

# اثرات ضد باکتریایی عصاره های زردچوبه، زنجبیل، میخک و بر هلیکوباکتر پیلوری

دکتر محمد حسین دهقان، عزت نوری زاده

**چکیده و هدف:** هلیکوباکتر پیلوری، بعنوان یک عامل مهم در ایجاد گاستریت مزمن، زخم معده و اثنی عشر محسوب می شود همچنین احتمال می رود که در ایجاد آدنوکارسینومای دیستال معده نیز نقش داشته عفونت ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری می تواند به زخمهای مزمن معده و اثنی عشر منجر شود که عواقب وخیم تر آن به شکل آتروفی و متاپلازی معده ای در بافتها ظاهر می گردد. افزایش روز افزون مقاومت دارویی هلیکوباکتر پیلوری به آنتی بیوتیکهای رایج، هدف مطالعه را طراحی نمود، بطوری که تأثیر چهار گونه از گیاهان افزودنی در مواد غذایی از نظر خاصیت ضد باکتریایی بر علیه ده سویه هلیکو باکتر پیلوری مورد بررسی قرار گرفت.

**روش کار:** گیاهانی که بر علیه ده سویه هلیکوباکتر پیلوری انتخاب شدند شامل زردچوبه، زنجبیل، میخک و هل بودند. عصاره های اتری، الکی و آبی با روش انتشار در آگار بر روی هلیکوباکتر پیلوری های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان شریعتی تهران مورد بررسی قرار گرفت.

از بین عصاره های آبی حاصل از گیاهان مورد مطالعه از نظر اثر ضد باکتریایی، عصاره زرد چوبه بیشترین اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری را داشت (میانگین قطر هاله عدم رشد / ) . بعد از آن به ترتیب زنجبیل، میخک و هل قرار داشتند. در میان عصاره های الکی، عصاره زنجبیل با میانگین / میلی متر اثر بخش بوده و پس از آن زردچوبه و میخک دارای فعالیت ضد باکتریایی بودند. از عصاره های اتری زنجبیل، زردچوبه، میخک و هل دارای خواص ضد هلیکوباکتر پیلوری بودند (میانگین قطر هاله عدم رشد به ترتیب / . . . . ) .

**نتیجه گیری:** با توجه به اینکه عصاره های آبی، الکی و اتری مربوط به زردچوبه، دارای فعالیت ضد باکتریایی بالاتری می باشد، شناسایی ماده موثر این گیاه به عنوان یک ترکیب موثر ضد میکروبی گام بعدی در این راستا محسوب شده و شناسایی اثرات ضد میکروبی دیگر گیاهان افزودنی در مواد غذایی امری ضروری به نظر می رسد.

**کلمات کلیدی:** هلیکوباکتر پیلوری، ضدباکتریایی، زرد چوبه، زنجبیل، میخک، هل

- (مولف مسئول): استادیار بیوشیمی پزشکی دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
- مربی میکروبیولوژی دانشگاه محقق اردبیلی
- کارشناس ارشد میکروبیولوژی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

در همه بیماران و عود بیماری در بیماران درمان شده، همراه با مقاومت دارویی روز افزون این باکتری، موجب گشته تا تحقیقات در زمینه یافتن داروهای جدید ادامه یابد. مهمترین مطالعاتی که در این زمینه می بایست صورت گیرد اثرات ضد هلیکو باکتر پیلوری گیاهان و مواد افزودنی غذایی است که به علت کمبود اثرات سوء بر روی بافتها مورد توجه خاص قرار گ اند. عصاره آبی آویشن و عصاره الکی دارچین دارای اثر ضد هلیکو باکتر پیلوری می باشد بطوریکه حتی نشان داده شده اثر ضد هلیکو باکتر پیلوری آویشن بدلیل جلوگیری از فعالیت اوره آز بیشتر از دارچین می [ ] . سیر از جمله گیاهانی بشمار می رود که فعالیت ضد هلیکو باکتر پیلوری آن مورد مطالعات زیادی قرار گرفته ازجمله پودر و روغن آن بطوریکه پتانسیل فعالیت ترکیبات مختلف موجود در این گیاه نشان داده شده است [ ] .

