

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

Doctoral certification thesis

Title:

In vitro anti *Helicobacter pylori* activity of ethanolic extracts and essential oils of twelve medicinal plants

Supervised by:

Zahra Hosseini Nezhad, MSc

Sodaif Darvish Moghaddam, MD

Fariba Sharififar, PhD

Consultant:

Hamid Abdollahi, PhD

Written by:

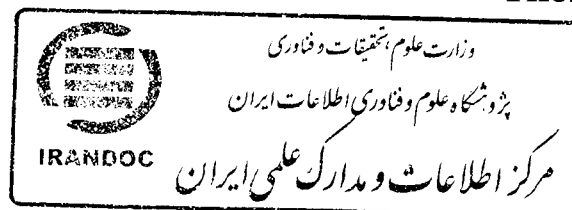
Farzaneh Ebrahimi Meimand

۱۳۸۹ / ۱۰ / ۱۳

۱۴۹۷۵۰

Summer 2010

Thesis no: 87/108





وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی کرمان
دانشکده پزشکی - آموزش بالینی

نمره نهایی دفاع از پایان نامه

پایان نامه تحصیلی دکتر فرزانه ابراهیمی میمند

تحت عنوان

In vitro anti Helicobacter pylori activity of ethanolic extract and essential oils of twelve medicinal plants

جهت دریافت درجه دکترای پزشکی عمومی

در تاریخ ۱۳۸۹/۴/۲۹ با حضور اساتید راهنما و اعضای محترم هیئت داوری دفاع و با میانگین نمره ۱۹/۷۶ مورد تایید قرار گرفت.

سمت

استاد یا اساتید راهنما

مربی

زهرا حسینی نژاد

دانشیار

زکرا حسینی نژاد یزدی پور
عضو هیئت علمی

دکتر صدیف درویش مقدم

دانشیار

دکتر فریبا شریفی فر

استاد مشاور

دانشیار

دکتر حمید عبداللهی

مهر و امضای دبیر کمیته بررسی پایان نامه

تذکر:

این فرم می بایست با توجه به نمرات دفاع تکمیل و پس از تأیید توسط استاد یا اساتید راهنما و دبیر کمیته پایان نامه ها به تعداد نسخه های پایان نامه تکثیر و در کلیه پایان نامه ها در زمان صحافی درج گردد.

با تقدیر و تشکر فراوان از:

استاد ارجمند و دلسوز و مادر مهربان

<<سرکار خانم زهرا حسینی نژاد>>

که با تمامی وجود و با تلاش بی شائبه خود، مرا در تهیه و
تدوین این پژوهش یاری نمودند و صمیمانه از سعه
صدرشان تشکر و قدردانی میکنم و همواره برایشان آرزوی
سلامتی و موفقیت دارم.

و سپاس و احترام خدمت
استاد گرانقدر و دلسوزم

<<سرکار خانم دکتر فریبا شریفی فر>>

که در این پژوهش از هیچ تلاشی به اینجانب دریغ
نورزیدند و همواره با رویی گشاده مرا در این راه دشوار
یاری رساندند .

و با سپاس فراوان از اساتید گرامی

جناب آقای دکتر صدیف درویش مقدم

و

جناب آقای دکتر حمید عبدالهی

که در تهیه و تدوین این پایان نامه مرا یاری نمودند.

و با سپاس فراوان از:

جناب آقای سعید عادل

جناب آقای صالحی

و سرکار خانم جعفری

به خاطر همکاری با اینجانب در تهیه این پایان نامه.

تقدیم به بهترین های زندگیم

پدرم

مایه استواری قامتم، او که قبل از هر قدم من قدم ها برداشت تا
مرا سالم به مقصد برساند. او که پشتم به وجود مهربانش گرم
است و هیچ برای جبران زحماتش ندارم.

هزاران بوسه بر دستان پر مهرش

مادرم

الهه عشق زندگیم. او که یادش تنها دلیل هستی ام است و مهرش تا
ابد در دلم جاریست. دنیا برای از تو نوشتن مرا کم است، اکسیر من
،نه اینکه مرا شعر تازه نیست، من از تو می نویسم و این کیمیا کم
است.

