بررسی سمیت اسانس *Trachyspermum ammi* به صورت حاد و تحت مزمن

مهدی وزیریان[۱،۲]، داوود حکمتی[۳]، سیدناصر استاد[۴]، آزاده منائی[۲]*

۱- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکترا داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشکده داروسازی پردیس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استاد، گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب، خیابان قدس، خیابان پورسینا، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن و نمابر: ۶۴۱۲۱۲۲۹ (۰۲۱)
پست الکترونیک: manayi@razi.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۳ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۱۱/۱۴

چکیده

مقدمه: ***Trachyspermum ammi*** **در طب سنتی اثرات درمانی فراوانی از قبیل بهبود بیماری‌های معدی، سوء هاضمه، اسهال، هموروئید، سنگ‌های صفراوی، بیماری‌های تنفسی و غیره دارد.**

هدف: امروزه سمیت با گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین دلایل مسمومیت است به همین دلیل بررسی اثرات سمی گیاهان حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه سمیت اسانس زنیان در حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: اسانس میوه گیاه به روش تقطیر با آب تهیه و در دوزهای مختلفی به موش‌ها گاواژ شده و سمیت حاد آن بررسی شد. برای بررسی سمیت تحت مزمن، اسانس گیاه زنیان با دوز ۱۰۰۰ mg/kg به مدت ۲۳ و ۴۵ روز به رت‌ها گاواژ شد. فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمی خون رت‌ها مورد مطالعه قرارگرفت و همچنین از اورگان‌های طحال، کلیه، کبد و ریه مقداری بافت جهت بررسی هیستوپاتولوژی جدا شد.

نتایج: در بررسی سمیت حاد اسانس زنیان دوز کشنده، ۵۰٪ (LD_{50}) ۲۲۹۴ mg/kg محاسبه شد. نتایج مطالعات تحت مزمن حاکی از این است که تفاوت آماری معنی‌داری در وزن و آب و غذای موردنیاز در گروه شاهد و گروه دریافت‌کننده اسانس زنیان مشاهده نشد. در بررسی بافت‌شناسی، نتایج وجود آسیب‌های جدی به بافت ارگان‌های مورد مطالعه را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: درنهایت با توجه به نتایج حاصل از مطالعه هیچ‌کدام از پارامترهای شیمیایی خون و نیز خصوصیات بافت‌شناسی ارگان‌های مورد مطالعه با مصرف اسانس *T. ammi* تغییر نکرده‌اند، با این حال اسانس با توجه به LD_{50} آن می‌تواند به عنوان ترکیب با سمیت متوسط در نظرگرفته شود.

گل‌واژگان: سمیت، زنیان، اسانس، ***Trachyspermum ammi***

مقدمه

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* و نام عمومی Ajwoin، متعلق به رده Magnoliopsida و راسته Apiales به خانواده Apiaceae، می‌باشد [۱]. این گیاه به طور کلی بومی مصر بوده و درایران، عراق، افغانستان، پاکستان و هند کشت می‌شود [۲]. در ایران، در شرق استان‌های سیستان و بلوچستان، آذربایجان، تبریز، اصفهان، خوزستان، فارس، کرمان و خراسان می‌روید [۳].

در طب سنتی از بذر و ریشه‌ی گیاه زنیان استفاده فراوانی می‌شود، به عنوان باد شکن (ضد نفخ) تونیک و زیادکننده‌ی تنفس و برای مداوای ترش کردن و برطرف‌کننده اختلال هضم، اسهال، دردهای شکمی، بواسیر، سنگ‌های دستگاه ادراری، رفع ضعف قوای جنسی و به عنوان شیرافزا به کار می‌رود [۵، ۴]. از اثرات فارماکولوژیک بررسی شده‌ی این گیاه می‌توان به اثرات ضد باکتری، ضد قارچ، ضد انگل، ضد درد، حشره‌کش، ضد پلاکت، برونکودیلاتور، ضداولسر، آنتی‌اکسیدان و حفاظت کبدی، کاهش فشار خون، تنظیم دستگاه گوارش و غیره اشاره کرد [۶].

طبق مطالعات متعددی که روی گیاه زنیان انجام شده است، گیاه حاوی تعداد زیادی از ترکیبات گیاهی شامل کربوهیدرات، ساپونین، ترکیبات فنولی، اسانس (به طور عمده شامل ترکیبات تیمول، *para*-cymene، *alpha*-pinene، *beta*-pinene و *gamma*-terpinene)، پروتئین، چربی، فیبر و مواد معدنی شامل کلسیم، فسفر، آهن و نیکوتینیک اسید می‌باشد [۴]. ترکیبات اسانس این گیاه به روش گازکروماتوفی- جرم‌سنجی (GC-MS) در بررسی‌های گذشته شناسایی شده‌اند که بیشترین ترکیبات موجود در آن در اغلب مطالعات تیمول، *gamma*-terpinene و *para*-cymene می‌باشند [۷].

