

ارزیابی سمیت حاد عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *Sclerorhachis platyrachis* در تزریق داخل صفاقی به موش صحرایی

حسن رضائی سرشت^۱، حمید چشمی^{۲*}، محمد حسین زاده حساری^۳، عبدالحمید آذرشب^۴، مریم لندران^۴

- ۱ - مرکز تحقیقات طب سنتی و جامع نگر، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.
- ۲ - مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.
- ۳ - دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.
- ۴ - مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: درمان گیاهی به عنوان درمانی بسیار معمول در سرتاسر جهان می باشد. به علت اثرهای جانبی داروهای شیمیایی استفاده از گیاهان دارویی افزایش یافته است. گونه *S. platyrachis* از جنس *Sclerorhachis* که متعلق به خانواده کاسنی است، گونه بومی ایران است. تاکنون هیچ گزارشی مرتبط با سمیت عصاره متانولی این گیاه مشاهده نشده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی سمیت حاد گیاه *S. platyrachis* بر روی حیوان آزمایشگاهی و عوارض احتمالی عصاره متانولی اندام هوایی این گیاه بر روی موش صحرایی می باشد.

مواد و روش ها: گیاه *Sclerorhachis platyrachis* از اطراف شهرستان سبزوار جمع آوری گردید. پس از خشک نمودن، عصاره متانولی به روش سوکسله تهیه شد و دوزهای ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰، ۲۰۰۰، ۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به گروه های حیوانی آماده شده تزریق شد. در نهایت پس از میزان احتمالی مرگ و میر حیوانات در طول دوره زمانی مورد مطالعه، از اندام های کبد، قلب، بیضه و ریه، مقاطع بافتی تهیه شد و تغییرهای احتمالی ایجاد شده پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، مورد بررسی آسیب شناسی قرار گرفتند.

یافته ها: در غلظت های مورد استفاده در این مطالعه، هیچ گونه مرگ و میری که از نظر بافتی معنادار باشد مشاهده نشده و از این رو رقت خاصی به منظور LD₅₀ عصاره در موش صحرایی با تزریق داخل صفاقی تعیین نشد. همچنین تغییر بافتی خاصی در بافت های مربوط به اندام های مورد بررسی مشاهده نگردید.

بحث: عصاره متانولی *Sclerorhachis platyrachis* پس از تزریق به صورت داخل صفاقی به موش صحرایی، عارضه خاصی نداشت.

نتیجه گیری: از نتایج حاصل این گونه نتیجه گیری می گردد که عصاره مورد نظر در رقت های مورد بررسی و به صورت تزریق درون صفاقی فاقد سمیت معنادار بوده و می توان از آن به منظور تأثیر احتمالی بر بیماری های مختلف در مطالعه های آینده بهره برد.

واژه های کلیدی: *Sclerorhachis platyrachis*، LD₅₀، آسیب شناسی بافتی، موش صحرایی.

مقدمه

گیاهان از منابع بالقوه هستند که تاکنون ۲۵۰ تا ۵۰۰ هزار گونه از آن ها بر روی زمین شناسایی شده است. در شرایط موجود و با توجه به مطالعه های صورت گرفته تخمین زده شده که تنها در حدود ۱ تا ۱۰٪ از این سرمایه عظیم طبیعی

نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
پست الکترونیکی: hamid.ch65@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۰

Paracelsus (۱۴۹۳-۱۵۴۱) - "همه چیز سمی است و هیچ چیز بدون سمی وجود ندارد. تنها دوز، تعیین کننده سمیت یک ماده است" - امروزه روش‌های آنالیزی مدرنی برای کشف سمیت مواد ایجاد شده‌اند که یکی از این روش‌ها، تعیین سمیت کشنده یا LD₅₀ است (۱۷).

در حال حاضر و با توجه به موجی که به منظور استفاده از گیاهان داروئی به جهت درمان بیماری‌ها به وجود آمده و البته روز به روز نیز در حال افزایش است و هم‌چنین به خاطر این که گیاه مذکور تاکنون در زمینه بررسی‌های *in vivo* چندان مورد توجه پژوهشگران نبوده و از طرفی با توجه به انحصاری بودن این گیاه در کشور ایران، در این مطالعه سعی شده تا با تعیین دوز سمیت احتمالی این گونه بر میزان مرگ و میر موش صحرایی و اثرهای جانبی مخرب احتمالی آن بر بافت‌های اندام‌های اصلی بدن شامل قلب، ریه، بیضه، کبد و کلیه، داده‌هایی راه گشا جهت بررسی‌های بیولوژیک آینده در این مورد حاصل آید.