فعالیت ضد میکروبی افزودنی های مواد غذا مانند زرد چوبه و دارچین که به وفور مورد استفاده مردم جهان بخصوص شرقی ها قرار می گیرد، همواره مورد توجه بوده است. فعالیت ضد باکتریایی روغن زرد چوبه برروی خیلی از باکتری ها منجمله ایشرشیا کلی مورد بررسی قرار گرفته است [ ] . و همچنین توانایی مهار میکرو کوكوس لوتئوس توسط زنجبیل مورد مطالعه بوده است [ ] . با توجه به این نکته مهم که می توان از مواد غذایی که بر روی هلیکوباکتریپیلوری اثر ضد باکتریایی دارند در جهت درمان و کاهش آلودگی و انتقال این باکتری استفاده نمود. مطالعه عصاره های مختلف گیاهان و افزودنی های غذایی و همچنین تعیین ماده مؤثره آنها از جمله مواردی هستند که می بایست مورد توجه قرار گیرند.

در اواخر سال وارن و مارشال رابطه بین زمن و حضور هلیکوباکتر پیلوری را به اثبات رساندند. این باکتری در قشر موكوس مخاط معده و همچنین در مخاط تغییر یافته و شبیه به مخاط معده که در اثنی عشر مشهود است، میتواند حضور داشته همچنین این باکتری توانایی کلونیزه شدن در مری بارت را داشته و ممکن است در ایجاد زخم یا التهاب بارت نقش داشته باشد [ - ] .

یکی از ویژگیهای مهم این باکتری تولید مقدار فراوان آنزیم اوره آز است. مشخص شده که اوره آز یک عامل ویرولانسی مهم در باکتری است که می تواند در کلانیزه شدن باکتری در موكوس معده و صدمه و ایجاد زخم معده نقش داشته [ و ] . آمونیاک تولید شده توسط اوره آز باکتری قادر است چسبندگی باکتری را به سلولهای مخاط آنتر معده افزایش دهد و موجب تضعیف اتصالات بین سلولی گردد.

یکی دیگر از ویژگیهای مهم باکتری، تولید VacA میباشد که یک توکسین ایجاد کننده واکوئول می باشد. پروتئین VacA که دربروز بیماریهای مرتبط با هلیکوباکتر پیلوری دارد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است و نقش آن رادر ایجاد زخم معده و آدنوکارسینومای دیستال معده مهم ارزیابی می کنند. امپرازول میکرونایزد (Omprazole Micronized) ده پمپ پروتونی است که توانایی مهار واکوئولاسیون ایجادشده توسط VacA روی سلولهای Vero دارد [ و ] .

برای ریشه کن کردن هلیکوباکترپیلوری، از رژیمهای درمانی دو دارویی، سه دارویی و یا چهار دارویی استفاده می شود. موفق نبودن درمانها در حذف کامل عفونت

## مواد و روش ها

الف) سویه ها و شرایط رشد: نمونه بیوپسی از بیماران مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان شریعتی تهران گرفته شد. این نمونه ها از بیماران مبتلا به زخم معده و اثنی عشر، گاستریت و سرطان معده جدا شده بودند. نمونه ها در داخل محط ترانسپورت آزمایشگاه منتقل شدند و در روی محیط پایه کمپیلوباکتر بلاک آگار حاوی % خون گوسفند دفیبرینه، وانکومایسین میلیگرم در لیتر، B / میلیگرم در لیتر، تری متو پریم گرم در لیتر و آمفوتریسین B میلیگرم در لیتر کشت داده . پلیت ها در درون جار بیهواری قرار گرفتند.

از اضافه کردن آب به Gaspack درب جار محکم بسته شده و در دمای درجه سانتی گراد به مدت - روز گرمخانه گذاری گردید. های هلیکوباکتریلوری، توسط رنگ آمیزی گرم و تستهای اوره آز، اکسیدازو کاتالاز انجام شد [ و ] .

ب) بیه عصاره های گیاهی: پودر آسیاب شده و خشک شده هل، میخک، زنجبیل و زردچوبه، تهیه شده و برای آماده سازی عصاره های الکلی، اتری و آبی به کار رفت. گرم از پودر مورد آزمایش، در آب، گرم در اتریترولیوم و گرم در اتانول، ریخته شده و محلولهای حاصله به مدت ساعت، در دمای درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. از ساعت، مایع روپی استخراج، فیلتر شده و توسط دستگاه تقطیر در خلأ تغلیظ شد. نمونه های تغلیظ شده، روی شیشه ساعت قرار داده شدند و در آون درجه سانتی گراد، با تبخیر حلال رسوب خشک شده هر یک از حلالها بدست آمد [ ] .