گیاهان دارویی علاوه بر خواص و فواید زیادی که دارند ممکن است سمی و خطرناک نیز باشند به طوری که در سال ۲۰۰۸ شصت هزار مورد مسمومیت ناشی از مصرف گیاهان دارویی در ایالات متحده‌ی آمریکا گزارش شده است. مطالعات سمیت حاد در حیوانات برای تعیین اثرات جانبی که در دوره محدودی از زمان بعد از تجویز یک دوز بالای ماده یا دوزهای متعدد در فواصل زمانی کوتاه ایجاد می‌شود، انجام می‌گیرد. هدف از انجام آزمایش‌های حاد، تعیین سمیت ذاتی ماده شیمیایی، شناسایی ارگان هدف، فراهم کردن اطلاعات برای ارزیابی خطر مجاور شدن با ماده شیمیایی و به دست آوردن معلومات با ارزش برای پیش‌بینی و تشخیص و تجویز درمان مناسب برای مسمومین حاد با ماده شیمیایی می‌باشد. مقدار سمیت حاد معمولاً با LD50 مشخص و گزارش می‌شود که با موارد زیادی از قبیل حیوان مورد آزمایش، طریقه‌ی تجویز، جنس و سن حیوان و غیره مرتبط است [۸]. همچنین آزمایش‌های سمیت تحت مزمن زمانی انجام می‌گیرد که طی مطالعات سمیت حاد سمیتی مشاهده نشود و اثر یک ماده به مدت طولانی‌تر از یک دوره مصرف حاد مورد بررسی قرار تا عوارض جانبی غیرکشنده و غیرحاد بررسی شود [۹]. در مطالعه حاضر سمیت حاد و تحت مزمن اسانس میوه زنیان در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است تا سمیت احتمالی آن مشخص شود زیرا این اطلاعات برای طراحی و اجرای سایر مطالعات بر روی این گیاه ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و اسانس‌گیری

میوه گیاه زنیان از عطاری در تهران در سال ۱۳۹۴ خریداری و در هرباریوم دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی سد (PMP:775). بدین‌منظور میزان g ۱۰۰۰ میوه‌ی آسیاب شده‌ی گیاه را در چند مرحله در بالن حاوی آب مقطر ریخته و سپس با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری به مدت ۴ ساعت صورت گرفت. پس از پایان اسانس‌گیری، اسانس در ظرف شیشه‌ای تیره جمع‌آوری شد و با استفاده از سولفات سدیم انیدر (مرک، آلمان) بی‌آب و تا زمان آنالیز در یخچال ۴ °C نگهداری شد.

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه موش‌های صحرایی نر از نژاد Wistar از حیوانخانه دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه و در همان مکان بررسی شدند. شرایط حیوان‌خانه به ترتیب زیر

بود: درجه حرارت $22\pm2\ ^{o}C$ با سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، آب و غذای حیوانات به طور مرتب در اختیارشان قرار می‌گرفت و آزمایش‌ها روی تمامی گروه‌های مورد بررسی در شرایط کاملاً یکسان و مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی از نظر تهیه، حمل، محل و نحوه نگهداری آنها صورت گرفت.

بررسی سمیت حاد:

ابتدا با دوزهای مختلف از mg/kg ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ به حیوان تجویز شد و اولین مرگ و میر در غلظت mg/kg ۱۷۰۰ مشاهده شد. برای بررسی سمیت حاد در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر و از نژاد Wistar در محدوده وزنی g ۸۰-۱۲۰ استفاده شد. حیوانات به ۵ گروه ۵ تایی از موش‌های صحرایی نر تقسیم شدند و به هر یک از گروه‌ها غلظت‌های مختلف از اسانس (mg/kg ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۵۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰) گاواژ شد. میزان مرگ و میر، تغییرات ظاهری و رفتاری حیوان‌ها شامل وزن، مقدار آب و غذای مصرفی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ملاحظه شدند.