روش کار

جمع‌آوری نمونه

گیاه *Sclerorhachis platyrachis* از حوالی روستای سنگ سفید، واقع در شمال شهرستان سبزوار، جمع‌آوری گردید. اندام هوایی گیاه مذکور، بلافاصله به منظور خشک کردن بر روی یک پارچه تمیز و در هوای آزاد و در شرایط سایه قرار گرفت. پس از خشک شدن، اندام هوایی توسط آسیاب برقی پودر شده و جهت عصاره‌گیری ذخیره گردید.

عصاره‌گیری به روش سوکسله

مقدار ۲۰۰ گرم از پودر گیاهی تهیه شده در مرحله قبل، در یک محفظه استخراج قرار داده شد و این محفظه با متانول تازه پر گردید. در این روش، با برگشت متانول مایع حاصل از ستون تقطیر، مایع به نقطه سرریز رسیده و از طریق یک لوله، مجدداً به ظرف حلال برگشته و همراه با خود، ترکیب‌های استخراجی را نیز حمل می‌کند. در ظرف حلال، جداسازی عصاره از حلال توسط فرآیند تقطیر صورت می‌گیرد. به صورتی که در نهایت، عصاره مورد نظر در ظرف پایینی باقی مانده و حلال دوباره به محفظه استخراج فرستاده می‌شود. این عملیات آن قدر ادامه یافت که فرآیند استخراج کامل گردید.

گروه بندی و تزریق عصاره به حیوانات

در مطالعه حاضر، تعداد ۴۸ سررت نر با وزن ۱۸۰-۲۲۰ گرم مورد مطالعه قرار گرفتند. به این صورت که پس از دست ورزی حیوانات به مدت ۳ روز جهت آماده سازی شرایط بدنی

توسط انسان و حیوانات به عنوان غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد. امری که دانشمندان را مشتاق ساخته تا کاربرد تعداد بیش‌تری از گونه‌های گیاهی به عنوان غذا، دارو و یا هر مورد دیگری را مورد بررسی قرار دهند (۶).

خانواده کاسنی دارای گونه‌های زیادی می‌باشد که این گونه‌ها برای زمان‌های طولانی برای مصارف زیادی از جمله لاستیک، دارو، روغن خوراکی، سبزیجات و حشره‌کش مورد استفاده قرار می‌گرفته است. گیاهان این خانواده به عنوان منبع قابل توجهی از سسکوئی ترپن‌ها، به خصوص نوع ایدسمانی هستند. این ترکیب‌ها به عنوان جزء اصلی متابولیت‌های ثانویه این خانواده دارای خواص بیولوژیکی گسترده‌ای می‌باشند (۱۰). جنس *Sclerorhachis* متعلق به قبیله *Anthemidae* بوده که در این قبیله ۴۴ ترکیب فلاونوئیدی از دسته‌های فلاونول، فلاون، دی هیدروکسی فلاونول، دی هیدروکسی چالکون و چالکون‌های گلیکوزیدی یافت شده است (۴). این ترکیب‌ها متعلق به پلی فنول‌ها می‌باشند. این جنس، دارای دو گونه با نام‌های *S. leptoclada* و *S. platyrachis* است. گونه‌های مذکور، به طور انحصاری در ایران و فقط در سرزمین خراسان بزرگ و در اطراف شهرستان‌های سبزوار، بیرجند، مشهد و تربت حیدریه می‌رویند (۱۱، ۱۴، ۱۵، ۱۶). این گیاه در نواحی صخره‌ای و به طور معمول در ارتفاع حدود ۱۷۰۰ متری از سطح دریا می‌روید (۷). این گیاه گونه‌ای معطر است که در اسانس اندام هوایی آن حاوی آلفا پینن و کامفر و بتا پینن به عنوان ترکیب‌های عمده می‌باشند (۱).

تاکنون مطالعه‌های کمی بر روی خواص بیولوژیکی گیاه صورت گرفته است اما مشخص شده که این گیاه دارای ترکیب‌ها فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (۲). اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی این گیاه بر روی ۷ گونه باکتری گرم مثبت و منفی شامل *Enterococcus*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *faecalis*، *S. epidermidis*، *Escherichia coli*، *aeruginosa*، *Klebsiella pneumonia* و ۳ گونه قارچ *Saccharomyces*، *Candida albicans*، *cerevisiae* و *Aspergillus niger* تأیید شده است (۳). هم‌چنین مشخص شده که گیاه مذکور، بر روی گونه‌های قارچی *Aspergillus* و *Fusarium verticilloides* و *flavus* نیز دارای اثرهای سمی مشابهی می‌باشد (۱۷).

