسب باید میزان تلقیح، pH، محیط کشت، حرارت و غیره را رعایت کرد. با توجه به نتایج آزمایش های مشخص شده در خارج از بدن، هلیکوباکتر پیلوری به انواع مختلفی از عوامل ضد میکروبی از جمله پنی سیلین ها، ماکرولیدها، نیتروایمیدازول ، کینولون ها و برخی از سفالوسپورین ها حساس است. این عوامل ضد میکروبی که در خارج از بدن عالی به نظر می رسند و به علت عدم فعالیت دارو، pH اسیدی معده، مقاومت سریع و ناتوانی برای رسیدن به همه ارگانیسم ها در جایگاه خاص درون بدن، عدم انتشار مناسب دارو کارآیی لازم را ندارند. در حال حاضر استاندارد طلایی درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری درمان سه گانه شامل تجویز نمک بیسموت، مترونیدازول و یک آنتی بیوتیک که اغلب آموکسی سیلین است می باشد.هم چنین پژوهش های انجام شده توسط طالبی بزمین آبادی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داد که مقاومت باکتری های هلیکوباکتر به مترونیدازول، آموکسی سیلین، کلاریترومایسین، تتراسیکلین، فورازولیدون و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۷۱ درصد، ۳۵ درصد، ۲۵ درصد، ۹ درصد، ۲۴ درصد و ۲۵ درصد تعیین شد و مقاومت چند دارویی (مترنیدازول، آموکسی سیلین، کلاریترومایسین) ۵ درصد تعیین گردید (Talebi BezminAbadi et al., ۲۰۰۹، Fattahi et al., ۲۰۱۳و Shafaghi et al., ۲۰۱۴).

شیرازی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ به بررسی تاثیر عصاره های گیاهی شیرین بیان، مریم گلی، مورد، بومادران، کاسنی، نارنج، افسنطین، اسپند، گل پر و شیطان زیتون بر روی هلیکوباکتر پیلوری پرداختند آنها با بررسی عصاره های گیاهی بر روی هلیکوباکتر پیلوری های جداسازی شده از نمونه های بیوپسی شده از بیماران مبتلا به گاستریت های مزمن و حاد و یا مشکوک به ناراحتی های گوارشی و حساس به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین، نشان دادند که عصاره های شیرین بیان، مریم گلی، افسنطین و شیطان زیتون بر رشد این باکتری اثر مهار کننده داشته ولی سایر عصاره های گیاهی اثر مهار کننده قابل توجهی نداشتند (Shirazi et al., ۲۰۰۳). مقتدر و همکارانش در سال ۲۰۱۳ به بررسی اثر ضد باکتری عطر مایه گیاه کلپوره بر روی باکتری های بیماری زای انسانی پرداختند (Muqtatdar et al., ۲۰۱۳) عزت نوری زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های نعناع، شیرین بیان، پونه، بابونه و آویشن بر هلیکوباکتر پیلوری پرداختند(Nourizadeh et al., ۲۰۰۴) . هدف از این مطالعه بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های مختلف هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران نسبت به آنتی بیوتیک های متداول تتراسیکلین، جنتامایسین، پنی سیلین، سیپروفلوکسازین و تعیین مقاومت ترین گونه ها نسبت به آن ها و سپس بررسی MIC[۲] و MBC[۳] عصاره گیاهی دو گونه درمنه و کلپوره بر روی این گونه های باکتریایی مقاوم بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری

در این پژوهش ۱۰۰ نمونه از افراد مراجعه کننده به متخصص گوارش کلینیک گوارش بیمارستان امام علی (ع) با علایم دیس پپسی و مشکوک به آلودگی باکتریایی از مهر تا خرداد ۱۳۹۵ جمع آوری شد، به این صورت که افراد مشکوک آندوسکوپی شده و در صورت مشاهده زخم پپتیک، از محل زخم های معده و دئودنوم بیوپسی تهیه و نمونه گیری ها انجام شد.