سمیت تحت مزمن:

از موش‌های نر صحرایی با میانگین وزن 158 ± 1 g استفاده شد و بدین‌منظور ۲۰ عدد موش صحرایی در ۲ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. زمان این مطالعه ۲۳ و ۴۵ روز طراحی شد. اسانس با غلظت mg/kg ۱۰۰۰ به گروه آزمایش و نرمال سالین ۰/۹ درصد به گروه شاهد گاواژ شد. حیوانات به مدت ۲۳ و ۴۵ روز روزانه mg/kg ۱۰۰۰ و ۵ روز از هفته اسانس گیاه را دریافت کردند. پس از گذشت مدت زمان لازم، موش‌ها را ابتدا بیهوش کرده (با تزریق کتامین ۱۰ درصد به مقدار mg/kg ۲۰۰ و زایلزین mg/kg ۱۰) سپس با برش پرده‌ی صفاق و باز کردن فضای شکمی به طور مستقیم از قلب برای بررسی پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی در ساعت ۱۱-۱۰ صبح خونگیری انجام شد. برای بررسی فاکتورهای خونی mL ۱ از خون جهت آزمون هماتولوژی به ویال‌های آغشته به EDTA و mL ۳ جهت آزمون بیوشیمی برداشته شد و بلافاصله سرم لخته‌ها را با استفاده از سمپلر جدا و در میکروتیوپ‌ها وارد کرده و پس از انتقال به فلاسک حاوی یخ، به آزمایشگاه تشخیص طبی حمل شد.

درنهایت از ارگان‌های حیاتی از قبیل کبد، کلیه، ریه و طحال جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک نمونه‌برداری شد. فرمالین ۱۰ درصد جهت ثابت کردن نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت مورد استفاده قرارگرفت. بافت‌ها پس از قرار داده شدن در پارافین مقطع‌هایی به قطر μm ۲ تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

پارامترهای مورد بررسی

در این مطالعه تغییرات رفتاری، درصد مرگ و میر، تغییرات وزنی، تغییر در نیاز مصرفی آب و غذا، پارامترهای هماتولوژی از قبیل تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، mean corpuscular hemoglobin (MCH)، mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)، red blood cell distribution width (RDW) و سطح پلاکت‌ها و همچنین پارامترهای بیوشیمیایی از قبیل کراتین، اوره، قند ناشتا، کلسترول، تری‌گلیسیرید، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلانین‌ترنس آمیناز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، پروتئین تام، کلسیم، سدیم، فسفر و پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای خونی در آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور، تهران، ایران اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

در این مطالعه از نرم‌افزارهای آماری Sigma plot و از تست Oneway Anova جهت مقایسه آماری میانگین‌ها استفاده شد و میزان $P<0.05$ به عنوان تفاوت معنی‌دار آماری تلقی شد.

نتایج

بازده اسانس‌گیری

از g ۱۰۰۰ میوه‌ی گیاه زنیان به روش تقطیر با آب mL ۸۰ اسانس حاصل شد درنتیجه بازده حجمی- وزنی اسانس زنیان برابر با ۸ درصد است.

نتایج سمیت حاد

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه سمیت حاد و نمودار شماره ۱ مقدار LD_{50} برای اسانس گیاه زنیان ۲۲۹۴ mg/kg محاسبه شد.

نتایج تغییرات وزنی و نیاز به آب و غذا

طبق نتایج حاصل تفاوت معنادار آماری در میانگین وزنی حیوانات دریافت‌کننده‌ی اسانس زنیان و گروه شاهد مشاهده نشد. همچنین نتایج نشان داد که با تجویز اسانس زنیان نیاز مصرفی حیوان به غذا نسبت به حیوانات گروه شاهد افزایش می یابد ولی در میزان مصرف آب گروه دریافت‌کننده‌ی اسانس با گروه شاهد تفاوت آماری معنادار ایجاد نمی‌شود.

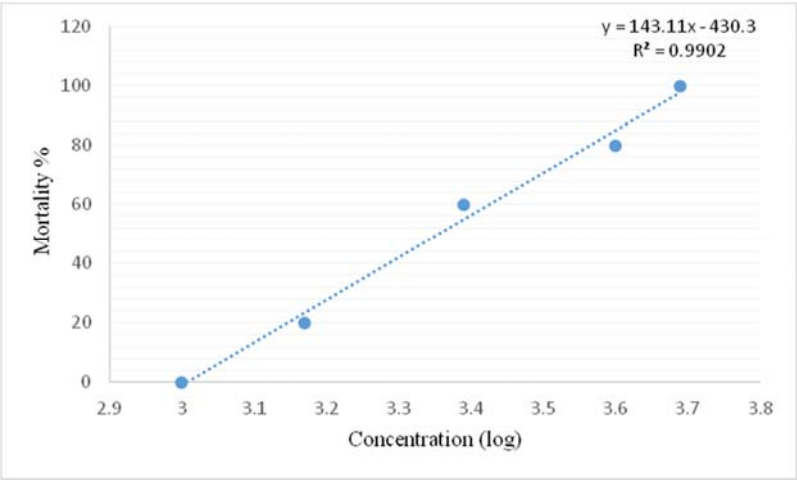
نتایج تغییرات رفتاری

در مدت زمان بررسی پس از تجویز اسانس گیاه زنیان با دوز ۱۰۰۰ mg/kg هیچ‌گونه تغییر رفتاری در رت‌ها مانند گروه شاهد مشاهده نشد. رفتارهای بررسی شده شامل عدم تیمار کردن سطح بدن، تغییر رنگ مو بدن، تمیزی و براقی روی سطح بدن، ریزش مو بدن، کنجکاوی نسبت به محرک‌های خارجی، میل به غذا خوردن و آب بوده‌اند.

