

اثر عصاره آبی - الکلی ریزوم گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر فعالیت مکانیکی کولون ایزوله موش صحرائی نر و تداخل اثر آن با سیستم کولینرژیک

ناهید قایدی^۱، امین الله بهاءالدینی^۱، سیداسماعیل خوشنام^{۲*}

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، اهواز، ایران

* آدرس مکاتبه: گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

تلفن: ۰۹۱۷۱۴۹۱۷۲۹، نمابر: ۳۷۳۸۲۴۸ (۰۶۱۱)

پست الکترونیک: esmaeil.khoshnam1392@gmail.com

تاریخ تصویب: ۹۵/۴/۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۹

چکیده

مقدمه: گیاه شیرین بیان (*Licorice*) از گیاهان دارویی بومی ایران است که در طب سنتی برای درمان زخم معده و رفع گرفتگی روده مورد استفاده بوده است.

هدف: در تحقیق حاضر تأثیر عصاره آبی و الکلی ریزوم شیرین بیان بر حرکات کولون ایزوله موش صحرائی نر به روش زیر مطالعه شد. روش بررسی: در این مطالعه تجربی، بافت کولون تعداد ۱۰ سر موش صحرائی نر بالغ جدا و به دو گروه آزمایش و کنترل تقسیم شدند که هر گروه شامل ۱۰ قطعه بافت بوده است. قطعات به ترانسدیوسر نیرو به صورت طولی آویزان شده و به درون حمام‌های بافتی محتوی محلول تیروید اکسیژنه ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH} = 7.4$ فرو برده شدند. فعالیت مکانیکی قطعات توسط دستگاه پاورلب در حالت پایه، در پاسخ به استیل کولین ($10^{-6} \times 4$ مولار) و آتروپین (10^{-6} مولار) در حضور و عدم حضور عصاره ریزوم شیرین بیان ($0.36/1$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ثبت شد. همچنین فعالیت مکانیکی قطعات گروه کنترل در شرایط مشابه با حلال عصاره (اتانول ۷۰ درصد) ثبت شد.

نتایج: در حضور عصاره آبی الکلی شیرین بیان، فعالیت مکانیکی بافت در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. همچنین کاهش معنی‌داری در فعالیت مکانیکی بافت در گروه آزمایش در حضور توأم عصاره و استیل کولین در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. در حالی که فعالیت مکانیکی بافت در حضور توأم عصاره و آتروپین بین دو گروه کنترل و آزمایش تفاوت معنی‌داری نداشته است.

نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه گرفت که عصاره آبی- الکلی ریزوم شیرین بیان دارای اثر تعدیل‌کنندگی بر حرکات کولون می‌باشد که احتمالاً این اثر به صورت مستقل از سیستم کولینرژیک است.

کل واژگان: شیرین بیان، فعالیت مکانیکی، کولون، کولینرژیک



مقدمه

در سال‌های اخیر تقاضا و مصرف گیاهان دارویی به طور چشمگیری افزایش داشته است و این گیاهان برای قرن‌ها در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده بوده‌اند [۱]. شیرین بیان یکی از گیاهان سنتی دارویی است که بومی مناطق مدیترانه بوده و در ایران بیشتر در شیراز، کرمانشاه و کردستان می‌روید. این گیاه علفی و چندساله از تیره نخودیان (Fabaceae) و با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. می‌باشد. نام یونانی *glycyrrhiza* از دو واژه *glycys* به معنی شیرین و *rhiza* به معنی ریشه مشتق شده است. ترکیبات مهمی در ریشه و ساقه‌های زیرزمینی این گیاه جهت مصارف دارویی وجود دارد [۲]. ترکیبات اصلی شیرین بیان شامل ساپونین‌ها، فلاونوئیدها - نظیر لیکوریتین و ایزولیکوریتین، ایزوفلاون‌ها، لیکورتی جنین چالکون، گلیسرین، کومارین‌ها و استیل بنوئیدها می‌باشد [۳]. از جمله ترکیبات شیرین بیان لیکورتی جنین می‌باشد که موجب دفع اسپاسم عضلانی می‌شود، همچنین در ریزوم شیرین بیان ترکیبی به اسم گلیسرین وجود دارد که دارای خواص ضد آلرژی می‌باشد [۴]. مهم‌ترین ویژگی ریزوم شیرین بیان، اثر آن بر سیستم گوارش بوده است. این گیاه در درمان التهاب معده مفید است [۵]. برخی مطالعات حاکی از تأثیر برخی ترکیبات عصاره شیرین بیان بر دستگاه گوارش می‌باشند. از جمله بررسی اثر ایزولیکورتی جنین (*Isoliquiritigenine*)، از ترکیبات فلاونوئیدی شیرین بیان، بر ژوژنوم که مشخص شده دارای اثر ضد اسپاسم در ژوژنوم ایزوله خرگوش و ایلئوم کوچک هندی می‌باشد [۶]. ریشه شیرین بیان برای ویژگی تسکین‌دهندگی و خلط‌آوری استفاده می‌شده است [۷]. همچنین، در طب سنتی ریزوم شیرین بیان برای درمان گرفتگی عضلات، روماتیسم، آسم، عفونت‌های قفسه سینه، افزایش صفرا، هپاتیت، بیماری‌های پوستی و تنفسی، تب، سرفه، آسم، نقرس، ورم لوزه، نفخ شکم، یرقان، سکسکه، آنمی، زخم گلو و خونریزی، داروی ملین (ضد یبوست)، داروی مدر و جلوگیری‌کننده از آبستنی مورد استفاده بوده است [۸، ۹]. شیرین بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان گاستریت، عفونت‌های تنفسی و

زخم‌های پپتیک استفاده می‌شده است [۱۰]. در طب سنتی چین نیز در درمان هپاتیت، جلوگیری از رشد تومور و بیماری‌های قلبی کاربرد داشته است [۱۱]. در طب سنتی ایران نیز به عنوان درمان ورم معده و ضدسرفه مورد استفاده بوده است [۱۲]. امروزه عصاره شیرین بیان در شربت سرفه استفاده می‌شود [۱۳].