اثرهای ترکیب‌های فعال بیولوژیک برخی از گونه‌های گیاهی، هم‌چون گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، بر سلامت انسان هم‌چنان ناشناخته باقی مانده است (۹). طبق گفته

مراحل آسیب شناسی بافتی

پس از تثبیت بافت‌ها، مراحل آب‌گیری به کمک غلظت‌های مختلف الکل انجام شد و از بافت‌های پارافینه شده مقطع‌گیری گردید. در نهایت، به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین، آسیب‌های بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

روش آماری

محاسبات آماری با استفاده از آزمون t-test انجام گرفت و اختلاف معنی‌داری بین دوزهای تزریقی و مرگ و میر مشاهده نشد ($P \geq 0.05$).

یافته ها

همان‌طور که در جدول ۱ ارائه شده است، LD₅₀ عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *Sclerorhachis platyrachis* بعد از تزریق به صورت درون صفاقی تا دوز ۲۲۵۰ کیلوگرم بر میلی گرم تعیین نگردید.

حیوانات و کاهش استرس آن‌ها، رت‌ها به صورت تصادفی به ۸ گروه دارای تعداد مساوی (هر گروه ۶ سررت) تقسیم شدند. یکی از گروه‌های مذکور به عنوان گروه شاهد منظور گردیده و موجودات مربوط به آن هیچ‌گونه عصاره یا ماده اضافی دریافت نکردند. یکی از گروه‌ها به عنوان گروه کنترل مدنظر قرار گرفت که رت‌های مربوط به آن، محلول سالین همراه با ۲۰ درصد DMSO (به عنوان حلال عصاره در سالین) دریافت نمودند. در نهایت با توجه به مطالعه‌های مشابه به سایر گروه‌ها به ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰، ۲۰۰۰، ۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۵).

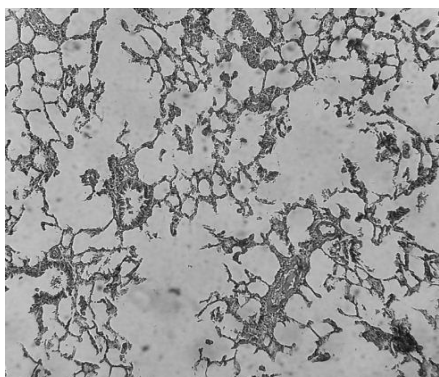
بیهوش نمودن و جراحی حیوانات

پس از گذشت یک هفته از زمان تزریق عصاره مورد نظر، میزان مرگ و میر حیوانات مورد مطالعه، بررسی گردید و سپس از کتامین به منظور بیهوشی حیوانات استفاده شد. در مرحله بعد، اندام‌های کبد، قلب، ریه، کلیه و بیضه حیوانات جدا شده و در محلول فرمالین ۱۰ درصد، به عنوان فیکساتور، قرار داده شد.

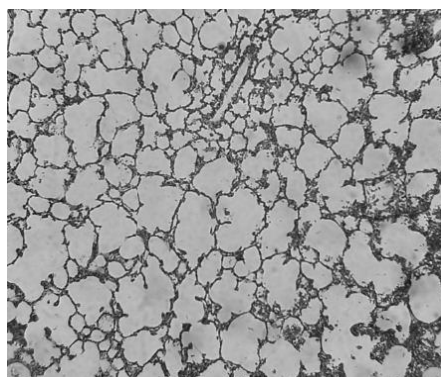
جدول ۱- نتایج مربوط به بررسی میزان مرگ و میر حیوانات مورد مطالعه در گروه‌های هشت گانه.

شماره گروه	تعداد رت	دوز تزریق شده عصاره (mg/kg)	log dose	میزان مرگ و میر %
۱	۶	---	---	۰
۲	۶	---	---	۰
۳	۶	۱۰۰۰	۳	۰
۴	۶	۱۲۵۰	۳/۱	۰
۵	۶	۱۵۰۰	۳/۱۸	۰
۶	۶	۱۷۵۰	۳/۲۴	۰
۷	۶	۲۰۰۰	۳/۳	۰
۸	۶	۲۲۵۰	۳/۳۵	۰

هم‌چنین همان‌طور که از شکل‌های ۱ تا ۵ مشخص است، پس از بررسی پاتولوژیک، هیچ‌گونه آسیب بافتی پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین در بافت‌های ریه، قلب، کلیه، کبد و بیضه حیوانات مورد مطالعه مشاهده نشد.

