ارزیابی سمیت حاد و تحت مزمن عصاره‌ی گل و برگ گیاه فرولاپرسیکا در موش سوری ماده

مریم سلیمانی‌فر[۱]، فراز مجاب[۲]، سپیده اربابی بیدگلی[۳]*

۱- دانشجوی دکترای داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استاد، گروه سم‌شناسی داروشناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان دکتر شریعتی، قلهک، ابتدای خیابان یخچال، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه سم‌شناسی داروشناسی، صندوق‌پستی: ۱۹۴۱۹۳۳۱۱۱

تلفن: ۲۲۰۰۶۲۲۱ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۶۰۰۰۹۹ (۰۲۱)

پست الکترونیک: arbabi@iaups.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۰ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۱۱/۲

چکیده :

مقدمه: اگرچه مطالعات متعددی پیرامون سمیت گونه‌های مختلف جنس فرولا صورت گرفته، اما تاکنون مطالعه‌ی کنترل شده‌ای به طور اختصاصی بر روی سمیت خوراکی عصاره‌های گل و برگ گیاه فرولا پرسیکا انجام نشده است.

هدف: هدف از این تحقیق تعیین سمیت حاد و تحت مزمن عصاره‌ی این گیاه با بررسی اثرات بالینی، هماتولوژیک بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک است.

روش بررسی: پس از تهیه‌ی گیاه فرولا پرسیکا، تأیید آن توسط هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی، عصاره‌گیری از گل و برگ گیاه و آنالیز و استانداردسازی عصاره‌های گل و برگ به طور جداگانه، مطالعات سمیت حاد و تحت مزمن با استفاده از دستورالعمل‌های OECD 423 و OECD 407 صورت گرفت.

نتایج: در بخش سمیت حاد گیاه، هیچ‌گونه تغییرات ظاهری، رفتاری و مرگ و میر پس از ۲۴ ساعت و ۱۴ روز در موش‌ها مشاهده نشد. طی بررسی سمیت تحت مزمن (۲۸ روزه با دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم)، فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی تغییر معنی داری در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نداشتند و طی بررسی هیستوپاتولوژیک کلیه‌ی بافت‌های مورد مطالعه از جمله کبد، کلیه، قلب، ریه، طحال و اندام‌های جنسی حیوانات سالم بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به مطالعه سمیت عصاره‌ی بخش‌های هوایی گیاه فرولاپرسیکا در دوزهای مورد آزمایش، محدوده ایمن عصاره برگ و گل هر دو معادل mg/kg ۱۰۰۰ در موش سوری ماده تعیین شد که می‌توان از این اطلاعات جهت فرمولاسیون‌های دارویی با اهداف درمانی بهره‌برداری نمود.

گل‌واژگان: فرولاپرسیکا، سمیت تحت مزمن، سمیت حاد، عصاره

مقدمه

تیره‌ی چتریان یا Umbelliferae یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهان علفی هستند. عصاره و اسانس گیاهان این خانواده غنی از ترکیبات شیمیایی گسترده بوده و دارای جنس‌های بی‌شماری هستند که از دیرباز از ارزش دارویی و اقتصادی بالایی برخوردار بوده‌اند [۱]. این تیره از گیاهان حدوداً دارای ۳۰۰ جنس و ۳۰۰۰ گونه می‌باشد که علی‌رغم توزیع گسترده‌ی تیره‌ی چتریان، بیشتر گیاهان این تیره در نواحی معتدل شمالی و ارتفاعات بلند مناطق گرمسیری یافت می شوند. برخی از گیاهان این تیره همچنین حاوی کومارین‌ها و مقادیر کمی از فرآورده‌های فتوسنتری نظیر اسیدهای آلی، رزین و آلکالوئید می‌باشند. اگرچه موارد استفاده از گونه‌های متعلق به این تیره متفاوت می‌باشد لیکن گیاهان این تیره همواره در صنایع غذایی و دارویی استفاده وسیعی داشته‌اند [۱].