استیل کولین نوروترانسمیتر اصلی در دستگاه گوارش است که از طریق گیرنده‌های موسکارینی موجب انقباض عضله صاف روده می‌شود [۱۴، ۱۵]. پنج نوع گیرنده موسکارینی (M1-M5) در غشاء عضله صاف و نورون‌های کولینرژیک سیستم گوارش مشخص شده است [۱۶]. نیتریک اکساید یک ماده مهم درون‌زاد می‌باشد که با اثرات شل‌کنندگی خود، نقش مهمی در حرکات روده‌ای دارد [۱۷].

از آنجایی که گیاه شیرین بیان در طب سنتی استفاده فراوانی داشته و اثرات درمانی وسیعی بر بیماری‌هایی مانند زخم معده، آترواسکلروزیس و بیماری‌های پیچیده نظیر سرطان داشته است [۱۸]، و با توجه به گزارش‌ها و ابهامات موجود در زمینه تأثیر مشتقات شیرین بیان بر دستگاه گوارش، در تحقیق حاضر تأثیر عصاره آبی - الکلی ریزوم شیرین بیان بر حرکات روده بزرگ و تداخل اثر آن با سیستم‌های کولینرژیک و نیتروژیک مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به استفاده روز افزون از گیاه دارویی شیرین بیان در طب سنتی و طب امروزی، بررسی اثرات این گیاه بر فعالیت مکانیکی عضلات صاف قسمت‌های مختلف سیستم گوارش حائز اهمیت می‌باشد. مطالعه حاضر نیز با هدف بررسی اثرات عصاره ریزوم شیرین بیان بر فعالیت مکانیکی کولون (روده بزرگ) ایزوله صورت گرفته که در صورت مشخص شدن اثر مثبت ریزوم این گیاه بر فعالیت مکانیکی روده بزرگ، استفاده از آن برای درمان اسهال و اسپاسم روده بزرگ می‌تواند مفید واقع شود، زیرا یکی از اهداف محققین یافتن گیاهان و یا ترکیبات با تأثیر کاهنده بر حرکات روده می‌باشد که افزایش آن از علل بروز اسهال است [۱].

برای مشخص شدن مکانیسم و اثر عصاره این گیاه دارویی، در تحقیق حاضر تأثیر عصاره آبی - الکلی ریزوم شیرین بیان بر



اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی نظیر بیهوشی و جراحی، تحت نظر کمیته اخلاق زیستی بخش زیست‌شناسی با کد اخلاق SU900786 انجام شد.

روش انجام آزمایش

بعد از یک هفته و حصول اطمینان از سلامت حیوان، با اثر بیهوش شده سپس شکم حیوان باز شده و پس از شناسایی کولون، از بخش انتهایی آن (کولون دیستال) برش تهیه شد. برش مورد نظر بدون آنکه آسیبی به اپیتلیوم و عضله آن وارد شود، فراهم شد [۱۶]. بافت به پتری‌دیش حاوی محلول تیروید (۳۷ درجه سانتی‌گراد) منتقل شد و به قطعات ۱ سانتی‌متری تقسیم شد، برای تجویز هر دارو قطعه مجزا به کار می‌رفت. جهت تهیه ۱ لیتر محلول تیروید از مواد: NaCl (۸ گرم)، CaCl_2 (۰/۲ گرم)، KCl (۰/۲ گرم)، MgCl_2 (۰/۱ گرم)، NaH_2PO_4 (۰/۰۵ گرم)، NaHCO_3 (۱ گرم)، گلوکز (۱ گرم) استفاده شد. pH محلول تیروید در تمام طول آزمایش توسط pH متر اندازه‌گیری می‌شد تا در حد خشتی (۷/۴) باشد [۲۱]. بافت کولون موش‌های صحرایی بعد از جداسازی به دو گروه آزمایش و کنترل تقسیم شدند که هر گروه شامل ۱۰ قطعه بافتی بوده است.

- بافت‌های گروه آزمایش به ترتیب عصاره شیرین‌بیان، داروی استیل‌کولین، داروی آتروپین، تجویز توأم عصاره و استیل‌کولین، تجویز توأم عصاره و آتروپین دریافت می‌کردند.

- بافت‌های گروه کنترل تجویز توأم حلال عصاره شیرین‌بیان (اتانول ۷۰ درصد) و داروی استیل‌کولین، همچنین تجویز توأم حلال عصاره و داروی آتروپین را دریافت می‌کردند.

لازم به ذکر است که داروی آتروپین و استیل‌کولین جهت بررسی تداخل اثر عصاره شیرین‌بیان با سیستم کولینرژیک استفاده شد.

دو قطعه کولون به طور همزمان به دو حمام بافتی حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محلول تیروید منتقل شده و هر قطعه

حرکات روده بزرگ و تداخل اثر آن با سیستم کولینرژیک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

جهت فرایند عصاره‌گیری، ریزوم شیرین‌بیان از زمین‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز جمع‌آوری و پس از شناسایی علمی توسط متخصص گیاه‌شناسی، تحت نظر متخصص فارماکولوژی دانشکده داروسازی به روش پرکولاتور عصاره‌گیری انجام شد، به این صورت که ریزوم‌های تهیه شده در سایه خشک شد و پس از پودر کردن آن وزن خشک پودر یادداشت شد (۶ کیلوگرم). سپس پودر به دست آمده در دستگاه پرکولاتور قرار داده شد. اتانول ۷۰ درصد (۷۳ میلی‌لیتر اتانول و ۲۷ میلی‌لیتر آب مقطر) به اندازه‌ای (به پودر اضافه شد تا فضای بین پودر شیرین‌بیان را پر کرده و به طور کامل روی سطح پودر را بپوشاند. پس از گذشت نیم ساعت از نفوذ حلال در پودر شیرین‌بیان، اتانول ۷۰ درصد مجدداً اضافه شد (مقدار الکل مصرفی در طی فرایند عصاره‌گیری تقریباً ۲ برابر مقدار پودر بود). طی ۲۴ ساعت فشار ناشی از دستگاه پرکولاتور موجب جمع شدن قطرات عصاره هیدروالکلی پودر گیاه شیرین‌بیان در ظرف شد. با استفاده از دستگاه روتاری عصاره تغلیظ‌سازی شد (غلظت اولیه عصاره ۳۷ درصد بود). زمان تغلیظ بسته به نوع گیاه، متفاوت است [۲۰].