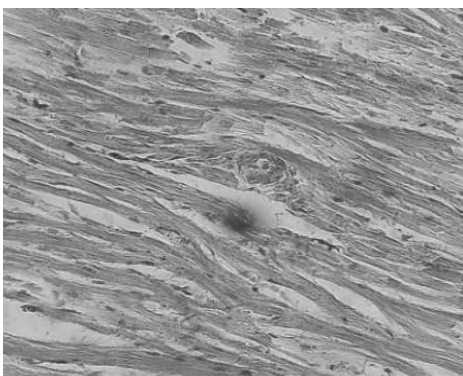


ب

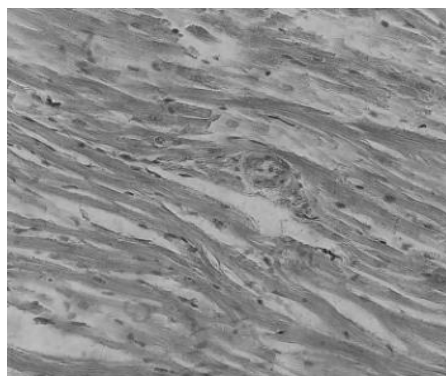


الف

شکل ۱: مقطع بافتی رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلین اتوزین مربوط به ریه رت (40X). الف) مربوط به گروه کنترل ب) مربوط به گروه تیمار شده با غلظت ۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *Sclerorhachis platyrachis*.

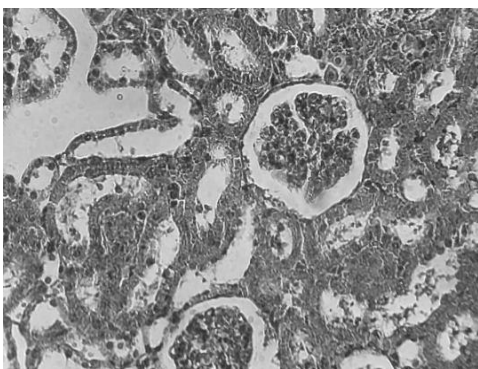


ب

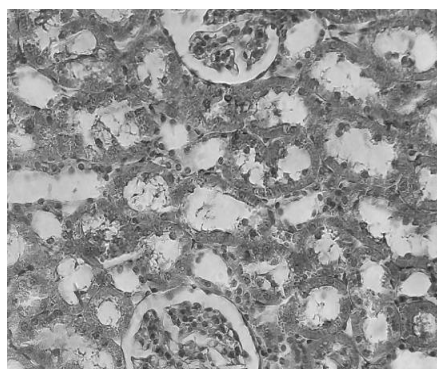


الف

شکل ۲: مقطع بافتی رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلین اتوزین مربوط به قلب رت (40X). الف) مربوط به گروه کنترل ب) مربوط به گروه تیمار شده با غلظت ۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *Sclerorhachis platyrachis*.



ب

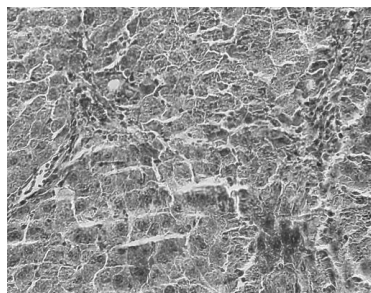


الف

شکل ۳: مقطع بافتی رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلین اتوزین مربوط به کلیه رت (40X). الف) مربوط به گروه کنترل ب) مربوط به گروه تیمار شده با غلظت ۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *Sclerorhachis platyrachis*.

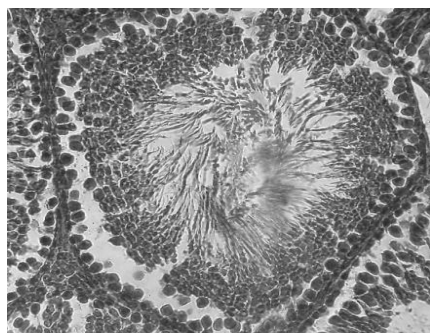


ب

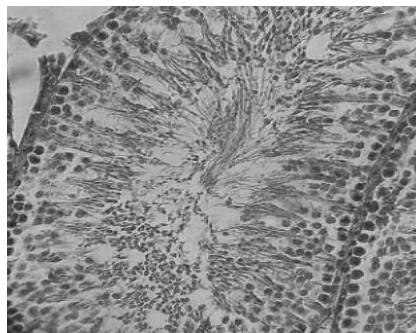


الف

شکل ۴: مقطع بافتی رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلین ائوزین مربوط به کبد رت (40X). الف) مربوط به گروه کنترل (ب) مربوط به گروه تیمار شده با غلظت ۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *Sclerorhachis platyrachis*.