یکی از جنس‌های مهم و پرکاربرد خانواده جنس Ferula (آپیاسه) که خود بیش از ۱۵۰ گونه داشته و بومی آسیای مرکزی است. از میان گونه‌های این گیاه، ۵۳ گونه‌ی آن به صورت خودرو در ایران می‌رویند و در ایران به عنوان ماده غذایی و نیز در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳، ۲]. از گونه‌های بومی ایران می‌توان به آنغوزه (*Ferula asafoetida*)، باریجه (قاسنی) (*Ferula gummosa* Boiss) و *Ferula persica* اشاره کرد.

گونه *Ferula persica* که برای این مطالعه در نظر گرفته شده است در منطقه‌ی شهمیرزاد استان سمنان به صورت گسترده رویش دارد به نام محلی مُتکا (moteka) معروف بوده و کاربرد غذایی و طب سنتی فراوانی دارد. در مطالعات بسیاری که روی عصاره و اسانس چندین گونه از جنس Ferula انجام شده است، خواص ضد التهاب [۴]، تب‌بر [۴]، ضد درد [۴]، ضد HIV [۵]، ضد کرم و ضد نفخ [۶]، ضد بارداری [۸، ۷] ، شل‌کننده‌ی عضلانی [۱۰، ۹] و... گزارش شده است. *Ferula persica* (سکبینه) که در عربی آن را سکبینج (sakbinag) می‌نامند یک گیاه علفی پایا به ارتفاع ۲ـ۱ متر می‌باشد. برگ‌های بزرگ و اکثراً ظریف جداشونده دارد. برگ‌های قاعده‌ای ۳ تا ۴ بار شانه‌ای، به طول ۳۰ تا ۳۵ و عرض ۲۵ سانتی‌متر، در سطح فوقانی بدون کرک، در سطح تحتانی با کرک‌های تنک یا متراکم، با لوب‌هایی به طول ۴ تا ۲۰ و عرض ۳ تا ۱۰ میلی‌متر، با لبه‌ی کامل و دندانه‌های درشت دارد، همچنین چترک‌های میوه دار دارای شعاع‌های ۱۷ تا ۲۵ تایی می‌باشد، گلبرگ‌های آن زرد، سبز متمایل به سفید یا زرد، دراز یا بیضی با رأس کاملاً خمیده می‌باشد. در نواحی کوهستانی شمال ایران، دامنه‌های اطراف تهران و نواحی مختلف البرز می‌روید. زیستگاه اصلی این گیاه در کوهستان‌های سرد و شیب‌دار با خاک وازیره‌ای می‌باشد [۱۳–۱۱].

مطالعات حیوانی انجام شده روی ریشه‌ی گونه‌های مختلف جنس Ferula از جمله فرولا گوموزا دلالت بر اثرات آرام‌بخش این عصاره روی موش سوری در دوزهای ۱۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میلی میلی‌گرم بر کیلوگرم داشته است [۱۴]. در مطالعه‌ی انجام شده روی عصاره گیاه فرولا کمیونیس، سمیت سلولی گیاه روی سلول‌های بنیادی و سلول‌های اپیتلیال کلیوی نیز ارزیابی شده است [۱۵]. در مطالعه‌ی دیگری روی همین گیاه اثرات سایتوتوکسیک، ضدانعقاد و شبه استروژنیک گیاه به اثبات رسیده است [۱۶]. در مطالعه‌ای روی سمیت سلولی و سمیت گیاهی گیاه فرولا سودالیاسه، کومارین‌های مستخرج از ریشه‌ی این گیاه کاربردهایی به عنوان علف‌کش قوی و عوامل محافظ سلولی در مقابل سرطان داشتند [۱۷]. در مطالعه‌ای که روی چندین گونه از جنس فرولا بر روی نوعی میگو به عنوان مدل انجام شد هیچ هیچ‌کدام از گونه‌های فرولا تست شده نتوانستند از تشنج القا شده با پنتیلن تترازول در دوز استفاده شده (۹۰ mg/kg) جلوگیری کنند و همچنین سمیت سلولی وابسته به دوز گیاه فرولا آسافوئتیدا (از گیاهان مورد آزمایش در مطالعه) نیز به اثبات رسیده است [۱۸]. در مطالعه‌ای روی سمیت تولیدمثلی و اثرات ناباروری عصاره فرولا هورمونیس، کاهش مشهودی در باروری موش‌ها، آمار لقاح، موش‌های جفت‌گیری کرده و جنین‌های زنده پس از تجویز دوز ۳ mg/kg/d از عصاره طی ۶ هفته مشاهده شد [۱۹]. در مطالعه‌ای روی سمیت حاد و تحت مزمن صمغ رزینی فرولا کمیونیس، این عصاره دارای سمیت متوسطی با LD50 به میزان ۱۶۵۰ mg/kg در رت و ۲۰۰۰ mg/kg در موش سوری بود [۲۰]. در مطالعه‌ی دیگری روی ۲ گونه گیاه فرولا کمیونیس این نتیجه ثبت شد که کومارین‌های پرنیلیتد بر روی رت اثر سمیت روی انعقاد خون دارند [۲۱].