حیوانات

تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با میانگین وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم به طور تصادفی انتخاب شدند. موش‌های صحرایی در شرایط کنترل شده نور (سیکل ۱۲ ساعته تاریکی و روشنایی) و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دسترسی به آب و غذای کافی نگهداری شده در حالی که ۱۲ ساعت قبل از بیهوش کردن حیوانات غذای آنها قطع می‌شد و فقط به آب دسترسی داشتند. پس از ۱۲ ساعت حیوانات توسط اتر بیهوش و تحت عمل جراحی قرار می‌گرفتند. مسائل



سیستم کولینرژیک و مهارکننده سیستم نیتروژیک چگونگی اثرگذاری عصاره مورد بررسی قرار گرفت.

برای مطالعه سیستم کولینرژیک از استیل کولین به عنوان آگونیست گیرنده‌های موسکارینی استفاده شد. بعد از ثبت تانسین پایه بافت‌ها به حمام بافتی هر دو گروه کنترل و آزمایش داروی استیل کولین (تهیه شده از شرکت سیگما-آلدریچ آلمان) به عنوان داروی آگونیست این سیستم با دوز 4×10^{-6} مولار اضافه و مدت ۵ دقیقه فعالیت مکانیکی بافت کولون ثبت شد. پس از آن بافت‌ها شستشو داده شده تا حضور استیل کولین از محیط کاملاً حذف شود و سپس به بافت‌ها اجازه داده شد تا به حالت استراحت برگردند و تانسین پایه ثبت شد. پس از آن به گروه آزمایش عصاره با دوز مؤثر $0.036/0$ میلی گرم بر میلی لیتر (معادل 43 میکروگرم بر میلی لیتر) اضافه شد و به گروه کنترل به همین میزان حلال عصاره (الکل 70 درصد) اضافه شد و به مدت 30 دقیقه فعالیت مکانیکی قطعات ایلئوم ثبت شد پس از این مدت که اثر شل‌کنندگی عصاره نیز ظاهر شده بود مجدداً به هر دو حمام استیل کولین با همان دوز ذکر شده، اضافه شد تا در این مرحله تأثیر توام استیل کولین و عصاره بر فعالیت مکانیکی بافت مشخص شود. در ادامه‌ی آزمایش جهت بررسی اثر آنتاگونیست سیستم کولینرژیک از داروی آتروپین (تهیه شده از شرکت سیگما-آلدریچ آلمان) استفاده شد که برای این منظور، قطعات جدید کولون به مانند روند مرحله قبل (سیستم کولینرژیک) تهیه شده، بعد از اضافه نمودن عصاره داروی استیل کولین اضافه شده و بعد از مشاهده اثر داروی استیل کولین در گروه کنترل و آزمایش، داروی آتروپین با دوز 10^{-6} مولار به حمام بافتی گروه کنترل (حلال عصاره + استیل کولین) و آزمایش (عصاره + استیل کولین) اضافه شده و فعالیت مکانیکی قطعات کولون ثبت شد. شایان ذکر است که بعد از پدیدار شدن اثر هر دارو در مرحله اول آزمایش یعنی قبل از تجویز

کولون به صورت طولی توسط دو قلاب در محلول تیروید قرار می‌گرفت، یک قلاب کولون را در حمام بافتی ثابت نگه داشته و قلاب دیگر بافت را به ترانسدیوسر نیرو از نوع ایزوتونیک متصل می‌کرد. تغییرات انقباضی عضله کولون به ترانسدیوسر نیرو منتقل شده و ترانسدیوسر نیز به دستگاه بریج آمپلی‌فایر و سیستم power lab A-to-D متصل بوده و توسط نرم‌افزار chart-5 کالیبره شده و به این ترتیب تغییرات مکانیکی بافت به سیگنال‌های الکتریکی تبدیل شده و توسط مانیتور کامپیوتر قابل مشاهده و ارزیابی بود. در حالی که بافت در محلول تیروید غوطه‌ور بود، توسط دستگاه water circulator و ترموستات مربوطه دمای 37 درجه سانتی‌گراد برقرار بود و به طور دائم با 95 درصد اکسیژن و 5 درصد دی‌اکسید کربن هوادهی می‌شد، پس از نصب بافت‌ها و بعد از گذشت مدت زمان لازم و به تعادل رسیدن بافت‌ها با محیط در ابتدا تانسین پایه بافت‌ها تحت کشش یک گرم ثبت شد [۲۲].