نتایج سمیت تحت مزمن

نتایج هماتولوژی دوره ۲۳ و ۴۵ روزه

طبق نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای هماتولوژی که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، در گروه دریافت‌کننده‌ی اسانس میوه زنیان تعداد گلبول‌های سفید نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($P<0.01$). همچنین MCV نیز که بیان‌کننده‌ی حجم متوسط (میانگین) گلبول‌های قرمز است در گروه دریافت‌کننده‌ی اسانس نسبت به گروه شاهد در دوره ۲۳ و ۴۵ روز به صورت معناداری افزایش یافته است ($P<0.01$). سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده در خون حیوانات در هر دو دوره ۲۳ و ۴۵ روز تفاوتی با یکدیگر نداشته‌اند (جدول شماره ۱).



نمودار شماره ۱- غلظت- درصد مرگ و میر موش‌های صحرایی در تیمارهای اسانس گیاه زنیان (*T. ammi*)

جدول شماره ۱- تغییرات هماتولوژی خون موش‌های تیمارشده با اسانس گیاه زنیان (*T. ammi*) و گروه شاهد بعد از ۲۳ و ۴۵ روز (P<0.05,* P<0.01).**

معیارهای هماتولوژی	۲۳ روز		۴۵ روز	
	تیمار	شاهد	تیمار	شاهد
گلبول سفید (۱۰۰۰/µL)	۴/۳۷±۰/۳۳**	۲/۰۴±۰/۲۶**	۳/۰۶±۰/۹۱	۵/۶۳±۱/۵۸
گلبول قرمز (۱۰۰۰/µL)	۸/۱۵±۰/۳۲	۸/۹۵±۰/۱۹	۸/۶۶±۰/۶۱	۸/۷۸±۰/۰۸
هموگلوبین (g/dL)	۱۵/۷۵±۰/۹۱	۱۶/۲۵±۰/۲۱	۱۶/۸۰±۱/۶۹	۱۵/۸۵±۰/۰۷
هماتوکریت (%)	۴۹/۸۰±۲/۲۶	۴۹/۹۰±۰/۴۲	۵۰/۰۹±۴/۱۰	۴۷/۲۵±۰/۲۱
MCV (fl)	۶۱/۱۰±۰/۲۸**	۵۵/۷۰±۰/۷۰**	۵۸/۷۰±۰/۵۶**	۵۳/۸۰±۰/۲۸**
MCH (pg)	۱۹/۳۵±۰/۳۵	۱۸/۱۵±۰/۲۱	۱۹/۴۰±۰/۵۶	۱۸/۰۵±۰/۰۷
MCHC (g/dL)	۳۱/۶۰±۰/۴۲	۳۲/۶۰±۰/۱۴	۳۳/۰۰±۰/۷۰	۳۳/۵۰±۰/۰۰
RDW (%)	۱۸/۶۰±۲/۵۴	۱۹/۰۵±۱/۹۰	۱۹/۵۵±۰/۶۳	۱۹/۰۰±۰/۴۲
تعداد پلاکت (۱۰۰۰/µL)	۸۱۶/۵۰±۷۲/۸۳	۸۸۶/۰±۴۹/۴۹	۸۸۵/۵۰±۱۲۳/۷۴	۹۳۸/۵۰±۱۲۵/۱۵

MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red blood cell distribution width.

نتایج بیوشیمیایی دوره ۲۳ و ۴۵ روزه

در نمونه‌های ۲۳ روزه ارتباط معناداری بین فاکتورهای بیوشیمیایی در گروه تیمار شده با اسانس میوه گیاه *T. ammi* با گروه شاهد مشاهده نشد (جدول شماره ۲). در نمونه‌های ۴۵ روزه ارتباط معناداری بین اوره و کلسترول گروه شاهد و گروه دریافت‌کننده‌ی اسانس گیاه زنیان دیده شد. بدین صورت که با تجویز اسانس گیاه، میزان اوره و کلسترول افزایش یافت ($P<0.05$). همچنین تغییر معناداری در آنزیم AST در دوز 1000 mg/kg و گروه شاهد مشاهده شد، بدین ترتیب که با تجویز اسانس گیاه زنیان، میزان آنزیم AST افزایش یافت ($P<0.05$).