با توجه به پیش‌بینی اثرات آرام‌بخشی قوی برای بخش‌های هوایی این گیاه *Ferula persica*، مطالعه حاضر در نظر دارد تا برای اولین بار روی برگ و گل گیاه *Ferula persica* (اندام هوایی گیاه) متمرکز شود. با توجه به مطالعات موجود روی سمیت این گونه‌ی گیاهی تا به حال صرفاً به طور بسیار محدودی کار شده و تنها اثرات آنتی‌اکسیدانت [۲۲]، آنتی‌موتاژنیک [۲۲] و ضد تشنج [۲۳] عصاره‌ی آن بررسی شده است. لذا هدف اصلی مطالعه، بررسی اثر سمیت حاد خوراکی عصاره‌ی گل و برگ گیاه *Ferula persica* (بررسی ۱۴ روزه) و اثر سمیت تحت مزمن خوراکی عصاره‌ی آن گیاه به مدت ۲۸ روز و مطابق با دستورالعمل‌های معتبر بین‌المللی است.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه: گیاه فرولا پرسیکا در اردیبهشت سال ۱۳۹۵ از منطقه‌ی شهمیرزاد استان سمنان گردآوری شد و سپس بخش‌های هوایی گیاه شامل گل و برگ جداسازی شد. پس از شناسایی گیاه در هرباریوم دانشکده داروسازی واحد علوم دارویی و صدور کد شناسایی، برگ و گل خشک شده‌ی گیاه مذکور در آزمایشگاه فارماکوگنوزی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، به دقت خرد و پودر شد.

عصاره‌گیری: پودر حاصل از خردکردن گل و برگ گیاه به طور جداگانه در پرکولاتور ریخته شد و هر کدام از پودرها طی ۳ مرحله که هر مرحله ۱ هفته به طول انجامید به حجم معینی از حلال آلی متانول آغشته شد به طوری که حلال کاملاً سطح پودر را فراگیرد و به اندازه‌ی یک بند انگشت از سطح پودر بالاتر باشد، شیر زیر پرکولاتور با پنبه به دقت بسته و روی آن نیز با فویل آلومینیومی کاملاً پوشیده شد. در پایان هر هفته پودر کاملاً حلال را به خود جذب کرده بود. در این مرحله یک بشر زیر پرکولاتور گذاشته و حلال کاملاً خارج شد و محتویات بشر زیر هود گذاشته شد. پس از گذشت حدود ۲ هفته باقیمانده حلال توسط دستگاه Rotary Evaporator جداسازی و حلال آن به طور کامل جدا شد. درنهایت پودری با رنگ سیاه و غیرمحلول در آب برای ورود به مرحله تجویز فراهم شد. ازآنجایی که پودر حاصل در آب حل نمی‌شد آن را به دقت ریز کرده و با کمک دستگاه Sanicator به صورت محلول در آمد و عصاره‌های به دست آمده به طور جداگانه در مطالعات حاد و تحت مزمن از طریق گاواژ به موش سوری ماده تجویز شد.