آزمایش موازی و همزمان با یکدیگر بر روی ۲ قطعه بافت ایلئوم یک حیوان و با طول مشابه و در دو حمام بافتی صورت می‌گرفت. ابتدا برای حصول اطمینان از سلامت بافت‌ها، استیل کولین با دوز 10^{-5} مولار به هر دو بافت اضافه و فعالیت مکانیکی بافت‌ها ثبت شد و پس از گذشت ۵ دقیقه بافت‌ها شستشو داده شد و بعد از بازگشت بافت‌ها به حالت پایه و ثبت تانسین پایه به صورت تصادفی به یکی از بافت‌ها عصاره ریزوم شیرین‌بیان با دوز مؤثر $0.036/0$ میلی گرم بر میلی لیتر [۱۶] و به بافت دیگر حلال هم حجم عصاره (اتانول 70 درصد) اضافه شد و بعد از 60 دقیقه و به تعادل رسیدن بافت با شرایط محیط، به مدت 30 دقیقه فعالیت مکانیکی بافت ثبت شد. بافت دریافت‌کننده عصاره شیرین‌بیان بعنوان گروه آزمایش و بافت دریافت‌کننده حلال عصاره بعنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از داروهای آگونیست و آنتاگونیست

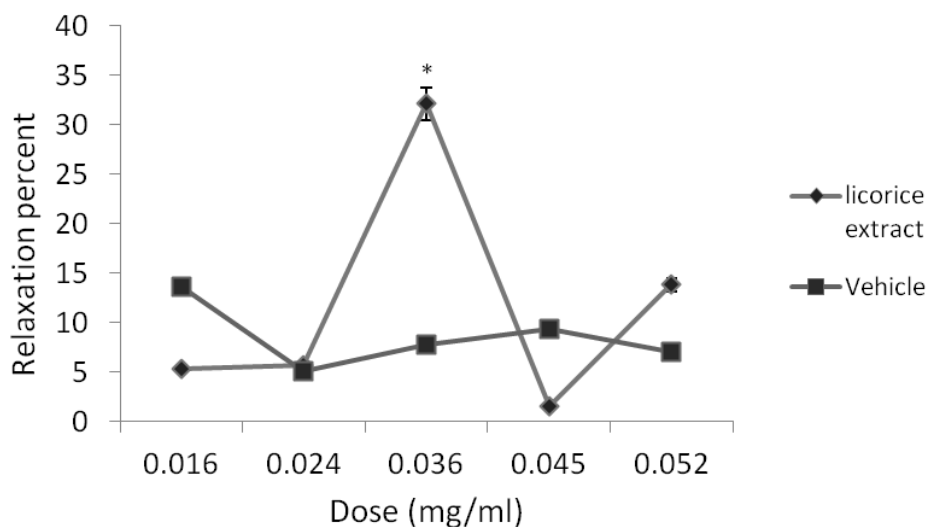


عصاره، چندین بار عمل شستشوی هر دو حمام را با محلول تیروید انجام می‌شد تا اثر داروها کاملاً حذف شود، سپس به بافت اجازه داده شد تا به حالت اولیه برسد و بعد از آن دوز مؤثر عصاره افزوده می‌شد. در نهایت داده‌های حاصل از این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها به کمک شاخص‌های آماری به صورت فراوانی و انحراف معیار \pm میانگین و در قالب نمودار بیان شد. ابتدا به منظور ارزیابی نرمالیتی داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون کلموگروف-اسمینزو استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Independent samples T test استفاده شد. همچنین سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

در نهایت داده‌های حاصل از این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها به کمک شاخص‌های آماری به صورت فراوانی و انحراف معیار \pm میانگین و در قالب نمودار بیان شد. ابتدا به منظور ارزیابی نرمالیتی داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون کلموگروف-اسمینزو استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Independent samples T test استفاده شد. همچنین سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

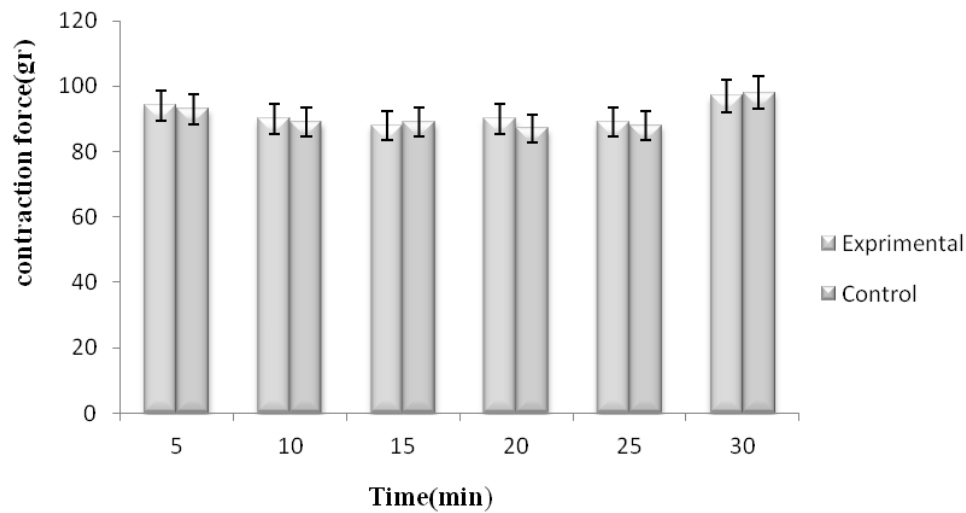
همانطور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود، فعالیت انقباضی کولون در پاسخ به تجویز استیل کولین به ترتیب در دو گروه آزمایش و کنترل بدون حضور عصاره و حلال عصاره تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد و فعالیت مکانیکی کولون در پاسخ به تجویز عصاره شیرین‌بیان در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل در نمودار شماره ۳ بیانگر کاهش معنی‌داری (P < ۰/۰۵) فعالیت مکانیکی بافت طی ۱۵ تا ۳۰ دقیقه می‌باشد. با تجویز استیل کولین پس از مشاهده اثر شل‌کنندگی عصاره، در ۱ و ۵ دقیقه تفاوت معنی‌داری (P < ۰/۰۵) در فعالیت انقباضی بافت در حضور عصاره نسبت به حلال در دو گروه آزمایش و کنترل مشاهده شد.

نتایج حاصل از شکل شماره ۴ نشان می‌دهد که فعالیت مکانیکی بافت در پاسخ به تجویز توام آتروپین و عصاره ریزوم شیرین‌بیان در دو گروه کنترل و آزمایش تغییرات معنی‌داری نداشته است.

