ارزیابی اثرات ضد میکروبی ساپونین جدا شده از گیاه شیرین بیان بر رده سلولهای ریوی القاشده توسط استرپتوکوک پنومونیه

مهیار هاکی [۱]، زهره افتخاری [۲*]

چکیده

التهاب راه هوایی نقش مهمی در پاتوژنز سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS)، آسم و بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD) ایفا می کند و درمان ضد التهابی به طور موثر علائم این بیماری ها را بهبود می بخشد. بیش از ۳۰ گونه از جنس Glycyrrhiza وجود دارد که به طور گسترده در سراسر جهان گسترش یافته است. عصاره‌های ریشه شیرین بیان اثرات مفیدی در درمان عفونت‌های گلو، سل، بیماری‌های تنفسی، کبدی، ضد باکتریایی، ضد التهابی و نقص ایمنی دارد. بنابراین، تمرکز این مقاله بر مکانیسم ضد باکتریایی ساپونین عصاره‌های شیرین بیان و اثرات درمانی آن بر روی باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه است. هدف از این مطالعه بررسی ساپونین استخراج شده از Glycyrrhiza glabra (شیرین بیان) و خواص ضد باکتریایی آن است. لیپیدها و ترکیبات فنلی در طی فرآیند جداسازی ساپونین مبتنی بر دستگاه سوکسله حذف شدند. با استفاده از روش میکرودیلوشن براث، فعالیت آنتی میکروبی برعلیه استرپتوکوک پنومونیه و اثرات آن بر روی فعالیت اینترفرون نکرون گاما بررسی شد. نتایج آنالیز MIC و MBC نشان داد که در غلظت ۱۰ میکرومول، هیچ ناحیه مهاری مشاهده نشد. با این حال، در غلظت‌های ۲۰ (٦/٤ میلی‌متر)، ٤٠ (١٧/٦ میلی‌متر) و ١٠٠ (٢١/٩ میلی‌متر) مناطق مهار باکتری با استانداردها قابل مقایسه بود. نتایج الایزا نشان داد که اثر تعدیل‌کنندگی ایمنی با افزایش IFN-γ در کنار عدم تأثیر منفی بر رشد سلولی و درصد زنده مانی در ارتباط هست. در نتیجه، این مطالعه نشان می‌دهد که حتی در غلظت‌های پایین، ساپونین شیرین بیان فعالیت های ایمنومدولاتوری و ضد باکتریایی امیدوارکننده ای را در شرایط آزمایشگاهی در برابر S.pneumoniae نشان می دهد.

واژگان کلیدی: ساپونین، استرپتوکوک پنومونیه، اثر ضد میکروبی، تنظیم سیستم ایمنی

تاریخ دریافت: ١٤٠٣/٤/٢٠ تاریخ پذیرش: ١٤٠٣/٦/٢٩

مقدمه

در سطح جهانی، پنومونی یک نگرانی جدی برای سلامت عمومی و عامل اصلی مرگ و میر است. علیرغم پیشرفت‌ها در درمان‌های ضد میکروبی، آزمایش‌های تشخیصی میکروبیولوژیکی و پروتکل‌های پیشگیرانه، پنومونی همچنان مهم‌ترین علت مرگ در سراسر جهان است. موارد شدید پنومونی ها، پنومونی درمان‌نشده به موقع و تجویز خودسرانه ی داروهایی که توسط FDA یا FDA ملی تأیید نشده‌اند می‌توانند منجر به عوارض گوناگونی شوند(۱). شایع‌ترین پاتوژن‌هایی که بر پنومونی باکتریایی در بارداری تأثیر می‌گذارند، استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفولانزا و مایکوپلاسما پنومونیه هستند. استرپتوکوک پنومونی شایع‌ترین علت پنومونی اکتسابی از جامعه است. منتژیت، باکتریمی، اوتیت میانی، سینوزیت، آرتریت، پریتونیت و اندوکاردیت از پیامدهای شایع آن هستند(۲,۳).

از آنجایی که داروهای گیاهی به طور گسترده در بین فرهنگ‌ها و ملل مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند و عوارض جانبی گیاهان در دوز مناسب و برنامه ریزی شده کمتر است، نقش درمانی آنها در بیماری هایی با هدف شناسایی ترکیبات ضد التهابی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماریها در ایران به دو صورت انجام میشود که شامل تولید دارو به شکل مدرن انواع اشکال دارویی مثل قرص، شربت، پماد، قطره و ... برای عرضه در داروخانه ها و تجویز توسط پزشک و داروهای طب سنتی که براساس آیین نامه تهیه و عرضه فراوردههای طب سنتی تولید و معمولاً توسط متخصصان طب سنتی برای بیماران تجویز میشوند(٤,٥). شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra*گیاهی از جنس *Glycyrrhiza* است که بومی جنوب اروپا، شمال آفریقا و آسیای معتدل

۱. دانشکده مهندسی پزشکی ،دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران ، ایران
۲ بخش بیوتکنولوژی ، انستیتو پاستور ایران ، تهران ، ایران. z_eftekhari@pasteur.ac.ir