آماده‌سازی حیوانات: موش‌های مورد آزمون، از حیوان‌خانه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و سلامتی حیوانات طبق نظر دامپزشک به تایید رسید. در ارزیابی سمیت حاد گیاه برای تعیین محدوده LD50 خوراکی، از روش ارایه شده در پروتکل OECD شماره ۴۲۳ مبنی بر تست سمیت حاد، استفاده شد. به این شکل که ۲۴ موش سوری آزمایشگاهی جنس ماده با سن ۱۲-۸ هفته و وزن ۲۰-۲۴ گرم تهیه و به مدت ۱۰ روز در قفس نگه‌داری شدند تا با محیط آزمایشگاه سازگاری پیدا کنند. در این مدت، آب و غذای حیوانات به میزان کافی فراهم بود. اما به مدت ۴ ساعت قبل از تجویز حیوان ناشتا نگه داشته شد.

سمیت حاد: چون اطلاعاتی از سمیت گیاه در دست نبود دوزهای ۵، ۵۰، ۳۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی گل و برگ گیاه به طور جداگانه به موش اول در هر دوز در هریک از گروه‌های ۳ تایی از موش‌ها گاواژ شد. به مدت ۴۸ ساعت، تغییرات رفتاری و ظاهری موش زیر نظر گرفته و بررسی شد. سپس به علت عدم مشاهده تغییر قابل ذکری در موش اول، دو موش باقیمانده هم در هر دوز گروه دوز تعیین شده را دریافت کردند. پس از اتمام تجویز، ثبت مشاهدات تا ۱۴ روز ادامه یافت [۲۴].

سمیت تحت مزمن: در ارزیابی سمیت تحت مزمن گیاه، تعداد ۱۵ موش سوری ماده از حیوان خانه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و سلامتی حیوانات طبق نظر دامپزشک به تایید رسید. از این تعداد ۵ موش برای گاواژ عصاره‌ی گل، ۵ موش برای گاواژ عصاره‌ی برگ و ۵ موش به عنوان گروه کنترل درنظر گرفته شدند. سن حیوانات بین ۶ تا ۸ هفته بود. پیش از شروع آزمایش، حیوانات به مدت ۱۰ روز در محیط حیوانخانه و با آب و غذای کافی، نگهداری می‌شوند تا با شرایط محیط سازگار شده و از نظر سلامت، مورد ارزیابی قرار گیرند. شرایط حیوانخانه باید به صورتی که در زیر ذکر شده، باشد:

- دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد همراه با سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی.
- اندازه‌گیری روزانه آب و غذای حیوانات.
- سه بار در هفته، نظافت قفسه‌ها [۲۵].

در بخش تجویز خوراکی عصاره، دوز ۱۰۰۰ mg/kg/d به هریک از دوز گروه‌های عصاره گل و برگ که شامل ۵ موش بودند، گاواژ شد. به ۵ موش ماده در گروه کنترل، نرمال سالین ۰/۹٪ تجویز شد. مقدار دوز تجویزی عصاره برای گروه تیمار و حجم نرمال سالین مورد نیاز برای گروه کنترل، با توجه به وزن روزانه حیوان، تعیین و به کمک سرنگ گاواژ، به موش تجویز خوراکی شد. در طول مدت آزمایش که یک دوره‌ی ۲۸ روزه را شامل می‌شد، وزن موش‌ها و میزان آب و غذای مصرفی به طور روزانه اندازه‌گیری می‌شد. پس از طی دوره‌ی ۲۸ روزه با رعایت موازین اخلاقی موش‌ها با اتر کشته شده و به صورت تصادفی خون ۳ موش از ۵ موش در هر یک از گروه‌های عصاره‌ی گل، عصاره‌ی برگ و کنترل گرفته شد و برای انجام تست‌های بیوشیمیایی و هماتولوژیک به آزمایشگاه فرستاده شد. بافت‌های موردنظر شامل کلیه، کبد، ریه، طحال، قلب، تخمدان و رحم نیز از ۳ موش مورد نظر در هر گروه جداسازی شدند. پس از توزین انجام نکروپسی و فیکس کردن بافت‌ها در فرمالین ۱۰٪، کلیه‌ی مطالعات پاتولوژیک اعم از تهیه بلوک پارافینیزه، تهیه و رنگ آمیزی اسلایدهای H&E و بررسی‌های میکروسکوپیک در بخش پاتولوژی به انجام رسید.