ب) جداسازی و کشت هلیکوباکتر پیلوری ها از نمونه ها

از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده از بین بیماران با علایم دیس پپسی، سوزش معده و زخم معده در آزمایشگاه بیمارستان امام علی (ع) زاهدان، تعداد ۳۹ گونه هلیکوباکتر پیلوری (۱ تا ۳۹ نامگذاری شدند) جدا شدند. نمونه های بیوپسی در محیط انتقالی

[۲] Minimum Inhibitory Concentration

[۳] Minimum Bactericidal Concentration

استورات[۴] به آزمایشگاه انتقال یافتند. پس از یکنواخت کردن[۵] نمونه ها و کشت آن ها بر روی محیط کشت کلمبیا آگار[۶] (حاوی ۰/۲ درصد نشاسته، ۱۰ درصد خون استریل، ۵ میلی گرم بر لیتر آمفوتریپسین B، ۱۰ میلی گرم بر لیتر تری متوپریم، ۱۰ میلی گرم بر لیتر وانکومایسین و ۰/۳ میلی گرم بر لیتر پلی میکسینB) در شرایط میکروآئروفیلیک (۱۱-۱۰٪ گاز کربنیک) و رطوبت بالای ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷-۵ روز باکتری ها رشد و با کشت چهار مرحله ای جداسازی شدند. باکتری های خالص شده با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست اوره آز، کاتالاز، اکسیداز مثبت و آزمایش عدم تولید H۲S در محیط TSI آگار و آزمایش عدم تولید اندول در محیط SIM آگار و مقاومت به نالیدیکسیک اسید شناسایی شدند.

ج) بررسی اثر ضد باکتریایی آنتی بیوتیک ها

از هر کلنی هلیکوباکتر پیلوری کشت خالص تهیه و سپس با حل کردن آنها در سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. از هر سوسپانسیون باکتری بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه و دیسک گذاری دیسک های استاندارد حاوی تتراسیکلین (۳۰µg/disc)، جنتامایسین (۱۰µg/disc)، پنی سیلین (۱۰µg/disc)، سیپروفلوکسازین (۵µg/disc) انجام شد. دیسک های حاوی متانول تبخیر شده به عنوان شاهد منفی بر روی سطح محیط قرار داده شدند. پلیت ها به مدت ۳ تا ۴ روز در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد با رطوبت بالا قرار داده گرفتند و میانگین قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری شدند.

د) تهیه عصاره های درمنه و کلپوره

برای تهیه عصاره های گیاهی درمنه و کلپوره مقدار ۶۰ گرم از برگ خشک شده این گیاهان را به طور جداگانه به صورت پودر در ۳۰۰ میلی لیتر حلال متشکل از ۵۰ درصد اتانول (۹۶ درصد) مخلوط کرده، و مخلوط حاصل را هم زده و لوله های آزمایش به مدت ۲ ساعت در بن ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد گذاشته شدند. پس از گذشت ۲ ساعت عصاره ها توسط کاغذ صافی واتمن فیلتر شد و سپس اتانول توسط دستگاه روتاتوری از عصاره خارج گردید به طوری که محلول نهایی باقی مانده برابر ۱۰۰ میلی لیتر حاصل شد. این محلول به عنوان غلظت ۱۰۰ درصد عصاره در نظر گرفته شد، برای استریل کردن مجدد آن از فیلتر استریل میلی پور استفاده گردید و در نهایت عصاره تهیه شده از گیاهان درمنه و کلپوره تا زمان استفاده فریز شدند.

ه) تعیین MIC و MBC عصاره های درمنه وکلپوره بر روی نمونه های باکتریایی جداسازی شده

آزمایش حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) عصاره های آبی متانولی با استفاده از روش رقت سازی در محیط مولر هینتون براث برای ۴ گونه از مقاوم ترین گونه های هلیکوباکترپیلوری (۱۴، ۳۱، ۳۴، ۳۷) انجام شد. برای تعیین MIC هر عصاره (کلپوره و درمنه) و هر گونه باکتریایی مقاوم از یک سری ۱۲ تایی از لوله های آزمایش استفاده شد. ۹ لوله برای آزمایش رقت های مختلف عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (حاوی عصاره رقیق شده به علاوه محیط کشت) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (حاوی سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط کشت) و هم چنین یک لوله حاوی اتانول، سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت جهت اطمینان از رشد باکتری ها در این محیط استفاده شد.