هزاران بوسه بر چشمان پر مهرش

همسر دلسوز و مهربانم

هم او که وجودم را با جام محبتش لبریز ساخت و به دنیای خالی من مفهوم بخشید. او که روح مرا از عشقی والا و بیکران سرشار میسازد آنگونه که هر کجا باشم هرگز تنها نخواهم بود.

پدر و مادر همسر مهربانم

که همواره مشوق من در راه علم و پژوهش بوده اند.

برادر و خواهرانم

که تجلی گاه آرزوهایم ، آینده روشن آنهاست.

و با درود به روان پاک بزرگ مرد

خطه کرمان

مرحوم مهندس افضلی پور

بنیانگذار دانشگاه کرمان

Index

Title	page
Abstract (Persian)	
Abstract (English)	
Chapter 1: Introduction	
1-1. Introduction.....	2
1-2. The major aim	5
1-3. The minor aims.....	5
1-4. The applicatory aim.....	6
1-5. The hypotheses	6
Chapter 2: Literature review	
General aspects	9
<i>Freula assa foetida</i> L.....	18
<i>Citrus aurantium</i> L.....	20
<i>Citrus aurantifolia</i> (chrism) Swingle.....	21
<i>Heracleum persicum</i> Desf.....	21
<i>Zhumeria majdae</i> resh and Wendelbo	22
<i>Mentha longifolia</i> L. Hudson.....	22
<i>Achilla wilhelmsii</i> Kochi.....	24
<i>Stachy lavandulifolia</i> Vahl.....	25
<i>Linaria vulgaris</i> P. Mill	26
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees.....	27
<i>Zataria multiflora</i> Boiss.....	28
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr & Perry	29
Essential oils	29
Medicinal and commercial uses of essential oils.....	30
Review articles.....	38
<i>Freula assa foetida</i>	38
<i>Citrus aurantium</i>	38
<i>Citrus aurantifolia</i>	38
<i>Heracleum persicum</i>	39
<i>Zhumeria majdae</i>	40
<i>Mentha longifolia</i>	40

<i>Achilla wilhelmsii</i>	41
<i>Stachys lavandulifolia</i>	41
<i>Linaria vulgaris</i>	41
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	42
<i>Zataria multiflora</i>	43
<i>Syzygium aromaticum</i>	44

Chapter 3: Materials and Methods

Plant materials and methods	47
Collection and extraction	47
Methods of obtaining essential oils	47
Bacterial Methodology	48
Sampling	48
Culturing	48
Storage of isolates	49
Disk diffusion method.....	49
Agar diffusion method	49
Agar dilution method	50

Chapter 4: Results

Disk diffusion method.....	54
Agar diffusion method	54
Agar dilution method	56

Chapter 5: Discussion

Discussion and conclusion.....	59
References	66

Chapter 6: Appendix

Appendix.....	86
---------------	----

Index of figures

Title	page
Fig. 2-1 <i>Freula assa foetida</i>	30
Fig. 2-2 <i>Citrus aurantium</i>	31
Fig. 2-3 <i>Citrus aurantifolia</i>	31
Fig. 2-4 <i>Heracleum persicum</i>	32
Fig. 2-5 <i>Zhumeria majdae</i>	32
Fig. 2-6 <i>Mentha longifolia</i>	33
Fig. 2-7 <i>Achilla wilhelmsii</i>	33
Fig. 2-8 <i>Stachys lavandulifolia</i>	34
Fig. 2-9 <i>Linaria vulgaris</i>	34
Fig. 2-10 <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	35
Fig. 2-11 <i>Zataria multiflora</i>	35
Fig. 2-12 <i>Syzygium aromaticum</i>	36
Fig. 2-13 <i>Helicobacter pylori</i>	36
Fig. 2-14 <i>Helicobacter pylori</i> colony	37
Fig. 3-1 Plant extraction.....	50
Fig. 3-2 Taking essences.....	51



Index of tables and charts

Title	page
Table 4-1 The information of the tested plants.....	53
Table 4-2 Antibacterial activity of essential oils of tested plants against <i>H.pylori</i>	55
Chart 4-1 Average inhibition zones of essential oils against <i>H.pylori</i>	56
Chart 4-2 Percentage of inhibitory activity of tested essential oils against <i>H.pylori</i> in the concentration of 100microgr/li.....	57
Chart 4-3 Percentage of inhibitory activity of tested essential oils against <i>H.pylori</i> in the concentration of 200microgr/li	58
Chart 4-4 Percentage of inhibitory activity of tested essential oils against <i>H.pylori</i> in the concentration of 300microgr/li	58

چکیده مقاله:

هدف: تعیین اثرات ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره های اتانولی و اسانس دوازده گیاه دارویی به روش برون تنی.