است. همچنین حاوی فلاونوئیدها و ایزوفلاون‌ها، ترپنوئیدها، اسانس‌ها و نشاسته‌ها، قندهایی از جمله گلوکز و ساکارز، لیگنین، اسیدهای آمینه و موم است. یکی از اجزای مهم شیرین بیان ساپونین‌ها (گلیسیریزین و ۲٤-هیدروکسی گلیسیریزین هستند که ۱۰۰ تا ۵۰ برابر بیشتر از نیشکر قدرت شیرین کنندگی دارند است(٦). Isoliquiritigenin استخراج شده از ریشه شیرین بیان دارای ساختار کالکونی است که اثر ضد سرطانی قوی از خود نشان می دهد. گلیسیریزین، گلیسیریزینیک اسید، ایزولیکیریتین و اسید گلیسیریزیک از دیگر مواد شیمیایی اصلی این گیاه با خواص ضد آتروژنیک، ضد سرطان، ضد دیابت، ضد میکروبی، ضد اسپاسم، ضد التهاب و ضد آسم هستند همچنین ثابت شده است که شیرین بیان به رفع خستگی و ناتوانی کمک می کند(۷،۸). علاوه بر این، شیرین بیان به عنوان یک ضد التهاب عمل می کند، پاسخ های آلرژیک را کاهش می دهد و از آسیب کبدی جلوگیری می کند. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، شیرین بیان به عنوان آرام بخش برای گلودرد و خلط آور برای اختلالات برونشی و سرفه استفاده می شود. هیچ گزارشی در مورد ترکیبات بالقوه سمی از گونه‌هایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، وجود نداشته است. با این حال، برخی از عواقب نامطلوب، مانند استفاده از دوزهای بالا در یک دوره طولانی، که منجر به بیماری های جدی می شود، شناخته شده است. با این وجود، این گیاه ممکن است برای اهداف دارویی در مقادیر کم برای بیماری های مهم مورد استفاده قرار گیرد و هیچ عارضه جانبی شناخته شده ای وجود ندارد(۹).

ساپونین‌ها گلیکوزیدهایی با وزن مولکولی بالا هستند که یک گروه قند به تری ترپن یا آگلیکون استروئیدی متصل هستند. به دلیل مولکول‌های آمفی‌فیلیک آن‌ها که از کربوهیدرات‌ها یا تری‌ترپنوئیدها یا بخش‌های استروئیدی آگلیکون تشکیل شده‌اند، اثرات ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی را نشان می‌دهند(۹،۱۰).

ریشه شیرین بیان حاوی ساپونین های تری ترپنوئیدی (گلیسیریزین، اسید گلیسیریزیک) است که اجزای اصلی تشکیل دهنده شیرین بیان هستند و مسئول طعم شیرین هستند. اسید گلیسیریزیک ساپونین اصلی تری ترپنوئید در ریشه شیرین بیان و شیرین کننده اصلی گیاه است که ۵۰ برابر شیرین تر از شکر است. اعتقاد بر این است که شیرین بیان و آگلیکون شیرین بیان باعث تسریع بهبود زخم معده می شوند. اسید گلیسیریزیک فعالیت های ضد التهابی و ضد آرتریت را در مطالعات حیوانی نشان داده است و تری ترپن های دیگر، یعنی اسید لیکوریتیک، گلیسیرتول، گلابرولید، ایزوگلبورلید و اسید شیرین بیان را توصیف کردند(۱۱،۱۲). Zhang و Ye (۲۰۰۹) چندین ساپونین مشتق شده از گونه ها را شناسایی کرد که شامل 22β-اکتکسیل گلیسیریزین، اورالساپونین B، آپیوگلیسیریزین، آرابوگلیسیریزین، و گیاه ساپونین E_2 بود(۱۳). ارزیابی ساپونین در پنومونی پنوموکوکوس بیانگر اثرات ضد التهابی در موشهای مبتلا بود(١٤) . با توجه به مقاومت های آنتی بیوتیکی در سالهای اخیر و شیوع بیماری های تنفسی هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی ساپونین جدا شده از شیرین بیان برای معرفی فراورده طبیعی با قدر اثر بازدارندگی مناسب است.

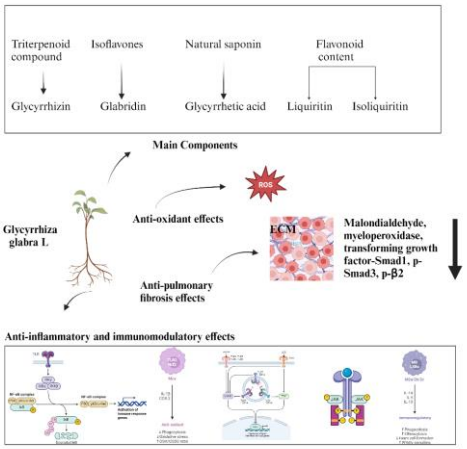
مواد و روش‌کار

تهیه عصاره ساپونین خام

ریشه گیاه شیرین بیان از انستیتوی گیاهان پزشکی ایران تهیه شد. ریشه‌های گیاه شیرین بیان جهت افزایش سطح تماس با حلال، خرد و آسیاب شدند. استخراج ساپونین خام از ریشه گیاه شیرین بیان با حرارت دادن ۵۰ گرم نمونه پودر شده به مدت ٤ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد با