مطالعات آماری: به منظور تحلیل داده‌ها جهت مقایسه میانگین متغیرها از t-test و جهت بررسی تاثیر مداخله از One Way Anova و P-value بیشتر از ۰/۰۵ به عنوان معیار عدم تأثیر عصاره‌ی مورد آزمایش بر آزمودنی موردنظر تعیین شد.

نتایج

سمیت حاد عصاره‌ی گل: هیچ یک از موش‌های مورد آزمایش تا ۴۸ ساعت هیچ تغییر رفتاری و ظاهری را نشان ندادند، همچنین تا ۱۴ روز بعد نیز هر روز، موش‌ها بررسی می شدند و تا روز آخر سالم و سرحال بودند. این بررسی نشان می دهد که LD50 عصاره‌ی گل و برگ مورد آزمایش بیشتر از ۲۰۰۰ mg/kg است.

سمیت حاد عصاره‌ی برگ: هیچ یک از موش‌های مورد آزمایش تا ۴۸ ساعت هیچ تغییر رفتاری و ظاهری را نشان ندادند، همچنین تا ۱۴ روز بعد نیز هر روز، موش‌ها بررسی می شدند و تا روز آخر سالم و سرحال بودند. این بررسی نشان می دهد که LD50 عصاره‌ی گل و برگ مورد آزمایش بیشتر از ۲۰۰۰ mg/kg است.

سمیت تحت مزمن عصاره‌ی گل و برگ:

- مصرف آب و غذا: در بررسی میزان آب و غذای مصرفی حیوانات نیز هیچ تغییری در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل دیده نشد (جدول شماره ۱).
- مرگ و میر: در بررسی سمیت تحت مزمن در طول ۲۸ روز مطالعه هیچ مورد مرگ و میری در گروه‌های تحت تجویز مشاهده نشد.
- مطالعات نکروپسی: وزن ارگان‌های حیاتی حیوانات شامل کلیه، کبد، ریه، طحال، قلب و دستگاه تناسلی نیز نسبت به وزن کل بدن محاسبه شد و هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین ارگان‌های توزین شده ی گروه کنترل با دو گروه تحت تجویز عصاره ی گل و عصاره ی برگ مشاهده نشد.
- در بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی گلوکز، اوره، کراتینین، الکترولیت‌ها شامل سدیم و پتاسیم، پروتئین، آلبومین، آنزیم‌های کبدی شامل آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز (GGT)، بیلی‌روبین، پروفایل چربی شامل کلسترول و تری گلیسیرید در پایان روز ۲۸ بررسی شد و هیچ‌گونه تغییر قابل توجهی در فاکتورها بین گروه کنترل و گروه های تیمار دیده نشد و در همه‌ی موارد P-value بیشتر از ۰/۰۵ بود (جدول شماره ۲).
- همچنین در بررسی فاکتورهای هماتولوژیک شامل گلبول های قرمز (RBC)، گلبول‌های سفید (WBC)، هموگلوبین (Hgb)، هماتوکریت (HCT)، نوتروفیل و لنفوسیت نیز بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار هیچ تغییر قابل توجهی مشاهده

نشد و در این بخش نیز P-value بیشتر از ۰/۰۵ بود (جدول شماره ۳).