مقدمه: عفونت با هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یک عامل زمینه ای در بروز گاستریت مزمن، زخم معده و سرطان معده در تمام دنیا محسوب میشود.

مواد و روشها: نمونه های بیوپسی معده بیماران مورد مطالعه در بخش اندوسکوپی بیمارستان افضلی پور جهت انجام ایزولاسیون به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شدند و پس از ایزولاسیون و کشت، تا زمان انجام آزمایشات در فریزر نگهداری شدند. پس از جمع آوری گیاهان مورد نظر، عصاره اتانولی آنها به روش خیساندن و اسانس آنها به روش تقطیر تهیه شد. بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان با سه روش رقیق سازی در آگار، انتشار در آگار و انتشار از دیسک انجام شد.

یافته ها: یافته های مطالعه نشان میدهند که از دوازده گیاه مورد بررسی، اسانس چهار گیاه شامل بهار نارنج، دارچین، آویشن شیرازی و میخک دارای خاصیت ضد میکروبی قوی علیه هلیکوباکتر پیلوری بودند و اسانس سایر گیاهان و نیز هیچ کدام از عصاره های اتانولی مورد تحقیق، اثرات ضد میکروبی قابل قبولی از خود نشان ندادند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این تحقیق حاکی از اثرات قوی ضد هلیکوباکتر پیلوری اسانس بهار نارنج، دارچین، آویشن شیرازی و میخک است و با توجه به سمیت اسانس ها و اندکس درمانی باریک آنها پیشنهاد میشود که LD50 این اسانس ها نیز تعیین شود تا با در نظر گرفتن داده های به دست آمده بتوان تصمیم مناسبی اتخاذ نمود.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، گیاهان دارویی، عصاره اتانولی، اسانس روغنی.

Abstract

Aim: Determination of *in vitro* anti *Helicobacter pylori* activity of ethanolic extracts and essential oils of twelve medicinal plants.

Background: Infection by *Helicobacter pylori* has been ascertained to be an important etiologic impetus leading usually to chronic active gastritis, gastric ulcer and gastric cancer with growing incidences worldwide.

Methodology: The biopsy specimens from the patients who underwent endoscopy in Afzalipour hospital, were transferred to microbiology laboratory and after isolation and culturing, stored in freezer until the time of the investigation. After gathering the plants, the ethanolic extracts and the essential oils were obtained by maceration and distillation methods respectively. The antimicrobial effects of the samples were tested by agar dilution, agar diffusion and disk diffusion methods.

Results: The results indicate that the essential oils of four herbs out of the twelve herbs investigated, including *Citrus aurantium*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Zataria multiflora* and *Syzygium aromaticum* have significant anti *Helicobacter pylori* activity, while the essential oil of other herbs and none of the ethanolic extracts reveal inhibitory effect on *Helicobacter pylori*.

Conclusion: In conclusion, the essential oils of *Citrus aurantium*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Zataria multiflora* and *Syzygium aromaticum* have significant *in vitro* anti *Helicobacter pylori* activity. According to the toxicity of the essential oils and their narrow therapeutic index, however, further evaluation for measurement of LD50 of these essential oils is recommended.

Key words: *Helicobacter pylori*, medicinal plants, ethanolic extract essential oil.

Chapter 1

Introduction

1-1. Introduction

Acid peptic disorders are very common in the United States, with 4 million individuals (new cases and recurrences) affected per year. Lifetime prevalence of peptic ulcer disease in the United States is ~12% in men and 10% in women. Moreover, an estimated 15,000 deaths per year occur as a consequence of complicated peptic ulcer disease.

Duodenal ulcers are estimated to occur in 6–15% of the Western population. The death rates, need for surgery, and physician visits have decreased by >50% over the past 30 years. The reason for the reduction in the frequency of duodenal ulcers is likely related to the decreasing frequency of *Helicobacter pylori* (1).

While the prevalence is decreasing in developed countries, it is very common in developing countries, which includes most of the world's population (2).

As in duodenal ulcers, the majority of gastric ulcers can be attributed to either *H. pylori* or NSAID-induced mucosal damage (1).