۱۰۰ میلی لیتر اتانول (۲۰٪) انجام شد عصاره فیلتر شد و باقیمانده مجدد با ۲۰۰ میلی لیتر اتانول (۲۰٪) ترکیب شد سپس عصاره بر روی حمام اب قرار گرفت تا حجم نمونه به ٤٠ میلی لیتر کاهش یابد سپس در یک قیف جداکننده با ۲۰ میلی لیتر دی اتیل اتر مخلوط شد. مخلوط به شدت تکان داده شد سپس قیف در یک پایه تا زمان توسعه لایه آبی و دی اتیل ثابت شد سپس قسمت آبی جمع آوری شد و بخش دی اتیل اتر دور ریخته شد. به لایه آبی، n–بوتانول (٦٠ میلی لیتر) اضافه شد و با تکان دادن شدید مخلوط شد. به عصاره n–بوتانول ۱۰ میلی لیتر محلول 5 NaCl درصد اضافه شد، محلول حاصل بر روی یک حمام آب قرار گرفت سپس ساپونین‌های خام استخراج شده در آون خشک شدند(١٤).

شکل ۱ : گیاه شیرین بیان با نام علمی Glycyrrhiza glabra



شکل ۲ : مواد اصلی تشکیل دهنده و عملکرد گیاه شیرین بیان

تهیه ی باکتری

پس از تهیه پلیت‌های خون آگار، استرپتوکوکوس پنومونی، سویه محصور شده از سروتیپ ٤، یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۵ درصد CO2 رشد کرد. سپس کلنی‌ها در محیط کشت تاد هویت براث حاوی ۱٪ عصاره مخمر تلقیح شدند، تا فاز لگاریتمی میانی رشد کردند و تا غلظت‌های لازم برای القای عفونت در سلول به دست آید. انجام تست های برون تنی بر اساس آیین‌نامه کمیته ملی اخلاق پژوهشی ایران کد اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1400.199) انجام شد.

ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک ساپونین شیرین بیان در کشت سلولی

رده سلولی فیبروبلاست ریه جنین طبیعی انسان MRC5 و رده سلولی اپیتلیال پایه آلوئولی آلوئولی انسان آدنوکارسینوم A549 از بانک سلول ملی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌های MRC5 و A549 با استفاده از ۱۰٪ محیط Eagle اصلاح‌شده Dulbecco (DMEM)، ۱۰٪ (v/v) سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ جنتامایسین(Sigma -Aldrich USA) ، کشت شدند. پلیت ها/ فلاسک های آماده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO2 به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شدند. هر دو کشت A549 و MRC-5 در محدوده ۳ × ۱۰۵ سلول زنده برای آزمایش اثرات ساپونین بر روی سلول های ریه انسان بهینه شدند. تشکیل سلول های تک لایه با استفاده از میکروسکوپ کنتراست فاز معکوس (Leica) به صورت بصری تایید شد. هر سه روز یکبار، محیط کشت برای به دست آوردن سلول های تازه و مولد تازه می شد(۱۵).

تک‌لایه‌های سلولی به مدت ٤٨ ساعت در ۹٦ پلیت با میکرولیتر خوب رشد کردند. سپس عصاره‌گیری‌هایی با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ٤٠ و ۱۰۰ میکرومول سه تکرار و متانول به عنوان حلال در گروه شم و DMEM به عنوان گروه کنترل در چاهک های کشت سلولی منتخب استفاده شد تا اطمینان حاصل شود که غلظت نهایی DMSO در رقت های مورد آزمایش بالاتر از ۱٪ نباشد.

زنده ماندن سلول پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون تعیین شد. به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر MTT 5 میلی گرم بر میلی لیتر (سیگما) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در مرحله بعد، کشت محیط با MTT با ۷۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) برای حل کردن کریستال های فورمازان دنبال شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور شیکر انکوبه شد. در نتیجه، چگالی نوری در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از میکروپلیت خوان ثبت شد و درصد کشندگی برای هر رقت هر عصاره محاسبه شد. جذب برای هر چاه در طول موج ٥٤٠ نانومتر در دستگاه پلیت خوان میکرولیتری اندازه گیری شد و درصد زنده ماندن سلول (CV) به صورت دستی با استفاده از فرمول محاسبه شد:

درصد زنده مانی= میانگین abs چاهک های استخراج تکراری / میانگین abs چاه های کنترل × ۱۰۰ ٪

نیم حداکثر غلظت بازدارنده یا مقدار IC50 با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

٪ بازداری = (جذب کنترل – جذب نمونه)/ (جذب کنترل) × ۱۰۰

آزمایش برای فعالیت ضد میکروبی و اثر مهاری

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره گیاهی با استفاده از فرآیند میکرورقیق سازی براث در صفحات میکرولیتری ۹٦ چاهی با غلظت های مختلف به دست آمده از محاسبه IC50 به روش MTT بدست آمد. تلقیح میکروارگانیسم‌ها در مولر–هینتون براث Himedia هند تهیه شد و کدورت روی ۰.۵ مک فارلند تنظیم شد و برای بدست آوردن کدورت نهایی در چاه‌ها تقریباً ۳×۱۰٦ CFU/ml رقیق شد. بر اساس محاسبه IC50، سه غلظت مختلف ۲۰ ، ٤۰ و ۱۰۰ تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت با نمونه های کنترل مثبت و منفی انکوبه شدند. علاوه بر این، آزمایش انتشار ژل آگار با استفاده از صفحات آگار مولر–هینتون انجام شد. ارگانیسم هایی با غلظت تقریباً ۳ × ۱۰٦ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر به هر تکرار اضافه شدند. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ (باکتری) قطر ناحیه شفاف (منطقه مهار) در اطراف دیسک‌هایی که با غلظت های مختلف عصاره اندازه گیری شد.