مطالعات هیستوپاتولوژیک: در مقایسه بین بافت‌های مطالعه شده در موش‌های مورد آزمایش در گروه عصاره‌ی گل و عصاره ی برگ با گروه کنترل، هیچ تغییری در بافت‌های کبد، کلیه، ریه، قلب، طحال، تخمدان و رحم در پایان ۲۸ روز دیده نشد و بافت ها کاملاً نرمال بودند (شکل شماره ۱)

جدول شماره ۱- مقایسه میزان مصرف آب و غذا در پایان مطالعه ۲۸ روزه بین گروه‌های تحت رژیم عصاره گل، عصاره برگ و کنترل

فاکتورها	گروه ها	میانگین	دامنه تغییرات	P-value
	کنترل	۶۲/۵۸۳	۱/۶۶۴	-
آب(میلی لیتر)	عصاره گل	۶۱/۳۳۳	۲/۳۲۲	۰/۴۹۱
	عصاره برگ	۶۴/۱۶۶	۱/۹۴۱	۰/۳۴۴
	کنترل	۴۵/۰۸۳	۴/۹۱۳	-
غذا(گرم)	عصاره گل	۴۱/۷۵۰	۵/۰۵۵	۰/۴۵۹
	عصاره برگ	۴۵/۵۰۰	۳/۵۰۰	۰/۹۱۱

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین متغیرهای بیوشیمیایی بین گروه‌های تیمار و کنترل (مطالعه ۲۸ روزه)

فاکتورها	گروه‌ها	میانگین	دامنه تغییرات	P-value
	کنترل	۸۵/۰۰۰	۱۰/۸۱۶	-
گلوکز (mg/dl)	عصاره گل	۸۵/۸۷۰	۶/۳۹۸	۰/۹۱۰
	برگ	۷۳/۵۰۰	۲/۷۸۳	۰/۱۴۹
	کنترل	۳۰/۸۳۳	۲/۵۶۵	-
اوره (mg/dl)	عصاره گل	۳۰/۸۷۶	۱/۸۷۰	۰/۹۸۲
	برگ	۳۱/۳۷۶	۳/۴۲۶	۰/۸۳۷
	کنترل	۰/۴۵۶	۰/۰۶۶	-
کراتینین (mg/dl)	عصاره گل	۰/۴۵۰	۰/۰۶۲	۰/۹۰۵
	عصاره برگ	۰/۴۶۳	۰/۵۸۵	۰/۹۰۳
	کنترل	۱۴۱/۰۷۰	۳/۵۷۸	-
سدیم (mEq/l)	عصاره گل	۱۴۱/۷۵۶	۴/۷۱۹	۰/۸۵۱
	عصاره برگ	۱۳۹/۸۷۰	۵/۵۴۶	۰/۷۶۹
	کنترل	۴/۹۷۰	۰/۵۶۹	-
پتاسیم (mEq/l)	عصاره گل	۵/۰۳۶	۰/۷۲۵	۰/۹۰۶
	عصاره برگ	۵/۱۲۳	۰/۴۵۶	۰/۷۳۴
	کنترل	۴/۹۸۶	۰/۴۴۷	-
پروتئین (g/dl)	عصاره گل	۴/۹۷۶	۰/۳۶۰	۰/۹۷۷
	عصاره برگ	۴/۹۴۶	۰/۴۱۹	۰/۹۱۵
	کنترل	۲/۵۰۳	۰/۲۴۲	-
آلبومین (g/dl)	عصاره گل	۲/۶۹۶	۰/۲۰۵	۰/۳۵۱
	عصاره برگ	۲/۵۶۰	۰/۱۴۵	۰/۷۴۶