نتایج هیستوپاتولوژی دوره ۲۳ و ۴۵ روزه

در بررسی هیستوپاتولوژی ارگان‌های حیاتی شامل کبد، کلیه، ریه و طحال در رت‌های دریافت‌کننده‌ی اسانس زنیان با دوز ۱۰۰۰ mg/kg هیچ آسیب پاتولوژیک در دوره‌های ۲۳ و ۴۵ روزه مشاهده نشد (شکل شماره ۱).

در بافت کبد هیچ‌یک از موش‌های دریافت‌کننده اسانس میوه زنیان پس ۲۳ روز (شکل شماره a-۱) و ۴۵ روز (شکل شماره b-۱) هیچ نشانه‌ای از دژنراسیون و نکروز مشاهده نشد. تجمع سلول‌های شبیه به سلول‌های مونونوکلئر در برخی نمونه‌ها، چه شاهد و چه آزمون مشاهده شد که مربوط به فعالیت خونسازی خارج مرکزی (Extramedulla) در جوندگان است و طبیعی تلقی می‌شود. کانون‌های التهابی معدود که در هر دو گروه شاهد و آزمون دیده می‌شود؛ زمینه‌ای است و نمی‌توان آن را به اثر اسانس میوه زنیان نسبت داد. تغییرات ریخت‌شناختی حاکی از تغییرات پرولیفراتیو نیز مشاهده نشد.

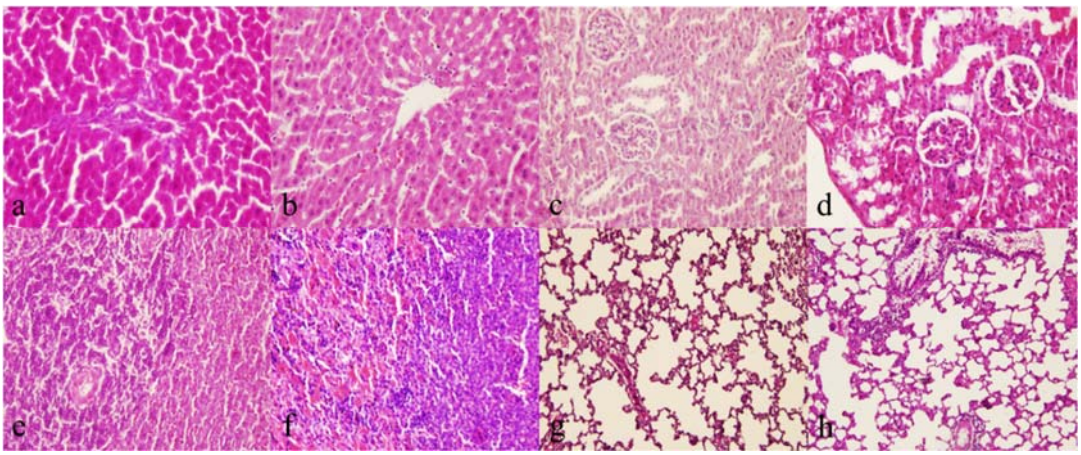
در کورتکس و مدولای کلیه نمونه‌های آزمون نشانه‌ای از نکروز و دژنراسیون دیده نمی‌شود (شکل شماره c, d-۱). نمای کلی گلومرولی کاملاً طبیعی است و حلقه‌های مویرگی داخل گلومرول نشانه‌ای از نکروز، هیپرتروفی یا احتقان نشان نمی‌دهند. ارتشاح سلول‌های التهابی بینابینی در برخی نمونه‌ها منظره‌ای است که در جوندگان به طور طبیعی دیده می‌شود.

نسبت سطح پولپ سفید/پولپ قرمز طحال در محدودهٔ طبیعی است. کامپارتمان‌های پولپ سفید به صورت طبیعی استقرار یافته‌اند. در کپسول نشانه‌ای حاکی از آتروفیِ طحال وجود ندارد و در مقطع عرضی، شکل معمول مثلث شکل طحال حاکی از فقدان هیپرتروفی در طحال همه‌ی گروه‌های

جدول شماره ۲- تغییرات بیوشیمیایی خون موش‌های تحت درمان با اسانس گیاه زنیان و گروه شاهد بعد از ۲۳ و ۴۵ روز (* P<0.01 , P<0.05).**