ناحیه مهاری اطراف دیسک با میلی متر اندازه گیری و بیان شد. قطرهای کمتر از ۸ میلی متر، بین ۸ تا ۱۲ میلی متر و بیش از ۱۲ میلی متر به ترتیب مقاوم، نسبتا حساس و حساس در نظر گرفته شدند. کنترل مثبت نیز برای بررسی حساسیت ارگانیسم های آزمایش شده با استفاده از پنی سیلین مورد سنجش قرار گرفت(۱٦) .

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بلادرنگ (RT-PCR)

سطح بیان ژنIfn-γ، در مایعات رویی ارزیابی شد. پس از استخراج سلول‌ها از نمونه‌های بافت، محلول یخی RNX TM-PLUS به لوله‌های حاوی سلول‌های تیمار شده اضافه شد، و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس کلروفرم به لوله‌ها اضافه شد، سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شدند و نمونه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محتویات به لوله‌های ۱.۵ میلی لیتری بدون RNase که حاوی حجم مساوی ایزوپروپانول بودند منتقل و سانتریفیوژ شد. RNA استخراج شده مجدداً در اتانول ۷۵ درصد ترکیب شد، مجدداً سانتریفیوژ شد و در H2O تیمار شده با دی اتیل DEPC ترکیب شد.

DNA مکمل (cDNA) از RNA استخراج شد سپس با افزودن ۱۰ میکرولیتر بافر واکنش (2X)، ۵ میکروگرم از RNA استخراج‌شده، ۲ میکرولیتر آنزیم مخلوط به مقدار کافی آب تیمار شده با DEPC در لوله‌های بدون RNase برای تشکیل ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ٦۰ دقیقه در دمای

۴۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. واکنش با حرارت دادن در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه متوقف شد و مخلوط روی یخ نگهداری شد.

طراحی پرایمر

پرایمرهای Ifn-γ و GAPDH (به عنوان ژن استاندارد) با استفاده از Oligo 7 طراحی شدند. برای اطمینان از خلوص RNA از الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. پرایمرها با استفاده از NCBI برای RT-PCR پس از سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتزcDNA طراحی شدند. هر واکنش PCR با استفاده از Applied Biosystems PCR master mix و SYBR گرم een در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems. Focter City,) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. GAPDH به عنوان یک ژن استاندارد استفاده شد که برای هر ژن در همان مرحله تکثیر شد.

جدول ۱: پرایمر های مورد استفاده بر اساس NCBI

Genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
IFN-gamma	ACTCTGATTGCGGGGTTGTATCT	ATCTCCTCCCATCAGCAGCAC
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

تحلیل آماری نتایج

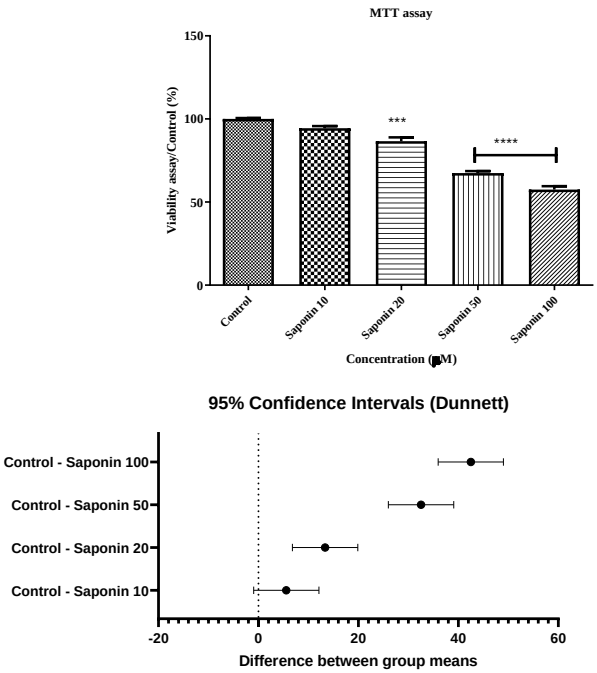
نتایج بدست آمده به صورت داده‌های اولیه با استفاده از نرم افزار Prism (Graph Pad Prism 5.04) و تست One way-Anova و Tukey مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس مقایسه میانگین‌ها با در نظر گرفتن انحراف معیار (±SE) و * برای $P<۰/۰۵$، * *برای $P<۰/۰۱$ و *** برای $P<۰/۰۰۱$ انجام پذیرفت.