ج) حساسیت به عصاره آبی زردچوبه زنجبیل و هل به روش Agar Dilution :

هلیکوباکتریلوری ( نمونه جدا شده از زخم، جدا شده از گاستریت و نمونه جدا شده از سرطان معده). برای بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره های آبی زنجبیل، زردچوبه، میخک و هل در داخل بروسلا آگار حاوی % خون، درغلظتهای

میکرو گرم در میلی لیتر ریخته شد سپس از باکتریایی که در محیط کشت رشد کرده بودند، سوسپانسیونی در بروسلا برات به مقدار  $\times$  باکتری در میلی لیتر تهیه شد.

میکرو لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی روی برسلا آگار حاوی عصاره های گیاهی ریخته شده و پلیتها در درون جار بی هواری قرار گرفتند. پس از اضافه کردن آب به Gaspack درب جار بسته شده و در دمای درجه سانتی گراد و % دی اکسید کربن گرمخانه گذاری گردید. بعد از روز کمترین غلظت عصاره های گیاهی را که رشد قابل رویت را پس از مدت کافی گرمخانه گذاری باز می داشت، به عنوان MIC در نظر [ ] .

د) بررسی حساسیت سویه های مختلف هلیکو باکتریلوری به عصاره های آبی، الکلی و اتری زردچوبه، زنجبیل، میخک و هل به روش Disk Diffusion: در این روش، از باکتری های رشد کرده در روی پلیتهای حاوی کمپیلو بلاک آگار حاوی % خون گوسفند دفیبرینه، سوسپانسیون در سرم فیزیولوژیک به تعداد  $\times$  باکتری در میا .

میکرو لیتر از این سوسپانسیون روی محیط مولر هینتون آگار حاوی % خون، تلقیح شد. دیسک بلانک استریل روی پلیتها قرار داده شده و عصاره های آبی، اتانولی و اتری زردچوبه، زنجبیل، میخک و هل در میکرو گرم در میلی لیتر به میزان

میکرو لیتر روی

دیسک بلانک تلقیح شد. بعد از روز گرمخانه گذاری از لحاظ خواص بیو شیمیایی بررسی شدند. پلیتها از لحاظ وجود هاله عدم رشد بررسی شدند [ ]. نمونه های حاصله از لحاظ اکسیداز، کاتالاز و اوره آزت بودند. وتین حساس و به نالید یکسید اسید مقاوم بودند. بررسی باکتری در لامهای مستقیم و وژی انجام شد. در % لام های از نمونه بیوپسی جمع آوری شده .

جدول شماره . اثر ضد باکتریایی عصاره آبی گیاهان مورد مطالعه بر روی سویه هلیکوباکتریپیلوری جدا شده از بیماران

هاله های عدم رشد بر حسب میلی متر در سویه های ده گانه

عصاره های آبی گیاهان	
بدون هاله /	زردچوبه
بدون هاله /	زنجبیل
بدون هاله /	
بدون هاله /	

جدول شماره . اثر ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاهان مورد مطالعه بروی سویه هلیکوباکتریپیلوری جدا شده از بیماران

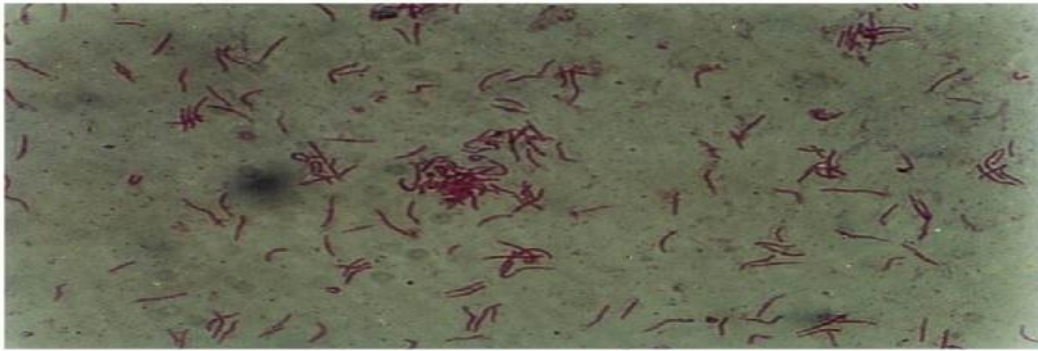
هاله های عدم رشد بر حسب میلی متر در سویه های ده گانه