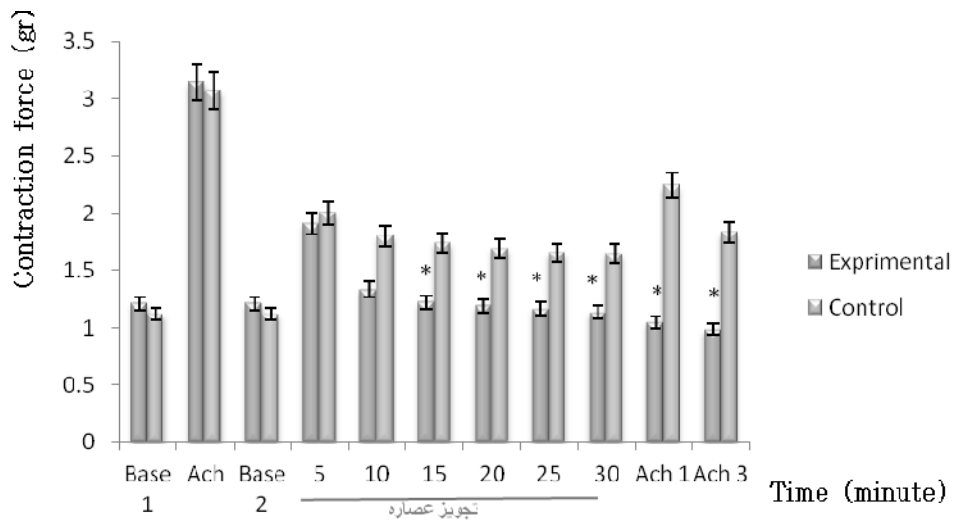


شکل شماره ۱- مقایسه درصد شل‌شدگی کولون ایزوله در حضور دوزهای مختلف عصاره شیرین‌بیان (گروه آزمایش) و حلال هم حجم آن (گروه کنترل) در موش‌های صحرایی نر، * P < ۰/۰۵ دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (اتانول ۷۰ درصد)





شکل شماره ۲- فعالیت مکانیکی بافت کولون ایزوله در شرایط پایه در دو گروه آزمایش (عصاره شیرین بیان) و کنترل (حلال عصاره)، گروه exp: گروه آزمایش، con: گروه کنترل

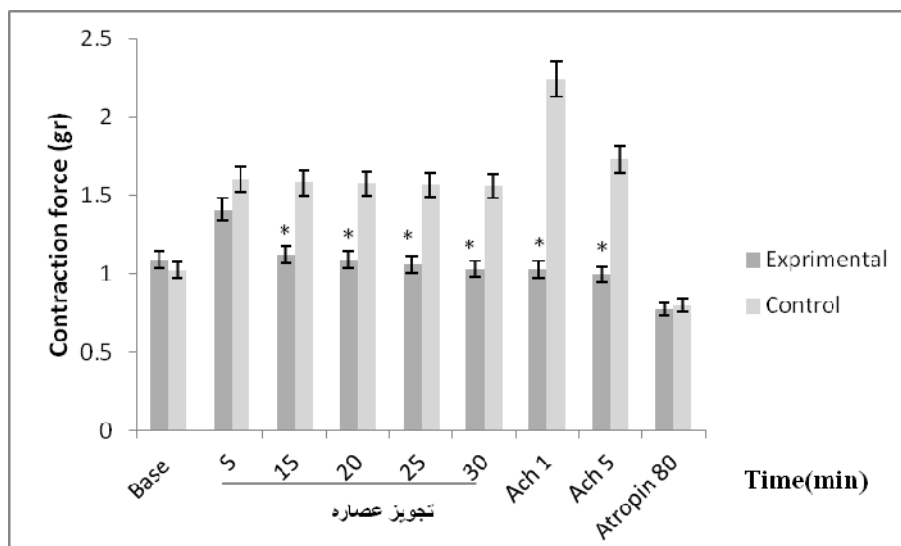


شکل شماره ۳- مقایسه میزان فعالیت انقباضی کولون ایزوله در پاسخ به دوز مؤثر عصاره ریزوم شیرین بیان در حضور استیل کولین (4×10^{-6} ach) مولار در بین دو گروه آزمایش و کنترل

base 1: تانسون پایه در شروع آزمایش، base 2: تانسون پایه قبل از افزودن عصاره،

ach: پاسخ بافت شل شده به استیل کولین به ترتیب در دقایق مختلف، *: تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$)





شکل شماره ۴- مقایسه میزان فعالیت انقباضی کولون ایزوله در پاسخ به دوز مؤثر عصاره ریزوم شیرین بیان در حضور آتروپین (Atropin) 10^{-6} مولار در بین دو گروه آزمایش و کنترل

base: تانسیون پایه در شروع آزمایش، lic (در دقایق مختلف): وضعیت فعالیت مکانیکی بافت با افزودن عصاره ریزوم ذکر شده در دقایق مختلف، Ach: افزودن داروی استیل کولین به بافت و وضعیت فعالیت مکانیکی در حضور عصاره و دارو در دقایق مختلف، Atropin: افزودن داروی آتروپین به بافت
*: تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$)

بحث

خرگوش و خوکچه بیانگر اثر ضد اسپاسمی ایزولیکورتی جنین در ژورنوم ایزوله خرگوش و ایلئوم خوکچه می باشد [۶]. تحقیقات فرخی پور و همکاران نشان دهنده اثرات شل کنندگی عصاره ریزوم شیرین بیان بر ایلئوم ایزوله بوده است [۲۶]. برخی مطالعات نیز بیانگر اثرات شل کنندگی عصاره بر عضله صاف عروق و نای ایزوله می باشند [۲۸، ۲۷]. بر اساس نتایج تحقیق حاضر و سایر تحقیقات انجام شده، می توان گفت عصاره ریزوم شیرین بیان دارای ترکیبات مهمی از جمله فلاونوئیدها می باشد که احتمالاً اثرات شل کنندگی عصاره ناشی از این ترکیبات بوده است [۳۰، ۲۹].