نتایج

تجزیه و تحلیل MTT

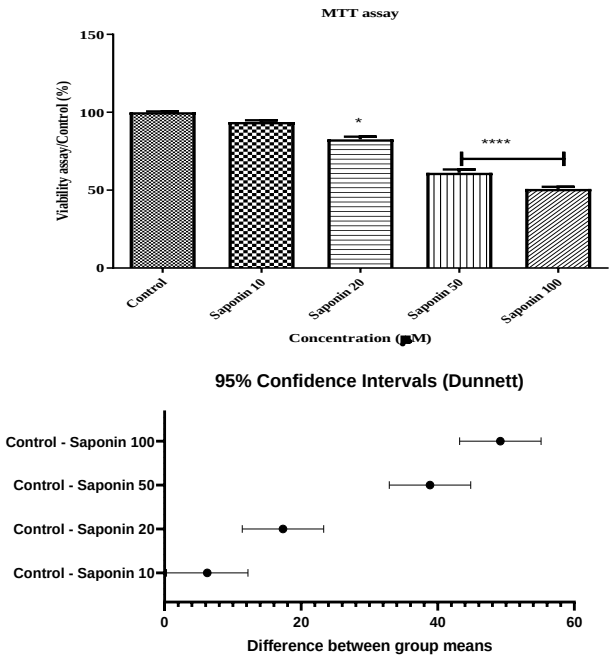
نتایج به‌وسیله سنجش MTT ارائه‌شده در شکل‌های ۳ و ٤، درصد مقادیر زنده‌مانی دو رده سلولی مختلف را نشان می‌دهد که به مدت ٤٨ ساعت با عصاره انکوبه شده‌اند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، با افزایش غلظت نمونه‌های افزودنی، درصد زنده‌مانی سلول کاهش یافت. در حالی که در چاهک های کنترل مثبت (Cells + DMEM) و سلول های تیمار شده با متانول به عنوان حلال، زنده ماندن سلول ها هیچ تغییری را پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون نشان نداد.

در سلول های5-MRC، در غلظت ۱۰۰–۱۰ میکرومول صعودی، میزان زنده ماندن سلول ها از ۹٤.٤۲ به ۵۷.٤۹ درصد کاهش یافت (شکل ۳ و ٤).



شکل ۳ : نتایج درصد زنده مانی سلولهای MRC5 در مواجهه با غلظت های مختلف ساپونین

در سلول‌هایA549 ، با افزایش غلظت نمونه، درصد زنده‌مانی سلول‌ها از ۹۳.۷۵ به ۵۰.۸۳ کاهش یافت. در هر دو سلول ارزیابی شده، این کاهش در زنده ماندن از نظر آماری معنی‌دار بود(P< ۰.۰۵) نشان‌دهنده سمیت سلولی معقول ساپونین است.



شکل ٤ : نتایج درصد زنده مانی سلولهای A549 در مواجهه با غلظت های مختلف ساپونین

در نهایت، نتایج به‌دست‌آمده از سنجش MTT نشان داد که ٤٨ ساعت انکوباسیون عصاره در سلول‌های ریه می‌تواند اثر سمی وابسته به دوز داشته باشد.

فعالیت ضد میکروبی

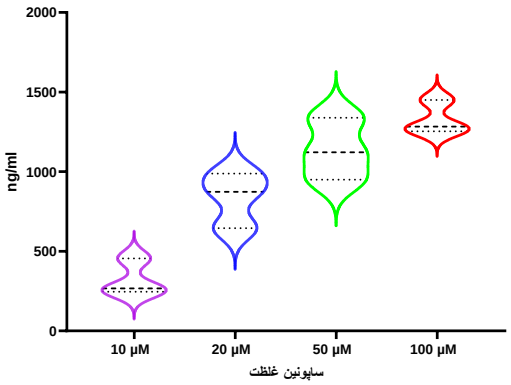
MIC، به عنوان یک ارزیابی فعالیت ضد میکروبی مناسب، نشان داد که ساپونین شیرین بیان علیه میکروارگانیسم مهم فعالیت ضد میکروبی دارد. بر اساس منطقه مهار مشاهده شده، توانایی فعالیت ضد باکتریایی عصاره های گیاهی به غلظت عصاره های گیاهی مورد استفاده بستگی دارد. در غلظت ١٠ میکرومول و ٢٠ میکرومول عصاره گیاهی، فاقد ناحیه مهاری بودند، در حالی که ٤٠ میکرومول و ١٠٠ میکرومول منطقه بازداری را مانند استانداردهای مورد استفاده نشان می دهد (جدول ٢) . میانگین ارزش ناحیه بازدارندگی نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاه به غلظت عصاره گیاه بستگی دارد.

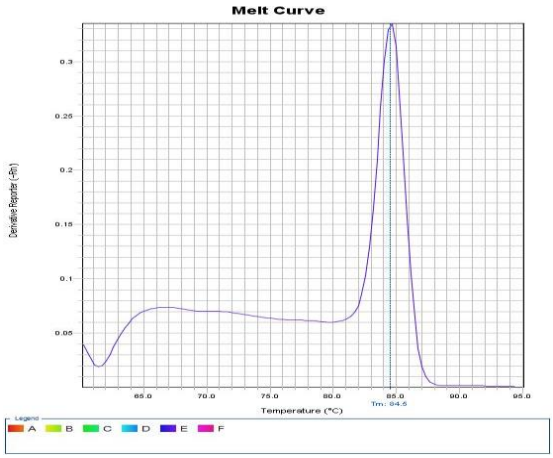
RT-PCR کمی

میزان بیان اینترفرون نکرون گاما با استفاده از آنالیز Real Time PCR با استفاده از GAPDH به عنوان یک ژن مرجع مورد بررسی قرار گرفت. بیان mRNA در غلظت ١٠ اختلاف معنی داری با غلظت ٢٠ ($P<0.05$) ، ٥٠ ($P<0.001$) و ١٠٠ ($P<0.001$) نشان داد. همچنین غلظت ٢٠ با غلظت ١٠٠ اختلاف آماری معنی داری ($P<0.05$) را نشان داد در حالی که این اختلاف در مقایسه دو غلظت ٢٠ و ٥٠ و غلظت های ٥٠ با ١٠٠ از لحاظ آماری معنی دار نبود.