---

[۴] Stuart medium

[۵] Hemogenization

[۶] Columbia Agar

آزمایش MIC در لوله های آزمایش استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد. ابتدا از محیط کشت مولر هینتون براث، ۱۰ میلی لیتر در همه لوله های آزمایش ریخته شد. به اولین لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر مولر هینتون براث ۱۰ میلی لیتر از هر دو عصاره درمنه و کلپوره به صورت جداگانه اضافه گردید، سپس ۱۰ میلی لیتر از لوله اول برداشته و در لوله دوم ریخته و ۱۰ میلی لیتر از لوله دوم برداشته و به لوله سوم ریخته و این کار را تا لوله ۹ ادامه داده شد و از لوله شماره ۹ ،۱۰ میلی لیتر برداشته و بیرون ریخته شد که در نهایت رقت عصاره ها در هر لوله نصف رقت لوله قبلی شد. سپس ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی هر باکتری مقاوم که معادل نیم مک فارلند شده بود، به تمام لوله ها به استثنای لوله ۱۰ هر ردیف از لوله ها اضافه شد. لوله شماره ۱۰ هر ردیف به عنوان شاهد عصاره (کنترل منفی)، که فقط حاوی محیط کشت و عصاره درمنه و کلپوره بود. لوله شماره ۱۱ هر ردیف، به عنوان شاهد باکتری (کنترل مثبت) برای تعیین کدورت باکتری حاوی محیط کشت، عصاره درمنه و کلپوره و باکتری هلیکوباکترپیلوری بود. سپس همه لوله ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت لوله ها به صورت چشمی مشاهده شد، برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد، از همه لوله هایی که در آنها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونه برداری و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره ها (MIC)، به روش سطحی کشت داده شد. بدین منظور ۱ میلی لیتر از لوله هایی که عدم رشد باکتری را نشان می دادند برروی محیط کشت کلمبیا کشت داده شدند، بعد از انکوبه کردن به مدت ۲۴ساعت، پلیت های کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شدند. لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و توانسته بود ۹۹/۹٪ باکتری ها را بکشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شدند.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده ، تعداد ۳۹ مورد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری شناخته شدند و کشت و خالص سازی باکتری ها انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حساسیت این سه روش در تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری تقریبا یکسان بوده یعنی در تمامی موارد واکنش اوره آز مثبت با مشاهده باکتری در گسترش لام و کشت ارگانیسم همراه بود. حساسیت باکتری ها و مقایسه آنها با جدول استاندارد آنتی بیوگرام (CLSI) به آنتی بیوتیک های پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و تتراسیکلین به ترتیب ۲۸ درصد، ۲۵ درصد،۱۵ درصد و ۱۰ درصد می باشد.

قطر هاله های عدم رشد بر حسب میلی متر در جدول ۱ آمده است.

جدول۱: میانگین قطر هاله عدم رشد هلیکوباکترپیلوری بر حسب میلی متر

Table ۱: The mean diameter of the Helicobacter pylori inhibition zone in millimeters

گونه ها	میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر			
	جنتامایسین(۱۰mg/disc)	پنی سیلین (۱۰mg/disc)	تتراسیکلین(۳۰mg/disc)	سیپروفلوکسازین(۵mg/disc)
۱	۱۴	۱۲/۵	۱۴	۱۱
۲	۱۱	۱۰/۵	۱۵/۵	۱۴
۳	۱۲	۹/۵	۱۳	۱۰
۴	۱۹/۵	۳۱	۲۰/۸	۲۱