جهت بررسی تداخل اثر عصاره با سیستم کولینرژیک از داروهای آگونیست و آنتاگونیست سیستم کولینرژیک استفاده شد، همانطور که در بخش نتایج مشاهده شد میزان فعالیت مکانیکی کولون ایزوله موش صحرائی در حضور عصاره شیرین بیان در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان داد که این اثرات در حضور استیل کولین

از آنجایی که گیاه شیرین بیان در طب سنتی استفاده فراوانی داشته و گزارش هایی مبنی بر اثرات ضد اسپاسمی عصاره ریزوم شیرین بیان بر عضلات صاف از جمله روده باریک وجود دارد [۲۳، ۲۴]، لذا در تحقیق حاضر تأثیر عصاره آبی-الکلی ریزوم شیرین بیان بر حرکات روده بزرگ و تداخل اثر آن با سیستم کولینرژیک مورد بررسی قرار گرفته است.

در مطالعه حاضر مشاهده شد که در حضور عصاره ریزوم شیرین بیان فعالیت مکانیکی کولون ایزوله در موش های صحرائی نر کاهش معنی داری داشت، این کاهش فعالیت مکانیکی بیان کننده حضور ترکیباتی در عصاره شیرین بیان است که اثرات شل کنندگی بر عضله صاف کولون دارند. نتایج سایر محققین با تحقیق حاضر همخوانی دارد، از جمله ساتو (Sato) و همکاران نشان دادند که ایزولیکورتی جنین، فلاونوئید موجود در ریزوم شیرین بیان، اثرات ضد اسپاسمی در رکتوم دارد [۲۵]. همچنین تحقیقات چن (Chen) و همکاران در



شده، می‌توان اثرات عصاره بر سیستم کولینرژیک را به این ترکیبات فلاونوئیدی نسبت داد [۳۵ - ۳۳].

برای بررسی مکانیسم‌های فرضی اثر شل‌کنندگی عصاره ریزوم شیرین‌بیان بر کولون ایزوله باید به نقش کانال‌های کلسیمی و پتاسیمی توجه داشت زیرا این کانال‌ها در انقباض عضله صاف نقش مهمی دارند. در مطالعه‌ای که توسط Chen و همکاران انجام شد، نشان دادند که اثر ضد اسپاسمی ایزولیکورتی جنین، از فلاونوئیدهای ریزوم شیرین‌بیان، در ژوزنوم خرگوش و ایلئوم کوچک ناشی از مهار کانال‌های پتاسیمی بوده است [۶]. همچنین ناگای (Nagai) و همکاران اثرات ضد اسپاسمی ایزولیکورتی جنین در ایلئوم خوک و ژوزنوم خرگوش را ناشی از مهار کانال‌های کلسیمی دانسته‌اند [۳۶]. قریب ناصری و همکاران اثرات ضد اسپاسمی عصاره برگ شیرین‌بیان در ایلئوم را ناشی از کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP و تداخل با کانال‌های کلسیمی دانسته‌اند [۱۹]. بنابراین ممکن است اثرات ضد اسپاسمی شیرین‌بیان در کولون ناشی از فعال شدن کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP و مهار کانال‌های کلسیمی بوده است. برای پاسخ به این سؤال که عصاره آبی - الکی ریزوم شیرین‌بیان از طریق کدام گیرنده‌ها موجب بروز اثرات شل‌کنندگی بر ایلئوم ایزوله شده است و این اثرات توسط کدام ترکیب یا فلاونوئید موجود در گیاه شیرین‌بیان به وجود آمده‌اند، نیاز به تحقیقات بیشتر در آینده دارد. همچنین پیشنهاد می‌شود، مواد مؤثره ریزوم شیرین‌بیان جهت تعیین مکانیسم‌های دقیق سلولی اثر عصاره بر ایلئوم، جداسازی شده و تداخل اثر عصاره با سایر سیستم‌های دخیل در کنترل عضلات صاف مورد بررسی دقیق قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که عصاره آبی - الکی ریزوم شیرین‌بیان اثر مهارتی بر فعالیت مکانیکی بافت کولون ایزوله داشته که این اثر به صورت مستقل از سیستم کولینرژیک بوده است. بنابراین توصیه به مصرف ریزوم شیرین‌بیان جهت درمان اسهال نیازمند

به عنوان آگونیست سیستم کولینرژیک تغییر نکرده است. از آنجایی که اضافه نمودن استیل کولین در شرایط عادی بافت موجب افزایش انقباضات و فعالیت مکانیکی کولون ایزوله شده ولی در حضور عصاره چنین تغییراتی را در پی نداشته است، ممکن است که بین اثر عصاره آبی - الکی ریزوم شیرین‌بیان و سیستم کولینرژیک ارتباطی وجود داشته باشد. با توجه به قسمت نتایج بعد از اینکه اثرات شل‌کنندگی عصاره شیرین‌بیان در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، با اعمال آتروپین به عنوان آنتاگونیست سیستم کولینرژیک تغییری در اثرات عصاره بر بافت کولون مشاهده نشد. از آنجایی که اضافه نمودن آتروپین در شرایط عادی بافت با مهار سیستم کولینرژیک موجب کاهش انقباضات و فعالیت مکانیکی کولون ایزوله می‌شود بنابراین در صورتی که اثرات شل‌کنندگی عصاره ناشی از مهار سیستم کولینرژیک باشد، می‌بایست در حضور توام عصاره و آتروپین اثرات شل‌کنندگی عصاره مشاهده نمی‌شد ولی با اعمال آتروپین تغییری در اثرات عصاره مشاهده نشد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است عصاره شیرین‌بیان به صورت مستقل از سیستم کولینرژیک موجب بروز اثرات شل‌کنندگی بر کولون ایزوله شده است. این یافته‌ها با نتایج خوشنظر و همکاران مطابقت دارد که نشان دادند عصاره شیرین‌بیان به صورت مستقل از سیستم کولینرژیک موجب کاهش تانسین پایه در دئودنوم موش صحرایی می‌شود [۱۶]. همچنین نتایج هوانگ (Huang) و همکاران نشان داده که کوئرستین، از ترکیبات شیرین‌بیان، موجب رفع اسپاسم ناشی از اثر استیل کولین بر کولون ایزوله در خوک هندی می‌شود که با تحقیق حاضر مطابقت دارد [۳۱].