جدول ٢ : ارزیابی برون تنی اثرات مهاری غلظت های مختلف ساپونین بر علیه باکتری استرپتوکوکوس در مقایسه با کنترل

باکتری	منطقه مهاری				باکتری
	غلظت ساپونین (میکرومول)				
گرم	١٠٠	٤٠	٢٠	١٠	
	٢١.٩	١٧.٦	٦.٤	-	*S. pneumoniae*
مثبت	١٩.٣				*Penicillin (10 µg/disc)*





بحث

با توجه به گسترش ذات الریه باکتریایی، به عنوان یک پاتوژن اولیه یا عارضه ای که با ذات الریه ویروسی همراه است، قطعاً در کنار درمان های شیمیایی برای کاهش دیسترس تنفسی، سرفه و التهاب درمان های گیاهی پیشنهاد شده است. همچنین نشان داده شده است که درمان ترکیبی طب سنتی با آنتی‌بیوتیک‌ها، گشادکننده‌های برونش و داروهای ضدالتهاب می‌تواند مؤثرتر باشد. ساپونین‌ها رادیکال‌های آزاد مختلف مهار می‌کنند، در نتیجه از اکسیداسیون لیپیدها از طریق یک واکنش شکستن زنجیره جلوگیری می‌کنند و می‌توانند به عنوان داروها و مواد مغذی بالقوه عمل کنند. ساپونین دارای خواص ضد التهابی و ضد باکتریایی است که می‌تواند اثرات نامطلوب میکروارگانیسم‌های مرتبط با عفونت‌های ریوی را بهبود بخشد(۱۵). این مطالعه بر روی اثر ساپونین به عنوان آنتی میکروبیال و القای اثرات ضد التهابی در مدل سلولی متمرکز شد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات درمانی ساپونین‌های جدا شده از ریشه گیاه شیرین بیان برای درمان عفونت‌های باکتریایی بود. ساپونین احتمالا به دلیل خاصیت ضد باکتریایی با مهار هجوم نوتروفیل‌ها سطح بیان Ifn-γ افزایش میدهد.

Ifn-γ نقش اساسی در دفاع بدن در برابر بیماری‌های عفونی آلوئولی ایفا می‌کند و به عنوان یک واسطه مهم در ایمنی ضد ویروسی و پاسخ‌های التهابی شناخته می‌شود. بنابراین، Ifn-γ، به عنوان یک سیتوکین پلیوتروپیک، اثرات خود را با اتصال به یک گیرنده منفرد، که در اکثر انواع سلول‌ها و متعاقباً در پنومونی ویروسی و باکتریایی بیان می‌شود، اعمال می‌کند و به طور مداوم در سطوح سرمی افزایش می‌یابد(۱۶).Ifn-γ همچنین نقش حیاتی در کنترل چرخه سلولی، رشد و آپوپتوز دارد و به نظر می‌رسد با فعال کردن مسیرهای ضد میکروبی و افزایش لکوسیت‌ها به ایمنی ذاتی و اختصاصی کمک می‌کند . این داده‌ها در توافق با مطالعات قبلی، نقش پیچیده Ifn-γ را در ایمنی ذاتی در طول عفونت ریوی و پس از درمان با داروهای مبتنی بر طبیعی و داروهای نانو گیاهی نشان می‌دهند(۱۷,۱۸) .

ساپونین‌های استخراج شده از ریشه *Glycyrrhiza glabra* دارای خواص ضدمیکروبی و ضد التهابی است که اثرات مهاری بر روی باکتری در مقایسه با گروه کنترل نشان میدهد. استرس اکسیداتیو و التهاب نقش مهمی در پاتوژنز در پنومونی ایفا می‌کنند(۱۹). استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک)، در ۵ تا ۴۰ درصد دستگاه تنفسی فوقانی افراد سالم وجود دارد و عامل ایجاد پنومونی، باکتریمی و سایر پروسه های عفونی معرفی شده است . سپتیسمی، منتژیت، عفونت گوش میانی، سینوزیت، برونشیت، باکتریمی ناشی از پنومونی نیز میتواند به عفونتهای شدیدتر مانند منتژیت، اندوکاردیت و آرتریت عفونی منجر شود استرپتوکوکوس پنومونیه به واسطه اهمیت آن به عنوان عامل بیماری در انسان، بهطور گسترده در قرن گذشته در سطوح بالینی و علوم پایه موردبررسی قرارگرفته است . پنوموکوک، مسئول ۱۱ درصد از مرگ ومیرهای کودکان زیر ۵ سال ماهه بدون در نظر گرفتن مرگ ومیر پنوموکوکی در کودکان مبتلا به ایدز، معرفی شده است که باید اقدامات پیشگیرانه و درمانی، به ویژه در مناطق با شیوع بالای بیماری، به عمل آید(۲۰,۲). ساپونین ها ترکیبات زیست آلی هستند که در انواع غذاها و گیاهان یافت می شوند. دارای خواص سیتوتوکسیک، محرک ایمنی، آنتی اکسیدان، ضد التهاب و ضد سرطان است. آنتی اکسیدان های قوی به نام ساپونین از سلول ها در برابر اثرات مخرب رادیکال های آزاد محافظت می کند و به جلوگیری از تغییرات DNA که ممکن است منجر به بیماری هایی مانند سرطان شود، کمک می کند. علاوه بر این، با کاهش ایجاد پلاک های آترواسکلروتیک در رگ های خونی، خواص آنتی اکسیدانی این ماده به جلوگیری از

