**بررسی تاثیر عصاره گیاهی هلیکوبسید بر هلیکوباکترپیلوری و لاکتوباسیلوس در شرایط آزمایشگاهی**

**چکیده**

**بررسی تاثیر عصاره هلیکوبسید بر رشد لاکتوباسیلوس**

برای بررسی تاثیر عصاره هلیکوبسید بر رشد لاکتوباسیلوس، ابتدا کشت 48 ساعته از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی تهیه شد. سپس غلظت نیم مک فارلند از هردو باکتری تهیه گردید.همچنین، مقدار یک گرم از عصاره در 5 میلی لیتر آب مقطر به صورت سوسپانسیون یکنواخت حل شد.

در مرحله بعد برای تهیه یک سوسپانسیون حاوی یک میلیون از باکتری های لاکتوباسیلوس استاندارد ( لاکتوباسیلوس کازئی) و جدا شده از ماست ( لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) ، مقدار 990 لاندا از محیط براث MRS با 10 لاندا از غلظت نیم مک فارلند باکتری مخلوط گردید. در مرحله بعد نیم میلی لیتر از محلول عصاره هلیکوبسید به هر یک از محیط های براث حاوی باکتری اضافه گردید.

از محیط MRS براث حاوی یک میلیون باکتری و فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد. این لوله ها به مدت 72 ساعت در انکوباتور37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از گذشت 72 ساعت از لوله های براث رقت های 10/1و 100/1تهیه شد تا پس از کشت بر روی محیط جامد تعداد باکتری ها به سهولت قابل شمارش باشد.

100 لاندا از لوله براث حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ترکیب شده با عصاره و لوله ها با رقت 10/1و 100/1بر روی سه پلیت بلادآگار به صورت spread plateکشت داده شد.

علاوه بر این، 100 لاندا از لوله براث حاوی لاکتوباسیلوس کازئی ترکیب شده با عصاره و لوله ها با رقت 10/1و 100/1بر روی سه پلیت بلادآگار به صورت spread plateکشت داده شد. همچنین از لوله کنترل نیز رقت های 10/1 و 100/1 تهیه شد و 100 لاندا از این رقت ها بروی پلیت بلاد آگار کشت داده شد. پلیت ها به مدت 48 ساعت انکوبه شدند**.**

**نتایج**

تصویر شماره 1 رقت 8/1 از عصاره هلیکوبسید را نشان می دهد . این پلیت آخرین رقتی از عصاره هلیکوبسید می باشد که در آن مهار رشد صورت گرفته است و به عنوان کمترین غلظتی که باکتری را مهار کرده است( MIC) در نظر گرفته می شود.

تصویر شماره2- رشد لکه ایی هلیکوباکترپیلوری با تعداد 10000باکتری در محیط فاقد عصاره هلیکوبسید

تصویر شماره 1-عدم رشد هلیکوباکتر پیلوری با تعداد 10000 باکتری در پلیت حاوی رقت 8/1 از عصاره هلیکوبسید

****در نتایج حاصل از بررسی اثر لاکتوباسیلوس بر هلیکوباکترپیلوری (به روش انتشار از دیسک)، در اطراف دیسک حاوی سوسپانسیون لاکتوباسیلوس یک هاله عدم رشد به اندازه 10 میلی متر در اطراف دیسک مشاهده شد.

نتایج حاصل از یررسی لاکتوباسیلوس بر هلیکوباکترپیلوری به روش انتشاز از دیسک

در نتایج حاصل از بررسی اثر لاکتوباسیلوس بر هلیکوباکترپیلوری (به روش انتشار ازچاهک)، یک هاله عدم رشد به اندازه 6 میلی متر در چاهک دارای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مشاهده شد. همان گونه که قابل مشاهده است چاهک حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(جدا شده از ماست) هاله عدم رشد بزرگتری نسبت به لاکتوباسیلوس دارد ( تصویر شماره 2) .

در نتایج حاصل از بررسی اثر لاکتوباسیلوس بر هلیکوباکترپیلوری (به روش لکه گذاری) در اطراف کشت لکه ای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روش کشت لکه ای یک هاله عدم رشد به قطر 8 میلی متر دیده شد.