پیلیجا (Piliija) و همکاران با تحقیق خود اعلام کردند عصاره گیاه *Ginkgo biloba* به دلیل حضور فلاونوئیدها به صورت وابسته به دوز سبب کاهش انقباضات خود بخودی ایلئوم و کولون خرگوش می‌شود. همچنین عصاره در ایلئوم، غالباً از طریق مسیر کولینرژیکی توسط آنتاگونیزه کردن گیرنده‌های موسکارینی موجب کاهش انقباضات ناشی از استیل کولین شده است [۳۲]. از آنجایی که ریزوم شیرین‌بیان حاوی ترکیبات فلاونوئیدی زیادی می‌باشد و با توجه به تحقیق ذکر



مالی خود ما را در انجام این تحقیق (در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد) یاری نمودند و از کمیته اخلاق زیستی بخش زیست‌شناسی که این تحقیق تحت نظر و با رعایت اصول اخلاقی آنها انجام شد، قدردانی می‌شود.

انجام تحقیقات وسیع‌تر می‌باشد از طرف دیگر وجود خاصیت ضد انقباضی ریزوم شیرین‌بیان این نکته را روشن می‌سازد که سایر خواص فارماکولوژیک ریزوم شیرین‌بیان ارزش مطالعه دقیق را داشته باشد.

تشکر و قدردانی

از بخش زیست‌شناسی دانشگاه شیراز که با حمایت‌های

منابع

1. Kartal M. Intellectual property protection in the natural product drug discovery, traditional herbal medicine and herbal medicinal products. *Phytotherapy Res.* 2007; 21 (2): 113 - 9.
2. Asl MN and Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Res.* 2008; 22 (6): 709 - 24.
3. Saxena S. *Glycyrrhiza glabra*: medicine over the millennium. *Nat. Prod. Rad.* 2005; 4 (5): 358 - 67.
4. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Kenawy SA, Seif-El-Nasr M, Mahran LG, Kafafi Y and et al. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneimittel-forschung* 2000; 51 (7): 545 - 53.
5. Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S and Nomura T. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life Sciences* 2002; 71 (12): 1449 - 63.
6. Chen G, Zhu L, Liu Y, Zhou Q, Chen H and Yang J. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, plays a dual role in regulating gastrointestinal motility in vitro and in vivo. *Phytotherapy Res.* 2009; 23 (4): 498 - 506.
7. Vispute S and Khopade A. *Glycyrrhiza glabra* Linn.--" klitaka": A review. *Biog Ind. Med.* 2011; 32 (2): 83 - 91.
8. Spinks E and Fenwick G. The determination of glycyrrhizin in selected UK liquorice products. *Food Additives & Contaminants* 1990; 7 (6): 769 - 78.
9. Ibsen K. Liquorice consumption and its influence on blood pressure in Danish school-children. *Danish Medical Bulletin* 1981; 28 (3): 124 - 6.
10. Lehtihet M and Nygren A. Licorice--an old drug and currently a candy with metabolic effects. *Läkartidningen* 2000; 97 (36): 3892.
11. Arase Y, Ikeda K, Murashima N, Chayama K, Tsubota A, Koida I and et al. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer* 1997; 79 (8): 1494 - 500.
12. Khanahmadi MM, Naghdi Badi H, Akhondzadeh S, Khalighi - Sigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S and et al. A Review on Medicinal Plant of *Glycyrrhiza glabra* L. *Journal of Medicinal Plants* 2013; 2 (46): 1 - 12.
13. Krausse R, Bielenberg J, Blaschek W and Ullmann U. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Extractum liquiritiae, glycyrrhizin and its metabolites. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 54 (1): 243 - 6.
14. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S-i, Manabe T and et al. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22 (24): 10627 - 32.