ب



الف

شکل ۵: مقطع بافتی رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلین ائوزین مربوط به بیضه رت (40X). الف) مربوط به گروه کنترل (ب) مربوط به گروه تیمار شده با غلظت ۲۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *Sclerorhachis platyrachis*.

با توجه به این که این گیاه سمی نیست می توان نتیجه گرفت که در این گیاه دسته ترکیب های مانند گلیکوزیدهای قلبی، آلکالوئیدها و بسیاری از ترکیب ها سمی دیگر موجود نمی باشد. در یکی از اولین مطالعه هایی که بر روی این گیاه انجام پذیرفت، وجود دو نوع فلاونوئید و یک نوع سسکوئین ترپن در *Sclerorhachis platyrachis* شناسایی گردید (۱۲). در تحقیقاتی که در آن سمیت حاد ترکیب های فنولی و فلاونوئیدی بررسی شد، مشخص گردید که این ترکیب ها سمی می باشند (۸). از سوی دیگر، عدم سمیت حاد در گیاه مورد بررسی در این مطالعه را می توان به وجود مقادیر اندک این ترکیب ها در عصاره مذکور ارتباط داد. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت ترکیب ها شیمیایی و فعالیت بیولوژیک اسانس بخش های هوایی گلدار دو گونه گیاه متعلق به جنس *Sclerorhachis* به وسیله روش های GC و GC/Mass مورد آنالیز قرار گرفته و اجزای سازنده عمده *S. platyrachis* به صورت (35/5%) camphor, bornyl

بحث

هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثرهای مخرب و LD₅₀ عصاره متانولی گیاه *Sclerorhachis platyrachis* به عنوان یک گیاه بومی ایران از طریق تزریق درون صفاقی در رت می باشد. با توجه به هدف این گونه مطالعه های که تعیین سمیت احتمالی عصاره مورد بررسی می باشد و با توجه به داده های حاصل از این بررسی می توان عنوان نمود که عصاره متانولی گیاه مذکور فاقد سمیت در دوزهای مورد مطالعه بوده و از نظر آسیب شناسی بافتی نیز اثر قابل توجهی بر اندام های مورد مطالعه ندارد. البته این مشاهده ها با توجه به این که این مطالعه اولین بررسی مربوط به این گیاه می باشد قابل مقایسه با سایرین نمی باشد. اما می توان در مورد مواد مؤثره موجود در گیاه که در مطالعه های اندک پیشین مورد بررسی قرار گرفته بحث و بررسی نمود.

acetate (11/7%) و 1,8-sineol(8/0%) تعیین گردید، در حالی که در گونه *S. leptoclada*، مقادیر متفاوتی شامل bornyl acetate (18.8%)، camphor(17/7%) و cadinene(6/9%) به عنوان ترکیبها عمده شناسایی شدند. با توجه به این که مشخص شده که خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی این گیاه بر روی چندین گونه باکتری گرم مثبت و منفی و چند گونه قارچ انجام گردیده (۱۴،۱۷) می توان نتایج این مطالعه های را در ترکیب با نتایج مطالعه حاضر، به عنوان اثر مفیدی از گیاهان متعلق به جنس *Sclerorhachis* در نظر گرفته و بیش تر به گیاهان مذکور، به عنوان گیاهان با حداقل اثرهای جانبی جهت بررسی بیش تر اثرهای بیولوژیک بر بیماری های مختلف تمرکز نمود.