نتایج حاصل از بررسی اثرلاکتوباسیلوس بر هلیکوباکترپیلوری به روش انتشار از چاهک

چاهک حاوی الکل 70 درصد

کنترل مثبت

چاهک حاوی الکل 70 درصد

 کنترل مثبت

چاهک حاوی آب مقطر

کنترل منفی

چاهک حاوی آب مقطر

 کنترل منفی

چاهک حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

چاهک حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

چاهک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی

چاهک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی

بررسی نتایج حاصل از تاثیر عصاره هلیکوپساید بر رشد لاکتوباسیلوس نشان داد که تعداد لاکتوباسیلوس در محیط حاوی عصاره هلیکوبسید نسبت به محیط فاقد عصاره افزایش یافته است.

بحث و نتیجه گیری

هلیکوباکترپیلوری مهم‌ترین علت ورم معده می‌باشد، ورم معده التهاب مخاط است و با بیماری هایی از جمله زخم معده، زخم اثنی عشر و سرطان معده در ارتباط است(4). شایع‌ترین علت ورم معده مزمن در جهان عفونت با هلیکوباکترپیلوری می‌باشد.

این عفونت سبب آسیب تدریجی بافت مخاطی معده شده است و در حال حاضر نقش تعیین کننده‌ای در ایجاد زخم اثنی‌عشر دارد و با بیماری‌هایی مثل زخم معده، سرطان معده و بدخیمی‌های مرتبط با بافت لنفاوی همراه است (5-7).

هلیکوباکترپیلوری یک باسیل گرم منفی مارپیچی است و یکی از رایج ترین باکتری‌هایی است که بدن انسان و نیمی از جمعیت جهان را آلوده کرده است.حدود10 تا20 درصد افراد مبتلا به این عفونت از زخم معده رنج می‌برند و حدود 1تا 2درصد در معرض خطر سرطان قرار دارند(8). در حقیقت این باکتری توسط سازمان جهانی بهداشت به عنوان کارسینوژن تیپ یک طبقه بندی می‌شود(9). شیوع عفونت در ایران بالا بوده و حدود 7/50 درصد می‌باشد وبیشترین میزان بروز در تهران(4/27درصد) و کمترین میزان بروز در مازندران(19/2درصد) می‌باشد(10).

متداولترین روش‌های درمانی این عفونت درمان‌های سه گانه و چهارگانه است. درمان سه گانه که از سه آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین، کلاریترومایسین و مترونیدازول و یک مهار کننده پمپ پروتون به‌عنوان یک درمان موثر برای عفونت هلیکوباکترپیلوری در نظر گرفته می‌شود(11). با این حال عفونت در بیش از 20درصد بیماران به طور کامل از بین نمی‌رود(12). درمان چهارگانه شامل استفاده از پمپ‌های مهارکننده پروتون، بیسموت، تتراسایکلین و مترونیدازول است اما متاسفانه این نوع درمان در 20 تا 30درصد بیماران جواب نمی‌دهد.

در حقیقت عدم موفقیت در درمان یکی از موارد مهم است و بیشتر به دلیل مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مترونیدازول و کلاریترومایسین اتفاق می‌افتد.علاوه بر این نفوذ باکتری در مخاط و سلول‌های اپی تلیال محافظت می‌شود.عدم تحمل فردی به عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها و هزینه‌های بالای درمان یکی دیگر از عوامل مهم موثر در درمان می‌باشد.

استفاده از درمان جایگزین یا تکمیل دوز درمان در سال‌های اخیر بسیار ارزیابی شده است و داروهای گیاهی از روش‌های موثر درمان جایگزین می‌باشد. این نوع درمان به دلیل طبیعی بودن ، سمیت کم، کمترین عوارض جانبی و هزینه کم در مقایسه با درمان‌های داروئی بسیار مورد توجه قرار گرفته است(2).

Kui Zhao و همکارانش در سال 2018 مطالعه‌ای را در جهت بررسی اثر آنتی باکتریال لاکتوباسیلوس پلانتاروم علیه هلیکوباکترپبلوری انجام دادند.

در این مطالعه مشخص شد سلول های لاکتوباسیلوس پلانتاروم با تولید اسید لاکتیک می توانند مانع رشد هلیکوباکتر پیلوری شوند و همچنین با تحریک تولید اینترلوکین 10 سبب کاهش اثرات التهابی ایجاد شده توسط هلیکوباکترپیلوری شوند(13).