معیارهای بیوشیمیایی	۲۳ روز		۴۵ روز	
	تیمار	شاهد	تیمار	شاهد
قند ناشتا (mg/dL)	۹۷/۵۰±۲۷/۵۷	۷۷/۵۰±۹/۱۹	۱۱۴/۰۰±۴۲/۴۲	۱۲۴/۵۰±۲/۱۲
اوره (mg/dL)	۴۴/۵۰±۰/۷۰	۴۳/۵۰ ±۲/۱۲	۸۱/۵۰±۱۰/۶۰*	۴۵/۰۰±۱/۴۱*
کراتینین (mg/dL)	۰/۷۰±۰/۰۰	۰/۷۰±۰/۰۰	۰/۸۵±۰/۰۷	۰/۷۵±۰/۷۰
کلسترول (mg/dL)	۷۵/۵۰±۲/۱۲	۶۷/۵۰±۲/۱۲	۸۵/۰۰±۶/۳۶*	۶۱/۰۰±۴/۲۴*
تری‌گلسیرید (mg/dL)	۶۱/۰۰±۴/۲۴	۴۲/۵۰±۱۴/۸۴	۵۷/۵۰±۴/۹۴	۷۹/۵۰۰±۱۲/۰۲
کلسیم (mEq/L)	۹/۹۵±۰/۴۹	۹/۸۵±۰/۷۷	۱۰/۵۰±۰/۴۲	۹/۲۵±۰/۰۷
فسفر (mEq/L)	۹/۲۰±۲/۵۴	۸/۸۵±۱/۶۲	۹/۴۵±۰/۰۷	۶/۱۰±۰/۷۰
سدیم (mEq/L)	۱۴۲/۰۰±۱/۴۱	۱۴۳/۰۰±۲/۸۲	۱۴۰/۰۰±۱/۴۱	۱۳۹/۵۰±۰/۷۰
پتاسیم (mEq/L)	۴/۹۵±۱/۶۲	۵/۶۵±۱/۹۰	۴/۴۵±۰/۶۳	۴/۱۰±۰/۱۴
AST (IU/L)	۱۳۹/۰۰±۴۵/۲۵	۱۲۹/۵۰±۲۶/۱۲	۹۹/۵۰±۴/۹۴*	۸۳/۰۰±۰/۰۰*
ALT (IU/L)	۲۹/۵۰±۶/۳۶	۴۸/۰۰±۱۹/۷۹	۴۱/۵۰±۴/۹۴	۳۶/۰۰±۱/۴۱
LDH (IU/L)	۷۲۹/۰۰±۷۰/۰۰	۶۵۷/۰۰±۷۴/۹۵	۸۰۷/۵۰±۱۲۲/۳۲	۶۲۵/۵۰±۲۰۷/۱۸
پروتئین تام (g/dL)	۶/۹۰±۰/۷۰	۶/۹۰±۰/۱۴	۷/۰۵±۰/۳۵	۶/۳۵±۰/۲۱

AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase, LDH: Lactate dehydrogenase.



شکل شماره ۱- نمای هیستولوژی اعضای مورد بررسی موش صحرایی در بازه زمانی ۲۳ و ۴۵ روز پس از تیمار با اسانس میوه گیاه *T. ammi*. a) بافت کبد پس از ۲۳ روز، b) بافت کبد پس از ۴۵ روز، c) بافت کلیه پس از ۲۳ روز، d) بافت کلیه پس از ۴۵ روز، e) بافت طحال پس از ۲۳ روز، f) بافت طحال پس از ۴۵ روز، g) بافت ریه پس از ۲۳ روز، h) بافت ریه پس از ۴۵ روز. نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین با میکروسکوپ نوری بزرگنمایی ×۴۰ بررسی شدند.

حیوانی است. در مرکز بسیاری از فولیکول‌های پولپ سفید، مرکز مولّد (germinal center) با لمفوسیت‌های درشت و جبّه (mantle) با لمفوسیت‌های کوچک استقرار یافته‌اند که منظره‌ی طبیعی است. نشانه‌ای مبنی بر همولیز ناشی از تیمار حیوان‌ها با اسانس میوه زنیان در دوره ۲۳ روز و ۴۵ روز دیده نمی‌شود (شکل شماره e, f-۱).

مشاهدات میکروسکوپی نمونه‌های بافت ریه نشانه‌ای از تغییرات پرولیفراتیو یا غیر پرولیفراتیو در هیچیک از گروه‌ها

شاهد و آزمون را در زمان‌های بررسی نشان نمی‌دهد. تجمع بافت لنفاوی در نزدیکی راه‌های هوایی بزرگ طبیعی است (شکل شماره g, h–۱).