نتیجه گیری

در این پژوهش که بر روی رت و از طریق تزریق درون صفاقی عصاره متانولی گیاه *S. platyrachis* انجام پذیرفت مشخص گردید که عصاره مذکور فاقد سمیت معنی دار بوده و از طرفی هیچ گونه آسیب بافتی، متوجه اندام های قلب، کلیه، بیضه و کبد در حیوان مورد آزمایش نساخته نشده است. از این رو پیشنهاد می گردد که این گیاه برای مطالعه های بیش تر حیوانی و بالینی در بیماری های مختلف مورد بررسی قرار گیرد. البته باید توجه نمود که نتایج فوق، زمانی قابل ارجاع خواهد بود که بررسی های دقیق بیش تری بر روی انواع حیوانات آزمایشگاهی و با روش های دارورسانی مختلف انجام گیرد و هم چنین بتوان مواد مؤثره موجود در عصاره گیاهی را به دقت آنالیز و از منظر بیولوژیک مورد مطالعه قرار داد.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی سبزوار برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Aghajani Z, Masoudi S, Rustaiyan A. Volatile oils of *Anthemis talyshensis* A. Fedor. and *Sclerorhachis platyrachis* (Boiss.) Podlech ex Rech. f. from Iran. *J. Essential Oil Research*, 2005. 17(4): p. 355-7.
2. Akhlaghi H, Akhlaghi S.S, Mahdavi B, Rezaei H. *Sclerorhachis Platyrachis* (Boiss.) Podlech Ex Rech. F.: an Indigenous Medicinal Plant from Northeastern Iran; Essential Oil Composition, Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity. *J. Chemical Health Risks*, 2015. 5(2): p. 129-135.
3. Akramian M, Nejad Ebrahimi S, Yosefzadei M, Joharchi MR. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils of Two *Sclerorhachis* Species from Iran. 5th International Crop Science Congress & Exhibition, 2008-04-13. p. 89. 2008.
4. Bohm, B.A. and Stuessy, T.F., 2001. *Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae)*. Springer Science & Business Media.
5. Chidume F.C, Kwanashie H.O, Adekeye J.O, Wambebe C, Gamaniel K.S. Antinociceptive and smooth muscle contracting activities of the methanolic extract of *Cassia tora* leaf. *J. Ethnopharmacology*, 2002. 81 (2): p. 205-209.
6. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 1999. 12(4): p. 564-82.
7. Ghahreman A., J. Heydari¹, F. Attar, B. Hamzeh'ee. A Floristic Study of the Southwestern Slopes of Binaloud Elevations (Iran: Khorassan Province). *JUST*, 2006. 32(1): p. 1-12.
8. Galati, G. and O'Brien, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.*, 2004. 37: p. 287-303.
9. Gambarana C, Ghiglieri O, Tolu P, Montis MG, Giachetti D, Bombardelli E, Tagliamonte A. Efficacy of an *hypericum perforatum* (St. John's Wort) extract in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. *Neuropsychopharmacology*, 1999. 21(2): p. 247-57.
10. Habibi Z, Kheyraadi R, Ghasemi S, Yousefi M, Ng SW. A new sesquiterpenoid from *Sclerorhachis platyrachis* (Boiss.) Podlech ex Rech. f. *Phytochemistry Letters*, 2012. 5(4): p. 705-7.
11. Iranshahr, M. *Sclerorhachis rechingeri* (Asteraceae-Anthemideae), a new species from N. Khorasan. *Plant Syst. Evol.*, 1979. 132: p. 149-152.
12. Habibi, Z., Kheyraadi, R., Ghasemi, S., Yousefi, M. and Ng, S.W. A new sesquiterpenoid from *Sclerorhachis platyrachis* (Boiss.) Podlech ex Rech. f. *Phytochemistry Letters*, 2012. 5(4): p. 705-707.
13. Mandal V., Mohan Y., and Hemalatha S. Microwave-assisted extraction- an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Review*, 2007. 1(1): p. 7-18.
14. Mozaffarian, V.,. *Dictionary of Iranian Plant Names*. Farhang Moaser Publishers, Tehran, Iran, 1996. p 491.
15. Rechinger, K.H., *Sclerorhachis*. In: Rechinger, K.H., Hedge, I.C. (Eds.), *Flora Iranica, Compositae*, No. 158. Akademische Druck and Verlagsanstalt, Graz, Austria. 1986.
16. Rechinger, Wien, K.H.,. *Sclerorhachis leptoclada* (Asteraceae-Anthemideae), eine neue Art aus dem südlichen Khorasan. *Plant Syst. Evol.*, 1981. 138: p. 297-299.
17. Tahmasebi A, Andi S, Ahmadi M, Alavi B. Inhibitory effect of essential oils of *Sclerorhachis platyrachis* and *Sclerorhachis leptoclada* on phytopathogenic fungi. *International J. AgriScience*, 2012. 2(1): p. 48-53.