پرستو رضایی و همکارانش در سال2019 مطالعه ی را جهت بررسی اثر آنتی باکتریال لاکتوباسیل بر هلیکوباکترپیلوری انجام دادند

در این مطالعه مشخص شد فعالیت اوره آزی هلیکوباکترپیلوری و همچنین چسبندگی هلیکوباکترپیلوری به سلول اپیتلیال معده توسط توسط لاکتوباسیل ها کاهش می یابد.همچنین لاکتوباسیل ها قادر به مهار رشد سویه های مختلف هلیکوباکترپیلوری هستند(14).

[Pei-Shan Hsieh](https://onlinelibrary.wiley.com/action/doSearch?ContribAuthorRaw=Hsieh%2C+Pei-Shan) و همکاران در مطالعه ای در سال 2012دریافتند که شش سویه شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسTYCA08،لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس TYCA15،لاکتوباسیلوس جانسونیMH68و سویه های لاکتوباسیلوس سالیواریوس به طور موثر هلیکوباکترپیلوری را از بین می برند و می توانند به عنوان پروبیوتیک استفاده شوند(15).

Hyun-A Lee و همکارانش در مطالعه‌ای در سال 2018اثر مهاری گیاه آلیوم هوکری علیه هلیکوباکتر را بررسی کردند وبرای این کار از روش انتشار از دیسک استفاده کردند.این گیاه علاوه بر اثر درمانی علیه هلیکوباکترپیلوری سبب کاهش التهاب مخاطی و آسیب های اپی‌تلیال معده در موش‌های آلوده به هلیکوباکترپیلوری شد. نتیجه نشان داد که این گیاه با موفقیت عفونت را درمان کرده و می تواند درمانی امیدوارکننده برای بیماران مبتلا به ورم معده ناشی از هلیکوباکتر پیلوری باشد(16).

Suchandra Goswamطی مطالعه ای در سال 2018 مشاهده کردند که داروی ضدمالاریای آرتمیسینین از گیاه Artemisia annua فعالیت آنتی باکتریال بسیار چشمگیری علیه هلیکوباکتر پیلوری نشان داد.هشت ترکیب تازه سنتز شده در برابر سویه های بالینی و استاندارد هلیکوباکتر پیلوری بررسی شدند. از پنج ملکول آن‌ها مشتقی از بتا اترآرتسیکلوپروپیل متر که اخیرا سنتز شده بود قوی ترین اثر را نشان داد. میزان MIC وMIC90 MBC, به ترتیب شامل 1-25/0و 1و 16-1میکروگرم درمیلی‌لیتر علیه سویه های حساس و مقاوم بود.این ملکول فعالیت آنتی باکتریال قوی را با انحطاط مورفولوژیکی میکروارگانیسم نشان داد.برخلاف کلاریترومایسین اثر عملکردی خود را در محیط اسیدی معده حفظ کرده و برخلاف مترونیدازول فعالیت خود را علیه سویه‌های مقاوم حفظ کرد.این عصاره دارای سمیت سلولی نیست و از نظر بالینیتوانایی کاهش میزان هلیکوباکترپیلوری در عفونت های مزمن را دارد. بنابراین این ترکیب می تواند کاندیدی مناسب برای درمان عفونت هلیکوباکترپیلوری باشد.از آنجا که اعتقاد بر این است که عود زخم‌های معده و ابتدای روده کوچک عمدتا بدلیل مقاومت آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم است، تولید دارو از این ترکیب قابل توجیه می باشد(17).

 در مطالعه حاضر نیز اثرات آنتی باکتریال لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جدا شده از ماست و سویه استاندارد لاکتوباسیلوس کازئی علیه هلیکوباکترپیلوری به سه روش مختلف آزمایش شد نتایج نشان داد که هر دو سویه دارای اثر آنتی باکتریال علیه هلیکوباکترپیلری می باشند.

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر اثر آنتی باکتریال عصاره گیاهی و همچنین اثر باکتریوسیدال باکتریوسین‌های لاکتوباسیلوس علیه هلیکوباکترپیلوری می‌باشد.

 علاوه بر این، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره هلیکوبسید می تواند سبب تشدید رشد لاکتوباسیلوس شود . به عبارت دیگر عصاره گیاهی به عنوان یک ترکیب پری بیوتیک ((Prebiotics عمل می کند. بررسی‌ها نشان می‌دهد از آنجا که لاکتوباسیلوس توانایی زنده ماندن در pH اسیدی معده را داشته، مجاورت لاکتوباسیلوس با عصاره می‌تواند سبب اثر هم افزایی بین اثر باکتریوسیدالی باکتریوسین لاکتوباسیلوس و عصاره گیاهی شده و در ریشه کنی هلیکوباکترپیلوری کلونیزه شده در معده و کاهش علائم بیماران مبتلا به التهاب و ورم معده و زخم معده موثر باشد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده میتوان این عصاره را همراه با لاکتوباسیلوس ها به صورت سین بیوتیک ( synbiotic) جهت کاهش تعداد هلیکوباکتر پیلوری در معده استفاده نمود. اگر چه درستی این فرضیه با تحقیقات invivo اثبات میگردد.