بحث

در این مطالعه سمیت حاد و تحت مزمن اسانس میوه گیاه زنیان با نام علمی *T. ammi* پرداخته و بر اساس نتایج مشاهده شد که اسانس این گیاه در دوزهای بالاتر از mg/kg ۱۷۰۰ اثرات سمی از خود نشان داده و باعث مرگ موش صحرایی می‌شود. مقدار LD_{50} برای اسانس میوه گیاه زنیان با استفاده از نمودار mg/kg ۲۲۹۴ محاسبه شد. با این حال در بررسی سمیت تحت حاد اسانس میوه *T. ammi* با دوز mg/kg ۱۰۰۰ هیچ‌گونه تغییر رفتاری در حیوانات صورت مشاهده نشد. میزان کراتینین و اوره نشان دهنده عملکرد کلیه و آنزیم‌های AST و ALT عملکرد کبد را نشان می‌دهند که در این مطالعه بررسی شده‌اند [۱۱، ۱۰]. نتایج مشاهده حاضر نشان داده است که AST، کلسترول و اوره پس از ۴۵ روز در گروه آزمون افزایش یافته است. ولی در بررسی بافت‌شناسی اندام‌های حیاتی این حیوانات شامل کبد، کلیه، ریه و طحال، هیچ‌گونه آسیب و تغییر پاتولوژیک گزارش نشد. در بررسی سمیت حاد مکمل گیاهی *Agnimukha churna* که در طب آیورودا (Ayuverdic) مورد استفاده می باشد و گیاه زنیان یکی از اصلی‌ترین گیاهان در کنار این گیاه با بیشترین مقدار است، دوزهای mg/kg ۲۰۰۰–۵ از مکمل به موش‌های صحرایی به صورت خوراکی داده شد و پس از مدت زمان ۱۴ روز هیچ مرگ و یا تغییر رفتاری در موش‌ها مشاهده نشد. در مطالعه سمیت تحت مزمن این مکمل عصاره آن برای ۲۸ روز با مقدار mg/kg ۱۰۰۰ به موش‌های صحرایی تجویز شد. نتایج مطالعه نشان دادند که وضعیت عمومی، رفتار، وزن، میزان آب و غذا، معیارهای هماتولوژی و بیوشیمیایی در کنار مشخصات بافت‌شناسی اندام‌ها در گروه آزمون بدون تغییر بوده است [۱۲]. در این صورت می‌توان گفت نتایج مشابه با این مطالعه قبلی در بررسی حاضر به دست آمده است. ترکیبات اسانس میوه زنیان که در این مطالعه مورد بررسی بوده است، در مطالعه دیگری توسط همکاران این مقاله با استفاده از GC-MS شناسایی شده است. اصلی‌ترین ترکیبات این اسانس مانند آنچه در بیشتر مطالعات قبلی هم بیان شده تیمول، *para*-cymene و *gamma*-terpinene بوده است [۱۳، ۷]. میزان تیمول در این اسانس ۷۴/۲ درصد، *para*-cymene ۱۶ درصد و *gamma*-terpinene ۷/۱ درصد گزارش شده است. همان‌طور که نتایج مطالعه قبلی نشان می‌دهد این سه ترکیب مونوترپنی بخش اصلی اسانس یعنی ۹۷/۳ درصد از اسانس را شامل می می‌شوند [۱۳]. بررسی سمیت اسانس *Satureja khuzestanica* با دوزهای mL/kg ۴–۰/۵ که اصلی‌ترین ترکیبات آن کارواکرول، کاروون و تیمول بوده است نیز نشان داده که معیارهای خون‌شناسی موش‌های تیمار شده با اسانس در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری نداشته است [۱۰]. همچنین تجویز خوراکی اسانس *S. khuzestanica* اثرات قابل توجه آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت و کاهنده چربی خون در موش صحرایی داشته است و عوارض ناخواسته و یا سمی را نیز سبب نشده است [۱۴]. در مطالعه دیگری بررسی اثر تجویز همزمان تیمول و کارواکرول سبب افزایش فعالیت آنزیم‌ها با اثر آنتی آنتی‌اکسیدانی شده، اکسیداسیون چربی‌ها را کاهش داده و ایمنی را در جوجه‌ها افزایش داده و معیارهای خون‌شناسی را نیز تغییر نداده است [۱۵].

به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از سمیت حاد، اسانس گیاه زنیان را می‌توان در دسته‌ی Moderately Toxic طبقه‌بندی نمود. اما در بررسی سمیت تحت مزمن اسانس گیاه زنیان و با توجه به نتایج حاصل از مطالعه‌ی هیستوپاتولوژی ارگان‌های حیاتی حیوان مورد آزمایش اسانس میوه گیاه زنیان با غلظت mg/kg ۱۰۰۰ اثرات سمی از خود نشان نداد با این حال مطالعات بیشتر جهت بررسی سمیت ژن و سمیت مزمن آن در پستانداران توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با شماره ۲۸۱۶۴–۱۶۹–۰۱–۹۴ با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

منابع

1. Bairwa R, Sodha RS and Rajawat BS. *Trachyspermum ammi*. *Pharmacogn Rev*. 2012; 6 (11): 56-60.

2. Nayak B and Patel K. Pharmacognostic studies of the Jatropha curcas leaves. *Methodology* 2010; 1: 6-18.

3. Zenian. http://daneshnameh.roshd.ir/mavara/mavara-index.php?page 2017 [updated 22 april 2017].

4. Jeet K, Devi N, Narender T, Sunil T, Shalta L and Raneev T. Trachyspermum ammi (ajwain): a comprehensive review. *Int. Res. J. Pharm*. 2012; 3 (5): 133-8.