H. pylori has been identified on cultures of the gastric antrum in 90% of patients with duodenal ulcer disease or antral type B gastritis, and the association for patients with gastric ulcer disease is 60-70 % (3).

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is one of the most common bacterial infections, affecting nearly half of the world's population. Human host is the only known reservoir for the infection. Transmission occurs by person-to-person contact, oral-oral, and fecal-oral routes. Infection is most commonly acquired in childhood (2).

Helicobacter pylori causes chronic infection in a large proportion of the world's population and is associated with a number of different clinical conditions. These include gastritis, gastric and duodenal ulcers, gastric adenocarcinoma, and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (4).

The prevalence of *H. pylori* varies throughout the world and depends largely on the overall standard of living in the region. In developing parts of the world, 80% of the population may be infected by the age of 20, whereas the prevalence is 20–50% in industrialized countries (1).

Seroepidemiologic study in different parts of Iran revealed near 90% prevalence of *H. pylori* infection in adults older than 35 years; a recent study in Ardabil, north-western part of Iran, also revealed near 90% *H. pylori* infection in the normal population, older than 40 years, by histopathology (2).

Another study demonstrates that the prevalence of *H. pylori* infection is 66.4% in Golestan province. The lowest frequent seropositive group was under 5 year old children (30.6%) and the highest frequent seropositive group was 55-64 year old subjects living in east of province (5).

A study performed about 10 years ago, to estimate the frequency of *Helicobacter Pylori* infection in the city of Kerman demonstrated the prevalence of *H.pylori* infection is 61.6% of which 63.7% in women and 59.4% in men (6).

A similar study results an overall prevalence of 71.0% in Nahavand, western Islamic Republic of Iran (7).

Helicobacter pylori which persistently colonizes the stomachs of ~50% of the world's human population, is the main risk factor for peptic ulceration as well as for gastric adenocarcinoma and gastric MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma (8).

The growing problem of the antibiotic resistance by the organism demands the search for novel compounds from plant based sources (9).

Excessive consumption of chemical medications, which is increasingly seen in our country, may cause auto immune phenomena. The incidence of specific complications is one of the problems of the new medicine, compared to the traditional medicine. According to these problems and due to the common belief that herbal medications are safer than chemical ones, taking advantage of medicinal plants has become into more attention and many research centers and universities have projected to utilize these plants and they believe these plants play an important role in the 21st century medicine (10).

As mentioned above, adverse drug reactions and antibiotic resistance, along with the high expenses, are great deals in the treatment on the infection. Hence finding an herbal medication with lesser side effects or a combination of some

medicinal plants with high eradication rate, will be a great success. Therefore in the current study, we selected some plants which are used in traditional medicine to relieve digestive problems, and investigated their essential oil and ethanol extracts' potentials to inhibit *in vitro Helicobacter pylori* growth. The plants are as following:

- 1- Gum of the plant asafetida (*Freula assa foetida* L.) from the plant family: Apiaceae.
- 2- Flowers of sour orange (*Citrus aurantim* L.) from the plant family: Rutaceae.
- 3- Fruits of lime [(*Citrus aurantifolia* (chrism.) Swingle)] from the plant family: Rutaceae.
- 4- Fruits of the plant Golpar (*Heracleum persicum* Desf.) From the plant family: Apiaceae.
- 5- Aerial parts of mohrekhosh (*Zhumeria majdae* resh.& Wendelbo) from the plant family: Lamiaceae.
- 6- Aerial parts of peny royal or wild mint (*Mentha longifolia* L. Hudson) from the plant family: Lamiaceae.
- 7- Aerial parts of yarrow (*Achilla wilhelmsii* Kochi.) from the plant family: Asteraceae.
- 8- Flowers of betony (*Stachys lavandulifolia* Vahl.) from the plant family: Lamiaceae.
- 9- Fruits of the plant figwort (*Linaria vulgaris* P. Mill) from the plant family: Linaceae.
10. Dried bark of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) from the plant family: Lauraceae.
11. Aerial parts of avishan-shirazi (*Zataria multiflora* Boiss) from the plant family: Lamiaceae.
12. Blossoms of clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry) from the plant family: Myrtaceae.

Plant selection was done according to their use in traditional medicine. The above mentioned plants possess anti bacterial properties against other bacteria,