عصاره های الکلی گیاهان	
بدون هاله /	زردچوبه
بدون هاله /	زنجبیل
بدون هاله /	
بدون هاله /	س

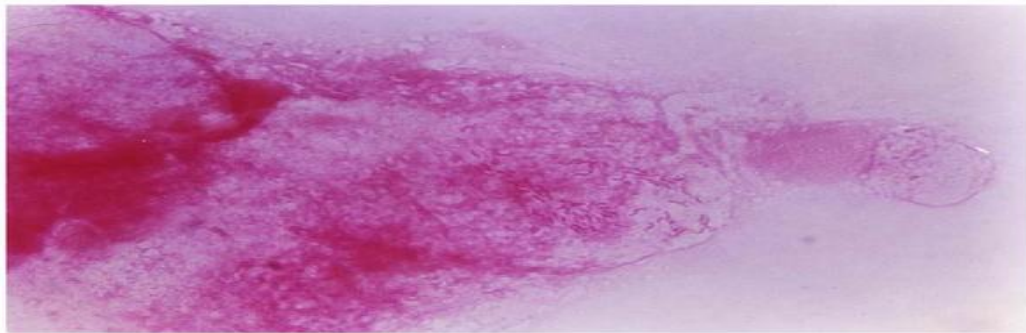
جدول شماره . اثر ضد باکتریایی عصاره های اتری گیاهان مورد مطالعه بروی سویه هلوکوباکتریپیلوری جدا شده از بیماران

هاله های عدم رشد بر حسب میلی متر در سویه های ده گانه

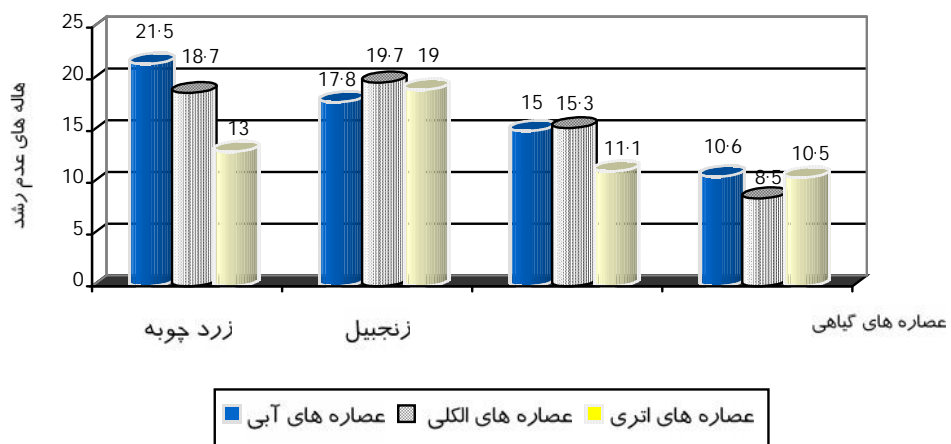
عصاره های اتری گیاهان	
بدون هاله /	زردچوبه
بدون هاله /	زنجبیل
بدون هاله /	
بدون هاله /	



تصویر شماره . رنگ آمیزی گرم از کلونی های هلیکوباکتر رشد کرده. هلیکوباکتر با اشکال مارپیچی در تصویر دیده شود (\*).



تصویر شماره . رنگ آمیزی گرم، گسترش تهیه شده از بیوپسی معده بیمار مبتلا به زخم اثنی عشر هلیکوباکتر با اشکال مارپیچی در تصویر، دیده می شود (\*).



تصویر شماره . مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره های اتری، الکلی و آبی گیاهان مورد مطالعه

مستقیم و در % لام های پاتولوژی هلیکو باکتریپلوری مشاهده گردید (شکل و ).