5. Zenian. http://ravazadeh.com/fa/content/ehyaye-salamat-article/traditional-articles/4460 2017 [updated 24 april 2017].

6. Zarshenas MM, Moein M, Samani SM and Petramfar P. An overview on ajwain (*Trachyspermum ammi*) pharmacological effects; modern and traditional. *J. Nat. Remedies* 2013; 14 (1): 98-105.

7. Gandomi H, Abbaszadeh S, JebelliJavan A and Sharifzadeh A. Chemical constituents, antimicrobial and antioxidative effects of *Trachyspermum ammi* essential oil. *J. Food Process. Pres*. 2014; 38 (4): 1690-5.

8. Ecobichon DJ. The Basis of Toxicity Testing. 2, editor. New York: CRC Press. 1997.

9. Pfaller W, Balls M, Clothier R, Coecke S, Dierickx P, Ekwall B and et al. Novel advanced in vitro methods for long-term toxicity testing. *ATLA*. 2001; 29 (4): 393-426.

10. Fallahi S, Mahmoudvand H, Beiranvand M, Kheirandish F, Nayebzadeh H and Jahanbakhsh S. Chemical composition, acute and sub-acute toxicity of *Satureja khuzestanica* essential oil in mice. *Marmara Pharm. J*. 2017; 21 (3): 515-21.

11. Mahmoudvand H, Tavakoli Oliaei R, Mirbadie SR, Kheirandish F, Tavakoli Kareshk A, Ezatpour B and et al. Efficacy and safety of *Bunium persicum* (Boiss) to inactivate protoscoleces during hydatid cyst operations. *Surg. Infect.* 2016; 17 (6): 713-9.

12. Jain P, Rao SP, Singh V, Pandey R and Shukla SS. Acute and sub-acute toxicity studies of an ancient ayurvedic formulation: Agnimukhachurna. *Columbia J. Pharm. Sci*. 2014; 1: 18-22.

13. Omidpanah S, Vazirian M, Hosseinkhani F, Hadjiakhondi A, Pirali M and Hamedani AM. Antibacterial activity of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill against isolated and standard bacteria. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 2016; 4 (2): 05-11.

14. Abdollahi M, Salehnia A, Mortazavi SHR, Ebrahimi M, Shafiee A, Fouladian F and et al. Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja Khuzestanica* in rat *in vivo*: a toxicopharmacological study. *Med. Sci. Monit*. 2003; 9 (9): BR331-BR5.

15. Hashemipour H, Kermanshahi H, Golian A and Veldkamp T. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult. Sci*. 2013; 92 (8): 2059-69.

Toxicity Evaluation of Essential oil of *Trachyspermum ammi* in Acute and Sub-chronic Toxicity Experiments

Vazirian M (Ph.D.)[1,2*], Hekmati D (Pharm.D.)[3], Ostad SN (Ph.D.)[4], Manayi A (Ph.D.)[2*]

1- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Medicinal Plants Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Faculty of Pharmacy, International Campus, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
*Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel & Fax: +98-21-64121229
E-mail: manayi@sina.tums.ac.ir

Abstract

Background: ***Trachyspermum ammi* is one of the prominent plant in traditional medicine of the east with several medicinal effects such as improvement of stomach disease, digestive disorder, diarrhea, hemorrhoid, bladder stones, respiratory disease and etc. Medicinal plants is one of the important reason of toxicity particularly in children and the elderly therefore, evaluation of the toxic effects of a plant is important.**

Objective: The aim of present study was evaluation of toxicity of ajowan oil in experimental animals.

Methods: Initially, essential oil of the plant fruit was extracted to study the acute toxicity to rats by gavage. The animals were treated with 1000 mg/kg of the essential oil for 23 and 45 days to determine chronic. Hematological and biochemical parameters of rats' blood samples were collected and spleen, kidney, liver and lung of rats were isolated for histopathologic examination.

Results: According to acute studies result lethal dose, 50% (LD_{50}) of ajowan essential oil was about 2294 mg/kg. Chronic evaluation showed that there is no statistical difference between weight, food and water consumption of test and control groups. Further, tissue analysis showed no serious change in examined tissues in the treated rats.

Conclusion: Finally according to results, no chemical parameters of blood and histological pattern of tissue were affected by *T. ammi* oil; however the oil could be classified as moderately toxic due to its LD_{50} value.

Keywords: ***Trachyspermum ammi*, Acute toxicity, Ajowan, Essential oil**