۵	۱۶	۹/۵	۱۶	۱۵
۶	۱۰/۵	۱۰	۱۷	۱۴
۷	۱۳	۷/۵	۱۲/۴	۱۱/۵
۸	۱۵	۱۶	۱۶/۸	۱۵
۹	۲۰	۱۶	۸	۱۶
۱۰	۱۸	۱۱/۵	۱۹/۵	۲۲/۵
۱۱	۲۰/۵	۱۶	۱۸	۱۵/۹
۱۲	۱۹	۳۰	۱۵/۵	۱۸
۱۳	۱۳	۲۹	۱۸/۲	۱۱
۱۴	۹	۱۰/۵	۱۱	۹
۱۵	۱۳	۱۴	۱۹/۷	۱۱
۱۶	۱۰	۲۵	۱۸/۵	۱۲/۵
۱۷	۱۵	۲۹/۳	۱۹/۵	۲۲
۱۸	۱۲	۱۸	۲۰	۱۰
۱۹	۱۲/۵	۳۳	۱۲/۵	۱۶/۷
۲۰	۸/۵	۳۱	۱۹	۱۲
۲۱	۷	۲۷	۱۴/۵	۱۴/۹
۲۲	۹	۲۴/۸	۱۲	۱۸
۲۳	۱۰	۳۶/۷	۲۱/۲	۲۱/۴
۲۴	۱۲	۲۳	۱۴	۲۰
۲۵	۱۴	۱۷	۱۹/۵	۱۷
۲۶	۱۳	۱۴	۲۰	۱۵
۲۷	۱۷	۲۸	۱۸	۱۶
۲۸	۱۲	۲۰	۱۹	۱۰
۲۹	۱۶	۱۵	۱۸	۱۰/۸
۳۰	۱۷/۵	۲۵	۱۸/۵	۱۳
۳۱	۱۰	۹/۴	۱۴/۸	۱۲/۲
۳۲	۸	۱۱	۱۸	۹/۵
۳۳	۱۳	۲۳	۱۶	۲۱
۳۴	۸/۷	۹/۸	۹/۳	۸/۸
۳۵	۸/۵	۱۵/۵	۱۲	۱۷
۳۶	۱۰	۲۶	۱۸/۵	۱۸/۸
۳۷	۶	۹	۹/۸	۸/۲
۳۸	۱۱	۱۶	۱۴	۱۰
۳۹	۹	۱۷/۹	۱۵/۵	۱۶

حداقل غلظت بازدارندگی(MIC)

در آزمایشات رقت سازی در لوله حداقل غلظت بازدارندگی عصاره ها تعیین شد. روش رقت سازی در لوله برای تعیین خواص ضد میکروبی روش دقیق و بسیار حساس می باشد و تاکنون برای تعیین ارزیابی خواص ضدمیکروبی عصاره های گیاهی استفاده شده است. حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظتی از عصاره است که می تواند به میزان ۹۰ درصد از رشد باکتری ها

جلوگیری کند نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی باکتریایی عصاره آبی متانولی درمنه در جدول ۲ گزارش شده است. حداقل غلظتی از عصاره ها که موجب جلوگیری از رشد ۹۰ درصد از باکتری ها شدند در غلظت ۰/۰۱۵۶ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره آبی متانولی درمنه بود. در حالی که عصاره آبی متانولی کلپوره هیچ اثری روی رشد هلیکوباکترپیلوری از خود نشان نداد.

جدول۲: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد عصاره آبی متانولی درمنه علیه چهار باکتری جدا شده هلیکوباکترپیلوری با روش رقت در آگار

گونه ها	غلظت عصاره درمنه بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر										
	۰(شاهد)	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۷۸	۰/۰۱۵۶	۰/۰۳۱۲	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵
۱۴	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
۳۱	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
۳۴	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
۳۷	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–

حداقل غلظت کشندگی باکتریایی(MBC)

حداقل غلظت کشندگی باکتریایی، حداقل غلظتی از عصاره است که باعث جلوگیری از رشد ۹۹/۹درصد از باکتری ها می شود. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی باکتریایی عصاره آبی متانولی درمنه در جدول ۳ گزارش شده است. لوله هایی که در MIC کدورت نداشتند مقدار ۱ میلی لیتر از هر محلول حاوی باکتری برداشته روی محیط کشت کلمبیا آگار کشت دادیم، عصاره آبی متانولی درمنه تاثیر بیش تری روی کشندگی باکتریایی را نشان داد در حالی که عصاره آبی متانولی کلپوره تاثیر چندانی را نشان نداد. بالاترین غلظتMBC مربوط به عصاره درمنه علیه باکتری هلیکوباکترپیلوری ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. پایین ترین غلظت MBC عصاره درمنه علیه باکتری هلیکوباکترپیلوری ۰/۰۳۱۲میلی گرم بر میلی لیتر بود.