دامنه MIC عصاره زردچوبه، زنجبیل، میخک و هل برای سوبه های مختلف به ترتیب - - و - میکرو گرم در میلی لیتر تعیین گردید. در جدولهای و شکل، نتایج حاصل از اثر عصاره های مختلف گیاهی ارایه شده است. عصاره آبی زردچوبه (دامنه قطر هاله عدم رشد

( نسبت به عصاره های الکلی و اتری این گیاه اثر ضد میکروبی بیشتری را نشان داد. همچنین اثر عصاره الکلی زردچوبه نیز بیشتر از عصاره اتری بود که اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. عصاره الکلی زنجبیل (دامنه قطر هاله عدم رشد) و عصاره اتری آن (دامنه قطر هاله عدم رشد) اثر ضد میکروبی بیشتری را نسبت به عصاره آبی این گیاه داشتند. در میان عصاره های آبی بیشترین اثر مربوط به زردچوبه بود که از نظر آماری با بقیه عصاره های این مطالعه اختلاف معنی داری داشت. پس از آن زنجبیل، میخک و هل در رده های بعدی قرار داشتند.

هلیکوباکتریپلوری به عنوان یک عامل مهم در ایجاد گاستریت مزمن و زخم معده و اثنی عشر محسوب می شود. همچنین نقش آن را در ایجاد آدنوکارسینومای دیستال معده مهم ارزیابی می کنند. به دلیل افزایش شیوع عفونت در جوامع مختلف و با توجه به روند افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها یافتن منابع جدید دارویی اهمیت زیادی دارد. تاباک و همکارانش نشان دادند که عصاره آبی آویشن و عصاره الکلی دارچین دارای اثر ضد هلیکوباکتریپلوری می باشد. آنها همچنین مشخص کردند که اثر ضد هلیکوباکتریپلوری آویشن بیشتر می باشد به دلیل اینکه عصاره این گیاه از فعالیت اوره آز و همچنین رشد باکتری جلوگیری می کند [ ].

هیل و همکارانش نیز اثر ضد هلیکوباکتریپلوری بودر سیر و روغن سیر را طی تحقیقات خود کردند [ ].

ساتو و همکارانش نیز ترکیب اسید گالیک را از هلیله سیاه شناسایی نمودند و نشان دادند که عصاره اتانولی هلیله سیاه دارای اثر ضد باکتریایی بوده و برای استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین موثر می باشد [ ].

چن و همکارانش نیز اثر زنجبیل را بر روی اشتریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم، ویبریپاراهمولیتیکوس، سودوموناس آئروچینوزا، پروتئوس و لگاریس، استافیلوکوکوس اورئوس، مایکوباکتریوم فلثی، استرپتوکوکوس فکالیس، باسیلوس سرئوس و میکروکوکوس لوتئوس بررسی کردند. نتایج بررسی آنها مشخص کرد که زنجبیل فقط توانایی مهار میکروکوکوس لوتئوس را دارد [ ]. نتایج بررسی ما نیز نشان داد که زنجبیل، کاملاً بر روی هلیکوباکتریپلوری مؤثر بوده و می تواند بخوبی رشد آن را در شرایط *in vitro* مهار کند.

ساکاریا و همکارانش نیز فعالیت ضد باکتریایی روغن زردچوبه را بر روی باسیلوس سرئوس، باسیلوس کوآگولانس، باسیلوس سابتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشتریشیاکلی و سودوموناس آئروچینوزا بررسی کردند. آنها پس از جدا سازی پیگمان زرد رنگ زردچوبه از اولئورزین زردچوبه، مایع باقیمانده را که تقریباً حاوی % روغن بود، برای بررسی اثرات ضد میکروبی استفاده کردند. بررسی آنها نشان داد که روغن حاصله دارای سه جزء می باشد که دومین جزء بیشترین تاثیر را داشت. بررسی های بیشتر وجود دو ترکیب کورلون و تورمرولن را به همراه ترکیبات اکسیژن دار دیگر، در این اجزاء مشخص کرد [ ].

نتایج بررسی های ما نیز نشان داد که بیشترین فعالیت لیکوباکتریپلوری مربوط به عصاره آبی زرد چوبه بود که یک افزودنی مهم به مواد غذایی، بویژه در

infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1992 Apr; 45(4):319-23.

4- Smoot DT, Hamieton FA, Summary of the National Institutes of Health Consensus Development Conference on *Helicobacter pylori*. *Gastrointestinal Diseases Today* 1995;4:1-10.