حملات قلبی و سکته کمک می کند. سیستم ایمنی انسان برای از بین بردن یا کنترل موثر هر گونه تهدید بیماری زا و از بین بردن سلول های سرطانی که دستخوش تغییر خود شده اند توسعه یافته است(۹,۲۱).

در این زمینه، IFN-γ نقش مهمی در شناسایی و حذف پاتوژن ها ایفا می کند. IFN-γ که به عنوان واسطه اولیه ایمنی با واسطه سلولی عمل می کند، ظرفیت سازماندهی انواع فعالیت های ضد میکروبی را دارد. ایمنی در برابر عوامل بیماری زا در درجه اول توسط فعالیت IFN-γ تنظیم می شود. نقش مهم IFN-γ در ایجاد محافظت در برابر عفونت های مختلف باکتریایی. ترشح IFN-γ توسط زیرمجموعه سلول های T کمکی CD4+ نقشی حیاتی در فعال کردن سلول های موثر و القای پاسخ آنتی بادی به پاتوژن ها ایفا می کند. علاوه بر این، اثرات محافظتی IFN-γ در عفونت های ویروسی مشهود است، همانطور که با افزایش بقای نورون های آلوده به ویروس واریسلا زوستر به دنبال درمان IFN-γ نشان داده شده است(۲۲). بنابراین، با توجه به اثر ساپونین بر ترشح IFN-γ ، می توان آن را به عنوان یک عامل درمانی جدید در کنترل بیماری های عفونی به عنوان یک تعدیل کننده ایمنی طبیعی معرفی کرد. از سوی دیگر با توجه به غلظت های استفاده شده در کنترل و مهار پاتوژن ، استفاده از ۲۰ میکرومول ساپونین نقش کمکی در مهار پاتوژن دارد.

نتایج نشان می دهد که عصاره شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) طیف وسیعی از اثرات ضد میکروبی (منطقه مهاری ۲۱.۹–٦.٤ میلی متر) را بر علیه باکتری های گرم مثبت با استفاده از روش انتشار آگار نشان می دهد که مطابق با یافته های گزارش شده توسط جلال و زهرا. با توجه به نتایج ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی، *S. pneumoniae* اثر ضد باکتریایی را در غلظت‌های بین ۲۰ تا ۱۰۰میکرومول نشان داد که در نتیجه مناطق مهاری با اندازه‌های ٦.٤ تا ۲۱.۹ میلی‌متر ایجاد شد. خواص ضد باکتری G. glabra توسط اسد و همکاران بررسی شد(۱۹). یافته‌های آن‌ها نشان داد که عصاره متانولی ۸۰ درصد به‌طور معنی‌داری در برابر سویه‌های *B. subtilis* و *E. coli* با مناطق بازدارندگی به ترتیب ۳۰ میلی‌متر و ۲۸.۵ میلی‌متر و کمترین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) در mg/ml 12.2 و ۲۰.۱ میلی گرم در میلی لیتر. در مقابل، سویه *S. aureus* نشان داد. از آنجایی که داروهای شیمیایی دارای معایبی هستند و مقاومت آنتی بیوتیکی در حال افزایش است، محققان به دنبال جایگزین هایی هستند که می تواند سلامت انسان را بهبود بخشد. مطالعه ما فعالیت ضد باکتریایی و سیستم ایمنی ساپونین ها را در برابر باکتری گرم مثبت *S. pneumoniae* ارزیابی کرد. ماده اصلی گلیسیریزا گلابرا، ساپونین، دارای خواص ضد باکتری، ضد درد، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است که به کاهش نشانگرهای استرس اکسیداتیو ناشی از عفونت های ویروسی کمک می کند. نتایج این تحقیق با مطالعه‌ای که قبلا منتشر شده بود مطابقت دارد که نشان می‌دهد فلاونوئیدها و ساپونین‌ها اما نه آلکالوئیدها در عصاره آبی شیرین بیان وجود دارند. علاوه بر این، یافته‌های این تحقیق از یافته‌های قبلی حمایت می‌کند که ادعا می‌کرد تانن، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها در عصاره آبی وجود دارد(۲۳) .

نتیجه‌گیری نهایی

خواص ضد التهابی و ضد میکروبی ساپونین ، که با افزایش بیان Ifn-γ مرتبط است، نشان می‌دهد که استفاده از دوزهای مناسب ساپونین ممکن است در درمان پنومونی بدون تأثیر نامطلوب مؤثر باشد. از سوی دیگر، اثرات مهاری این فراورده با خاصیت کشندگی پایین حتی در دوزهای بالاتر از دوزهای درمانی ثابت شده در مطالعات قبلی بیان گر عوارض کم یا بدون عارضه بودن این فراورده در درمان عفونت های باکتریایی هست.