15. Iino S and Nojyo Y. Muscarinic M₂ acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience* 2006; 138 (2): 549 -59.
16. Khoshnazar SM and Bahaoddini HN. Effect of Alcoholic Extract of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) Rhizome on Isolated Duodenum Motility in Male Rats and its Interference with Cholinergic, Nitroergic, and Adrenergic Systems. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* 2013; 2 (12): 173 - 7.
17. Yamaguchi T, Kamada K, Dayton C, Gaskin FS, Yusof M, Yoshikawa T and et al. Role of eNOS-derived NO in the postischemic anti-inflammatory effects of antecedent ethanol ingestion in murine small intestine. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007; 292 (3): 1435 - 42.
18. Sigurjonsdottir H, Franzson L, Manhem K, Ragnarsson J, Sigurdsson G and Wallerstedt S. Licorice-induced rise in blood pressure: a linear dose-response relationship. *Journal of Human Hypertension* 2001; 15 (8): 549 - 52.
19. Gharib Naseri MK, Arabian M and Gharib Naseri Z. Antispasmodic Effect of hydroalcoholic leaf extract of licorice ileum contraction in rat. *Shahrekord Journal of Medical Sciences* 2008; 9 (3): 1 - 9.
20. Khoshnam SE and Bahaoddini AA. The effect of hydro-alcoholic extract of *Glycyrrhiza glabra* on the cardiovascular system of male rats with normal blood pressure and its interaction with cholinergic and adrenergic systems. *Physiology and Pharmacol.* 2013; 17 (3): 349 - 58.
21. Gharib S, Bahaoddini A, Vatanparast J and Moein M. Effect of alcoholic extract of ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe) on mechanical activity of isolated jejunum of male rat. *Physiology and Pharmacol.* 2014; 18 (4): 406 - 15.
22. Bahaoddini A, Ketabi MA, Gholampour F and Mirkhanni H. Effect of prolonged exposure to low-frequency electromagnetic fields on the interaction of nitroergic and cholinergic systems in the isolated rat trachea. *Physiology and Pharmacol* 2011; 15: 385 - 94.
23. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Kenawy SA, Seif-El-Nasr M, Mahran LG, Kafafi Y and et al. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneimittel-forschung* 2000; 51 (7): 545 - 53.
24. Chen G, Zhu L, Liu Y, Zhou Q, Chen H and Yang J. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, plays a dual role in regulating gastrointestinal motility in vitro and in vivo. *Phytotherapy Res.* 2009; 23 (4): 498 - 506.
25. Sato Y, He J-X, Nagai H, Tani T and Akao T. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza ularensis* roots, acts in the lower part of intestine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2007; 30 (1): 145 - 9.
26. Farokhipour M, Bahaoddini AA, Khoshnam SE. The Effect of Hydro-alcoholic Extract of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Rhizome on the Isolated Ileum of Male Rats and its Interaction with Nitroergic System. *Journal of Medical Plants* 2016; 4 (60): 39 - 46.
27. Kao C-H, Chu Y-H and Wang H-W. Effects of lidocaine on rat's isolated tracheal smooth muscle. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2010; 267 (5): 817 - 20.
28. Sarkaki A FH, Mansouri SMT and et al. Gallic acid improve cognitive hippocampal long term potentiation deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Parkin J. Bio. Scie.* 2014; 17 (8): 978 - 990.
29. Ghayedi N, Khoshnam SE and Bahaoddini AA. The effect of Hydro-alcoholic Extract of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Rhizome on the Mechanical Activity of the Colon of Male Rats and its Interaction with Adrenergic System. *Armaghane Danesh* 2016; 21 (3): 225 - 37.
30. Ghayedi N, Bahaoddini AA, Khoshnam SE, Gholampour F, Khosravi AR and Moein MR. Evaluation the effect of hydro-alcoholic extract of *Glycyrrhiza glabra* rhizome on the isolated colon



contractions of male rats. *J. Shahid Sadoughi Univ. Med. Sci.* 2016; 24 (7): 576 - 86.

31. Huang W-F, Ouyang S, Li S-Y, Lin Y-F, Ouyang H, Zhang H and et al. Effect of quercetin on colon contractility and L-type Ca (2+) channels in colon smooth muscle of guinea-pig. *Sheng Li Xue Bao* 2009; 61 (6): 567 - 76.

32. Pilija V, Mirjana R, Brenesel MD, Popovic M, Ivetic V and Trivic S. Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* extract on the tonus of the small intestine and the colon of rabbits. *Molecules* 2010; 15 (4): 2079 - 86.

33. Duarte J, Vizcaíno FP, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J and Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology: The*

Vascular System 1993; 24 (4): 857 - 62.

34. Kim YH, Shin EK, Kim DH, Lee HH, Park JHY and Kim J-K. Antiangiogenic effect of licochalcone A. *Biochemical Pharmacology* 2010; 80 (8): 1152 - 9.

35. Morello S, Vellecco V, Alfieri A, Mascolo N and Cicala C. Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences* 2006; 78 (8): 825 - 30.

36. Nagai H, Yamamoto Y, Sato Y, Akao T and Tani T. Pharmaceutical evaluation of cultivated *Glycyrrhiza uralensis* roots in comparison of their antispasmodic activity and glycycomarin contents with those of licorice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006; 29 (12): 2442 - 5.



The Effect of Hydro-alcoholic Extract of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Rhizome on the Mechanical Activity of the Isolated Colon of Male Rats and its Interaction with Cholinergic System

Ghayedi N (Ph.D.)¹, Bahaoddini AA (Ph.D.)¹, Khoshnam SE (Ph.D.)^{2*}

1- Biology Department, Shiraz University, Shiraz, Iran

2- Physiology Department, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

*Corresponding author: Physiology Department, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Tel: +98-917-1491729, Fax: +98-611-3738248

Email: esmaeil.khoshnam1392@gmail.com

Abstract

Background: *Glycyrrhiza glabra* (Licorice) has been traditionally used as a medicinal plant in Iran for treatment of diseases such as gastric ulcer and relieve intestinal spasms.

Objective: In the present study, the effect of hydro-alcoholic extract of licorice rhizome on mechanical activity of isolated colon of male rats has been studied.

Methods: In this experimental study, the colon tissue of 10 adult male rats were dissected and separated into two groups: experimental and control. Each group including ten strips of tissue. The segments were connected to a force transducer longitudinally and inserted to an organ bath contained oxygenated Tyrode solution (37 °C, pH=7.4). Their mechanical activity were recorded by power lab AD instrument in basal condition, and after administration of acetylcholine (4×10^{-6} M) and Atropine (10^{-6} M) in the presence and absence of licorice rhizome extract (0.036 mg/ml). Also, the mechanical activity of control group segments were recorded at the same condition with extract solvent (ethanol %70).

Results: A significant decrease in mechanical activity was found after administration of hydro-alcoholic extract of licorice compared with the control group. Also, a significant decrease of mechanical activity was seen in the presence of extract and acetylcholine compared to the control group. While the mechanical activity of tissue didn't significant changed in the presence of Atropine and extract between experimental and control groups.

Conclusion: We can conclude that hydro-alcoholic extract of licorice has modifying effect on colon motility, and this activity maybe occurred independent of the cholinergic system.

Keywords: Cholinergic, Colon, Licorice, Mechanical activity