5- Latifi Navid S, Siavoshi F, Malekzadeh R, Sohrabi M, Mokhtari-Azad T, Safar-Alizadeh R, Massarrat S. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in distal esophagus and its etiologic role in esophageal injury. *Gut* 2002;51:A68

6- Reyes VE, Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernest PB. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *The J of Immunol* 2000;165:1918-24.

7- Krishnamurthy PM, Parlow JB, Zitzer NB, Vakil HI. *Helicobacter* Containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Immun* 1998;66:5060-5066.

8- Latifi Navid S, Siavoshi F, Mokhtari-Azad T, Malekzadeh R, Sohrabi M, Massarrat S. Neutralization of *Helicobacter pylori* cytotoxicity on Vero cells by omeprazole micronized. *Gut* 2002; 51:A16

9- Tombola F, Oregana F, Brutsche S, Zabo IS, Giudice GD, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Inhibition of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 1999;460:221-5.

10. Tabak M, Armon R, Potasman I, Neeman I. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J appl Bacteriol* 1996;80(6): 667-72.

11- Sato Y, Oketani H, Singyouchi k, Ohtesuro T, Kihara M, shibata H, Higuti I. Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* Retz against methicillin - resistance *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* 1997;20(4):401-4.

12- Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Antibacterial activity of termuric oil: A by-product from curcumin manufacture. *J agric Food Chem* 1999; 47(10):4297-300.

13- Chen HC, Chang MD, Chang TJ. Antibacterial properties of some spice plants

کشور های آسیای جنوب شرقی محسوب می شود و بعد از آن عصاره های زنجبیل، میخک و هل قرار داشتند با توجه به یافته های این تحقیق. مطالعه اثر این افزودنی در رژیم غذایی بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکتریلوری حایز اهمیت است. همچنین ارزیابی دوام بقای هلیکوباکتریلوری در مواد غذایی حاوی غلظت های مختلف زردچوبه بسیار مهم می باشد.

کای و همکارانش اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی میخک را بر روی میکروارگانیزم های پاتوژن دهانی گرم منفی، بررسی کردند. آنها توسط کروماتوگرافی هشت ترکیب فعال را از عصاره این گیاه جدا نمودند. بررسی های آنها نشان داد که ترکیبات فلاونی، کیمپ فرول و میریستین دارای بیشترین فعالیت ضد باکتریایی بر روی پروفیلوموناس گینگاویلیس و پری وتلا اینترمدیا می باشند. در صورتیکه مطالعات ما نشان داد که هر سه عصاره آبی، الکلی و اتری میخک در مقایسه با عصاره های زنجبیل و زردچوبه تاثیر قابل ملاحظه ای بر روی مهار رشد هلیکوباکتریلوری نداشت [ ].

الکایار و همکارانش فعالیت ضد میکروبی یکسری از روغن های گیاهی از جمله روغن هل را بر روی میکروارگانیزم های ساپروفیت بررسی کردند. آنها نشان دادند که روغن هل تاثیر قابل ملاحظه ای در مهار رشد این میکروارگانیزم ها ندارد. نتایج بررسی ما نیز نشان داد که هر سه عصاره آبی، الکلی و اتری هل در مقایسه با عصاره های زردچوبه و زنجبیل تاثیر قابل ملاحظه ای بر روی مهار رشد هلیکوباکتریلوری ندارد [ ].

1- Blaser MJ. Hypothese on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroentero* 1992 Feb;102(2): 720-7.

2- Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990 Apr; 161(4): 626-33.

3- Sipponen P, Sipponen P, Kosunen TV, Valle J, Riihela M, Seppala k. *Helicobacter pylori*

before and after heat treatment. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1985;18(3):190-5.

14- Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:1-13.

15- Mobley HLT, Cortesia MJ, Roseuthal LE, Jones BD. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1998; 26:831-6.

16- Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. Antibacterial activity of black myrobalan against *Helicobacter pylori*. *Intern J of Antimicrobiol agents* 2001;18: 85-8.

17- Hill DJ, O'gara EA, Maslin DJ. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(5): 2269-73.

18- Cai L, Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens; *J Nat Prod* 1996; 59(10):987-90.

19- Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J Food Prot* 2001;64(7):1019-24.