فهرست منابع

1. Biscevic-Tokic J, Tokic N, Musanovic A. Pneumonia as the most common lower respiratory tract infection. Med Arch. 2013;67(6):442 .
2. Paton JC, Trappetti C. Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide. Microbiol Spectr. 2019;7(2):2–7 .
3. Singh S, Khan A, Chowdhry M, Bilal M, Kochhar GS, Clarke K. Risk of Severe

Coronavirus Disease 2019 in Patients With Inflammatory Bowel Disease in the United States: A Multicenter Research Network Study. Gastroenterology. 2020 Oct;159(4):1575-1578.e4 .
4. Hu R, Lin C, Xu W, Liu Y, Long C. Ethnobotanical study on medicinal plants used by Mulam people in Guangxi, China. J Ethnobiol Ethnomed [Internet]. 2020;16(1):40. Available from: https://doi.org/10.1186/s13002-020-00387-z
5. Hosseini SH, Bibak H, Ghara AR, Sahebkar A, Shakeri A. Ethnobotany of the medicinal plants used by the ethnic communities of Kerman province, Southeast Iran. J Ethnobiol Ethnomed [Internet]. 2021;17(1):31. Available from: https://doi.org/10.1186/s13002-021-00438-z
6. Eghlima G, Kheiry A, Sanikhani M, Hadian J, Aelaei M, Ebrahimi SN. Glycyrrhiza glabra L. Int J Hort Sci Technol; Vol. 2020;7 .(٤)
7. Peng F, Du Q, Peng C, Wang N, Tang H, Xie X, et al. A review: the pharmacology of isoliquiritigenin. Phyther Res. 2015;29(7):969–77 .
8. Shirazi Z, Piri K, Asl AM, Hasanloo T. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of Glycyrrhiza glabra. J Med Plants Res. 2012;6(31):4640–6 .
9. Colak F, Genisel M, Uras IS. Evaluation of Glycyrrhiza Species as Medicinal Plant. Vol. 2, Anatolian Journal of Biology. 2021 .
10. Juang YP, Liang PH. Biological and pharmacological effects of synthetic saponins. Molecules. 2020;25(21):4974 .
11. Oleszek W, Marston A. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. Vol. 45. Springer Science & Business Media; 2013 .
12. Mohammed ZH, al-Samarrai NAH, Mahmood RT. Detection of the bacterial activity of saponins and some mineral elements in the local aqueous extract of licorice. J Popul Ther Clin Pharmacol. 2023;30(2):232–9 .
13. Zhang Q, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). J Chromatogr A. 2009;1216(11):1954–69 .
14. Safdarpour S, Eftekhari Z, Eidi A, Doroud D. Encapsulated saponin by ferritin nanoparticles attenuates the murine pneumococcal pneumonia. Microb Pathog. 2022;172:105731 .
15. Mohammadi Z, Pishkar L, Eftekhari Z, Barzin G, Babaeekhou L. Evaluation of the Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Cultivated Valeriana officinalis. Plant Sci Today. 2024;11(1):145–55 .
16. Elbestawy MKM, El-Sherbiny GM, Moghannem SA. Antibacterial, Antibiofilm and Anti-Inflammatory Activities of Eugenol Clove Essential Oil against Resistant Helicobacter pylori. Molecules [Internet]. 2023;28(6). Available from: https://www.mdpi.com/1420-3049/28/6/2448
17. Sun HX, Pan HJ. Immunological adjuvant effect of Glycyrrhiza uralensis saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine. 2006;24(11):1914–20 .
18. Mah AY, Cooper MA. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN-γ Production. Crit Rev Immunol. 2016;36(2):131–47 .
19. Gao DK, Salomonis N, Henderlight M, Woods C, Thakkar K, Grom AA, et al. IFN-γ is essential for alveolar macrophage-driven pulmonary inflammation in macrophage activation syndrome. JCI insight. 2021 Sep;6 .(١٧)
20. Xiao H, Zhao Q, Yuan J, Liang W, Wu R, Wen Y, et al. IFN-γ promotes PANoptosis in Pasteurella multocida toxin-induced pneumonia in mice. Vet Microbiol. 2023 Oct;285:109848 .
21. Abbas A, Zubair M, Rasool N, Rizwan K. Antimicrobial potential of Glycyrrhiza glabra. J Drug Des Med Chem. 2015;1(2):17–20 .
22. Cillóniz C, Garcia-Vidal C, Ceccato A, Torres A. Antimicrobial Resistance Among

Streptococcus pneumoniae. Antimicrobial Resistance in the 21st Century. 2018. p. 13–38 .

23. Sharifi-Rad J, Quispe C, Herrera-Bravo J, Belén LH, Kaur R, Kregiel D, et al. Glycyrrhiza Genus: Enlightening Phytochemical Components for pharmacological and health-promoting abilities. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021 .
24. Guillo L, Rabaud C, Choy EH, D'Amico F, Danese S, Ng SC, et al. Herpes Zoster and Vaccination Strategies in Inflammatory Bowel Diseases: A Practical Guide. Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2022;20(3):481–90. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356520314403
25. Marotti I, Truzzi F, Tibaldi C, Negri L, Dinelli G. Evaluation of licorice (Glycyrrhiza glabra L.) as a novel microgreen from the anti-inflammatory potential of polyphenols. AIMS Agric Food. 2021;6:1–13.