در مورد عصاره کلپوره تاثیر کشندگی روی باکتری ها نشان نداد.(فاقد MBC)

جدول۳: حداقل غلظت کشندگی باکتری در عصاره آبی متانولی درمنه علیه چهار باکتری جدا شده هلیکوباکترپیلوری با روش رقت در آگار

گونه ها	غلظت عصاره درمنه بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر										
	۰(شاهد)	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۷۸	۰/۰۱۵۶	۰/۰۳۱۲	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵
۱۴	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
۳۱	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
۳۴	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
۳۷	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–

بحث و نتیجه گیری

هلیکوباکتر پیلوری یک عامل مهم در ایجاد گاستریت مزمن و زخم معده و اثنی عشر محسوب می شود.به دلیل افزایش شیوع عفونت در جوامع مختلف و با توجه به روند افزایشی مقاومت به آنتی بیوتیک ها، یافتن منابع جدید دارویی برای مقابله با این عامل اهمیت زیادی دارد. در طی تحقیق شیرازی و همکارانش از محیط کشت کلمبیا آگار استفاده شد (Shirazi et al., ۲۰۰۳). در طی تحقیق طالبی بزمین آبادی و همکارانش از محیط کشت مولر هینتون آگار غنی شده با ۷ درصد خون دفیبرینه استفاده شد که نشان دهنده این است که هلیکوباکتر پیلوری برای رشد نیاز به محیط غنی شده دارد (Talebi). BezminAbadie et al., ۲۰۰۹ در این مطالعه محیط کشت مورد استفاده کلمبیا آگار بوده که به محیط کشت ۰/۲ درصد نشاسته، ۰/۱ درصد عصاره مخمر، ۰/۱ درصد سیستئین، ۱۰ درصد خون استریل و ۱۰ درصد سرم اسب استریل به عنوان مکمل اضافه شد. علاوه بر مکمل های فوق جهت حذف آلودگی توسط سایر باکتری ها به محیط های کشت غلظت های متفاوتی از آنتی بیوتیک ها افزوده شد. اثر پلی میکسینB در حذف آلودگی سودوموناس آئروژینوزا که بیشترین گونه آلوده کننده محیط کشت هلیکوباکتر پیلوری است بسیار موثر بود. افزودن نشاسته به محیط های کشت حاوی خون گوسفند و سرم اسب در فقدان حضور سایر مکمل ها در رشد باکتری موثر نبود اما با افزودن دو مکمل دیگر یعنی سیستئین و عصاره مخمر به محیط های فوق افزایش تعداد و رشد باکتری مشاهده گردید.

شیرازی و همکارانش در سال ۲۰۰۳ به این صورت عصاره گیری کردند که ۱۰۰گرم از پودر خشک هر گیاه را در کمی متانول خیسانده و داخل کیسه پارچه ای مخصوص ریخته و داخل سوکسله قرار دادند. به بالن متصل به سوکسله ۲۰۰ml متانول خالص افزودند و به بالن حرارت دادند، این عمل تا زمان بی رنگ شدن حلال خروجی ادامه یافت. سپس عصاره ها را صاف کرده و با دستگاه تقطیر در خلا دوار تا حد امکان تغلیظ شدند(Shirazi et al ۲۰۰۳).

عزت نوری زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۳ به این صورت عصاره گیری کردند که ۱۰ گرم از پودر خشک و آسیاب شده نعناع، پونه، بابونه و آویشن را درآب و ۱۰ گرم را در اتانول مخلوط کردند محلول های حاصله را در انکوبه با دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار دادند، بعد از ۲۴ ساعت، مایع رویی را استخراج و فیلتر کردند و توسط دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ کردند، نمونه های تغلیظ شده را روی شیشه ساعت قرار دادند و در آون ۴۰ درجه سانتی گراد با تبخیر حلال رسوب خشک شده هر یک از حلال ها بدست آمد (Nourizadeh et al., ۲۰۰۴).

محبوبه نخعی مقدم در سال ۲۰۱۰ به این صورت عصاره گیری کردند که، برای تهیه عصاره دانه های جعفری از متانول خالص و روش پرکولاسیون استفاده کردند. با کمک دستگاه تقطیر دوار، حلال عصاره را حذف کردند تا عصاره غلیظ شود. سپس با استفاده از فور، دمای۴۵ درجه سانتی گراد ، حلال به طور کامل حذف شد تا عصاره به نسبتاً خشک به دست آید. برای نگه داری و ذخیره سازی عصاره از دمای ۴ درجه سانتی گراد ۴ یخچال استفاده کردند (Nakhaei et al., ۲۰۱۰).

در این پژوهش عصاره گیری با استفاده از برگ خشک شده گیاهان درمنه و کلپوره در حلال ۵۰ درصد اتانول ۹۶ درصد تهیه گردید و در پایان اتانول توسط دستگاه روتاتور از عصاره های گیاهی خارج و محلول نهایی برابر ۱۰۰ میلی لیتر حاصل شد.