این دارو بدلیل هزینه، سمیت سلولی و عوارض کمتر می‌تواند به عنوان یک داروی مجزا یا درمان کمکی همراه با آنتی بیوتیک به عنوان یکی از گزینه‌های درمان درنظر گرفته شود.

نتیجه گیری: نتیجه مطالعات آزمایشگاهی انجام شده در این مطالعه نشان داد که عصاره هلیکوبسید علاوه براینکه اثر آنتی باکتریال قوی بر هلیکوباکترپیلوری دارد موجب تقویت رشد لاکتوباسیلوس نیز می شود. به عبارت دیگر عصاره گیاهی به عنوان یک ترکیب پری بیوتیک ((Prebiotics عمل می کند.

**منابع**

1. Safavi M, Shams-Ardakani M, Foroumadi A. Medicinal plants in the treatment of Helicobacter pylori infections. Pharmaceutical Biology. 2015;53(7):939-60.

2. Yousef-Nezhad H, Hejazi N. Anti-Bacterial Properties of Herbs against Helicobacter Pylori Infection: A Review. International Journal of Nutrition Sciences. 2017;2(3):126-33.

3. Anjum N, Maqsood S, Masud T, Ahmad A, Sohail A, Momin A. Lactobacillus acidophilus: characterization of the species and application in food production. Critical reviews in food science and nutrition. 2014;54(9):1241-51.

4. Marshall B, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. The lancet. 1984;323(8390):1311-5.

5. Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE. Peptic ulcer disease. The lancet. 2009;374(9699):1449-61.

6. Fock KM, Graham DY, Malfertheiner P. Helicobacter pylori research: historical insights and future directions. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2013;10(8):495.

7. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. Gut. 2012;61(5):646-64.

8. Vale FF, Oleastro M. Overview of the phytomedicine approaches against Helicobacter pylori. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2014;20(19):5594.

9. O’Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, et al. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against Helicobacter pylori. World journal of gastroenterology. 2005;11(47):7499.

10. Khademi F, Poursina F, Hosseini E, Akbari M, Safaei HG. Helicobacter pylori in Iran: A systematic review on the antibiotic resistance. Iranian journal of basic medical sciences. 2015;18(1):2.

11. Nagata K, Yu H, Nishikawa M, Kashiba M, Nakamura A, Sato EF, et al. Helicobacter pylori generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. Journal of Biological Chemistry. 1998;273(23):14071-3.

12. Bagchi D, McGinn TR, Ye X, Bagchi M, Krohn RL, Chatterjee A, et al. Helicobacter pylori-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. Digestive diseases and sciences. 2002;47(6):1405-12.

13. Zhao K, Xie Q, Xu D, Guo Y, Tao X, Wei H, et al. Antagonistics of Lactobacillus plantarum ZDY2013 against Helicobacter pylori SS1 and its infection inávitro in human gastric epithelial AGS cells. Journal of bioscience and bioengineering. 2018;126(4):458-63.

14. Rezaee P, Kermanshahi RK, Falsafi T. Antibacterial activity of lactobacilli probiotics on clinical strains of Helicobacter pylori. Iranian journal of basic medical sciences. 2019;22(10):1118.

15. Hsieh PS, Tsai YC, Chen YC, Teh SF, Ou CM, King VAE. Eradication of H elicobacter pylori Infection by the Probiotic Strains L actobacillus johnsonii MH‐68 and L. salivarius ssp. salicinius AP‐32. Helicobacter. 2012;17(6):466-77.

16. Lee H-A, Hong S, Yoo J-H, Chung Y, Kim O. Anti-Helicobacter pylori activity and inhibition of gastritis by Allium hookeri extract. Laboratory Animal Research. 2018;34(2):75-9.

17. Goswami S, Bhakuni RS, Chinniah A, Pal A, Kar SK, Das PK. Anti-Helicobacter pylori potential of artemisinin and its derivatives. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(9):4594-607.