عزت نوری زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثر نعناع، شیرین بیان، پونه، بابونه و آویشن بر روی هلیکوباکتر پیلوری پرداختند. آنها نشان دادند که عصاره نعناع بیشترین اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری را داشته و بعد از آن به ترتیب شیرین بیان، پونه، بابونه و آویشن قرار داشتند (Nourizadeh et al., ۲۰۰۴). هم چنین آنها در پژوهشی دیگر در سال ۱۹۷۰ به بررسی اثر گیاهان شیرین بیان و آویشن بر رشد هلیکوباکتر پیلوری پرداخته و نشان داده بودند که عصاره اتری گیاهان مورد بررسی، فاقد اثر ضد میکروبی بوده، ولی عصاره های الکلی و آبی دارای اثرات ضد باکتریایی می باشد و از نظر اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری، عصاره شیرین بیان بیشترین اثر را داشت (Nourizadeh et al., ۱۹۷۰). تاباک و همکارانش در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که عصاره آبی آویشن و عصاره الکلی دارچین دارای اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری بوده و هم چنین آنها مشخص کردند که اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری آویشن بیش تر است (Tabak et al., ۱۹۹۶). هیل و همکارانش در سال ۲۰۰۰ اثر ضد باکتریایی پودر سیر و روغن سیر روی هلیکوباکتر پیلوری را مشخص کردند (Hill et al., ۲۰۰۰). اسلامی و همکارانش در

سال ۲۰۱۳ در بررسی اثرضد باکتریایی گیاه دارچین بر روی هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به دیسپپسی نشان دادند که گیاه دارچین میتواند یکی از گیاهان موثر درپاکسازی باکتری هلیکوباکترپیلوری باشد(Eslami et al ۲۰۱۳).

محبوبه نخعی مقدم در سال ۲۰۱۰ در بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی دانه جعفری علیه جدایه های بالینی هلیکوباکتر پیلوری در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که عصاره متانولی دانه جعفری رشد هلیکوباکتر پیلوری را در شرایط آزمایشگاهی مهار می کند (Nakhaei et al., ۲۰۱۰).

در طی تحقیق دیگر محبوبه نخعی مقدم و همکارانش در سال ۲۰۰۶ روی بررسی اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره های آبی و متانولی زیره سبز و ترخون در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که عصاره های آبی و متانولی ترخون و زیره سبز، رشد این باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار می کنند (Nakhaei et al., ۲۰۰۶).

نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که گیاه درمنه اثر ضد میکروبی روی هلیکوباکتر پیلوری داشته ولی گیاه کلپوره اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر روی هلیکوباکتر پیلوری از خود نشان نداد. بنابراین با توجه به اثر ضد میکروبی گیاه درمنه، مصرف مداوم این گیاهان در طب سنتی می تواند برای درمان عفونت های گوارشی موثر باشد و با توجه به عوارض جانبی مصرف آنتی بیوتیک ها می توان این گیاه را به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های گوارشی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری پیشنهاد کرد.

شیرازی و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در تست حساسیت میکروبی هلیکوباکتر پیلوری نشان دادند که گونه های این باکتری به جنتامایسین، تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین حساس بودن و حساسیت آنها نسبت به مترونیدازول به میزان اندک را نشان دادند(Shirazi et al ۲۰۰۳). در مطالعه طالبی بزمین آبادی در سال ۲۰۰۹ در تست حساسیت میکروبی هلیکوباکتر پیلوری نشان دادند که گونه های هلیکوباکتر پیلوری نسبت به مترونیدازول بیشترین حساسیت را داشته و نسبت به تتراسیکلین کمترین حساسیت را نشان دادند (Talebi BezminAbadi et al ۲۰۰۹).

در این پژوهش نتایج حاصله نشان داد که نمونه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران نسبت به جنتامایسین بیشترین حساسیت و نسبت به سیپروفلوکسازین کمترین حساسیت را دارند بنابراین گونه های هلیکوباکتر پیلوری جداسازی شده از بیماران نسبت به سیپروفلوکسازین مقاومت داروئی پیدا کرده اند و این مقاومت ها می تواند در آینده نزدیک نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها نیز ادامه یابد بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده استفاده از عصاره های گیاهی مانند عصاره های آبی و الکلی درمنه می تواند راه کاری در جهت کاهش استفاده از آنتی بیوتیک ها باشد. البته قبل از استفاده از گیاهان دارویی بررسی و اثبات تاثیر آنها در شرایط *in vitro* از اهمیت ویژه ای برخوردار است تا گیاهان دارای قابلیت ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر روی نمونه های عفونی هلیکوباکتر پیلوری مشخص و سپس در شرایط *in vivo* مطالعات تکمیلی انجام گیرد و غلظت های موثر این گیاهان بر باکتری مورد نظر و اثرات جانبی آنها در این غلظت ها مورد ارزیابی قرار گیرد و از عصاره این گیاهان به عنوان یک داروی ضد میکروبی در دنیای پزشکی، داروسازی و میکروبیولوژی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه سرکار خانم نصرت گنجعلی رئیس محترم باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد زاهدان و نیز مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان کمال تشکر را دارند.

منابع

۱- Nowrozi J, Golmohamadi Ghadikolaii M, Hosaini F, Agah S, Khaleghi S. Anti-microbial Effect of Nanoparticles on Non-*Helicobacter Pylori* Urease Positive Bacteria Isolated from Peptic Ulcer Patients. Journal of Microbial World. ۲۰۱۰; ۳(۲):۱۰۱-۸.

۲- Bazzoli F, De Luca L, Pozzato P, Zagari RM, Fossi S, Ricciardiello L, Nicolini G, Berretti D, and Roda E. *Helicobacter pylori* and functional dyspepsia: review of previous studies and commentary on new data. Gut. ۲۰۰۲; ۵۰(٤): ۳۳-۳۵.

۳- Chamanrokh P, Shah Hosseini MH, Mazaheri Asadi M, Nejad Sattari T, Esmaeili D. Assessment of the survival rate of non-cultivable forms of *Helicobacter pylori* in water samples. Journal of Microbial World. ۲۰۱۷; ۹(٤):۳۳۷-٤٥.

٤- Shirazi MH, Fazeli MR, Sultan Dallal MM, Eshraghi S, Jamalifar H, Alamulhoda E. A comparative study on the Antimicrobial Effect of some Medicinal Herbal Extracts and Selective Antibiotics against the clinical Isolates of *Helicobactor pylori*. jmpir. ۲۰۰۳; ۳(۷):٥۳-٦۰.

٥- Mahbobi, M. Ghazian Bidgoli, F. "Investigating the chemical composition and antimicrobial properties of essence *Artmisia aucheri* Boiss". Journal of Research in Iranian Herbs and Medicinal Herbs, ۲۰۰۹; ۲٥(۳): ٤۲۹-٤٤۰.

٦- Muqtatdar, M. Salari, H. "Investigating the Antibacterial Effect of *Tartarum* on the Human Pulmonary Bacteria". Journal of Iranian Microbiology, ۲۰۱۳; ۷(۲): ۱-۷.

۷- Saeidi P, Ketabchi S, Rowshan V. Assessment of chemical compositions and antibacterial activity of the extract and essential oil of *Artemisia aucheri* collected from Iran. Journal of Microbial World. ۲۰۱۷; ۹(٤):۳٤٦-٥٤.

۸- Mashayekhi N, Baniassadipoor H, Essmaeili M, Ayoobi F, Rezazadeh H, Hakimi E, Negahban T and Alahtavakoli M. Protective effect of hydro alcoholic extract of *Teucrium polium* on Mercuric chloride-induced nephrotoxicity. Shahrekord-University-of-Medical-Sciences. ۲۰۱٤; ۱٥(٦):۱۷٥-۹.

۹- Allahtavakoli M, Moradi R,Shamsi S, Afsharmanesh K. "Effect of hydro-alcoholic extract of *Teucrium Polium* on castor oil-induced diarrhea in male rat". Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS), ۲۰۱۲, ۱٤(۱): ۱.

۱۰- Talebi BezminAbadi A, Mohabati Mobarez A, Ajami AG, Rafiee A, Taghwaii T. Evaluation on antibiotic resistance of *helicobacter pylori* isolated from patients admitted to tooba medical center, Sari. J-Mazand-Univ-Med-Sci. ۲۰۰۹; ۱۹(۷۰):۲٦-۳۲.

۱۱- Fattahi E, Somi MH, Ghamkhar AR, Ghavidel A, Fakhrjo A, Fattahi S, and Naghashi N. Comparison of *Helicobacter Pylori* Eradication using Quadruple Regimens in Dyspeptic Patients. ZUMSJournal. ۲۰۱۳; ۲۱(۸٦):۱-۱۱.

۱۲- Shafaghi A, Naghipour MR, Haghani S, Amir Maafi A, Rouhi Rad M. Survey on the Eradication of *Helicobacter pylori* Infection in Quadruple Therapy:Amoxicillin, Bismuth, Omeprazole and Clarithromycin. gums-med. ۲۰۱٤;۲۳(۹۱):٦۱-۷.

۱۳- Nourizadeh, E, Mirzapour T, Ghasemi K, Razavi SM, Latifi NS. "Antibacterial effect of mint extract, licorice, pomegranate, chamomile and thyme on *Helicobacter pylori*", Daneshvar Medical journal, ۲۰۰٤; ۱۱(٥۲): ٦۷-۷۰.

۱٤- Nourizadeh E, Ghasemi Garmi K, Shafaghiasl SK, Maloofi N. Comparison of the effect of water and ethanol extracts of turmeric and cinnamon on the in vitro growth of *Helicobacter pylori*. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. ۱۹۷۰; ۱۲(۳):۱۷-۲۱.

۱٥- Tabak M, Armon R, Potasman I, Neeman I. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. J appl Bacteriol ۱۹۹٦; ۸۰(٦):٦٦۷-۷۲.

۱٦- Hill DJ, O'gara EA, Maslin DJ. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Appl Environ Microbiol ۲۰۰۰; ٦٦(٥): ۲۲٦۹-۷۳.

۱۷- Nakhaei M, In vitro anti-bacterial activity of methanolic extract of *Apium petroselinum* L. seed against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. ournal of Shahed University ۲۰۱۰; ۸۷(۱۷).

۱۸-Eslami G, Evaluation of bacterial effect of cinnamon on isolated helicobacter pylori Patients with dyspepsia. (Journal of Research in School of Medicine) Shaheed Beheshti University of Medical Sciences۲۰۱۳;۳۷(۲):۸٥-۸۹.

۱۹- Nakhaei M, Ramazani M, KHage karamodini M, Malekzadeh F, In vitro anti-bacterial activity of aqueous methanolic extract of *Cuminum cyminum L* and *Artemisia dracunculus L* clinical isolates of Helicobacter pylori. Iranian Journal of Basic Sciences ۲۰۰٦; ۳(۹).

Studying Antibiotic susceptibility and evaluating of antimicrobial activity of aqueous methanol extract of *Artemisia* and *Teucrium polium* on *Helicobacter pylori*

Abstract

Background & Objective: *Helicobacter Pylori* is a pathogen that can colonize the human gastric antrum and cause Gastric, Ulcers and even gastric cancer. The aim of this study was to evaluate antibiotic resistance and antimicrobial activity of *Artemisia* and *Teucrium polium* extract on isolated *H. pylori* from patients with symptoms of dyspepsia.

Material & Methods: ۱۴۶ samples collected from patients with dyspepsia symptoms were assessed for *H. pylori* infection with biochemical tests, then isolation and purification of bacteria were performed in Columbia agar under anaerobic conditions. Extraction of *Artemisia* and *Teucrium polium* plants were done at ۹۶٪ methanol solution. MIC and MBC of *H. pylori* were evaluated for extract of plants and the microbial susceptibility of ۶ antibiotics was determined by disk diffusion method.

Results: *Artemisia* extract showed a significant inhibitory effect on the growth of *H. pylori* to *Teucrium polium* extract. Sensitivity of the bacteria and comparing them with the standard antibiogram table (CLSI), to Gentamicin, Tetracycline, penicillin, Ciprofloxacin antibiotics are ۲۸٪, ۲۵٪, ۱۵٪, ۱۰٪, respectively.

Conclusion: Studies show that isolated *H. pylori* had maximum sensitivity to Gentamicin antibiotics and minimum sensitivity to Ciprofloxacin. *Artemisia* extract showed a good inhibitory effect on the growth of these bacteria, however, this effect was not significant in the case of *Teucrium polium* extract.

Keyword: *Helicobacter pylori*, Antibiotics, *Artemisia* extract, *Teucrium polium* extract, Antimicrobial effects