ادامه جدول شماره ۲-

فاکتورها	گروه‌ها	میانگین	دامنه تغییرات	P-value
AST (u/l)	کنترل	۵۶/۷۶۰	۳/۱۴۶	-
	عصاره گل	۵۸/۵۶۰	۲/۴۱۰	۰/۴۷۶
	عصاره برگ	۵۷/۰۶۶	۴/۴۰۱	۰/۹۲۷
ALT (u/l)	کنترل	۵۶/۷۶۰	۳/۱۴۶	-
	عصاره گل	۵۸/۵۶۰	۲/۴۱۰	۰/۲۲۲
	عصاره برگ	۵۷/۰۶۶	۴/۴۰۱	۰/۹۲۷
ALP (u/l)	کنترل	۱۱۵/۳۳۳	۱۷/۴۸۰	-
	عصاره گل	۹۹/۶۸۳	۶/۸۰۲	۰/۲۲۲
	عصاره برگ	۱۰۸/۳۳۳	۲۱/۸۳۰	۰/۶۸۷
GGT (u/l)	کنترل	۴/۰۵۰	۰/۳۷۶	-
	عصاره گل	۳/۷۹۰	۰/۵۸۷	۰/۵۵۴
	عصاره برگ	۳/۹۱۶	۰/۴۰۲	۰/۶۹۷
بیلی‌روبین (mg/dl)	کنترل	۰/۶۰۳	۰/۰۷۰	-
	عصاره گل	۰/۶۱۰	۰/۳۶۰	۰/۸۹۱
	عصاره برگ	۰/۵۵۳	۰/۱۱۰	۰/۵۴۴
کلسترول (mg/dl)	کنترل	۱۳۳/۳۳۳	۳/۲۰۸	-
	عصاره گل	۱۳۸/۱۶۶	۳/۲۵۳	۰/۱۴۱
	عصاره برگ	۱۳۷/۱۶۶	۶/۳۳۱	۰/۴۰۳
تری گلیسیرید (mg/dl)	کنترل	۸۵/۳۶۷	۷۹/۳۴۳	-
	عصاره گل	۸۱/۲۵۰	۳/۱۳۲	۰/۱۹۳
	عصاره برگ	۷۹/۳۴۳	۶/۴۱۴	۰/۲۳۲

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین متغیرهای هماتولوژیک بین گروه‌های تیمار و کنترل (مطالعه ۲۸ روزه)

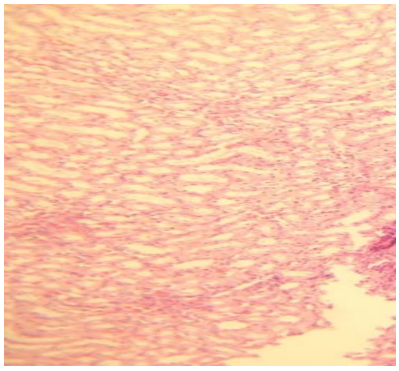
فاکتورها	گروه‌ها	میانگین	دامنه تغییرات	P-value
گلبول قرمز (*1000000/mm3)	کنترل	۴/۷۰۰	۱/۲۱۲	-
	عصاره گل	۴/۱۰۰	۰/۴۰۰	۰/۴۶۱
	عصاره رگ	۴/۹۰۰	۰/۶۲۴	۰/۸۱۲
گلبول سفید (*1000/mm3)	کنترل	۵/۰۶۶	۰/۵۱۳	-
	عصاره گل	۵/۰۳۳	۰/۵۸۵	۰/۹۴۴
	عصاره برگ	۵/۲۳۳	۰/۳۷۸	۰/۶۷۴
هموگلوبین (g/dl)	کنترل	۱۱/۰۹۳	۰/۳۶۸	-
	عصارهگل	۱۱/۲۴۶	۰/۱۴۱	۰/۵۳۸
	عصاره برگ	۱۱/۱۰۶	۰/۲۴۱	۰/۹۶۱
هماتوکریت (%)	کنترل	۳۲/۸۳۳	۱/۶۰۷	-
	عصارهگل	۳۳/۱۰۰	۰/۳۶۰	۰/۷۹۳
	عصارهبرگ	۳۲/۸۳۳	۰/۶۵۰	۱/۰۰۰

ادامه جدول شماره ۳-

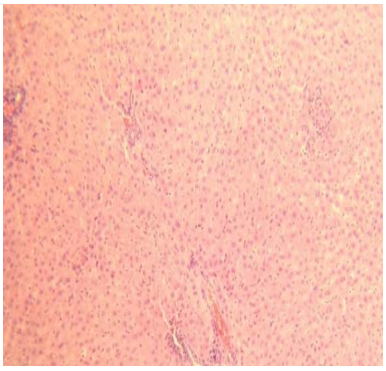
فاکتورها	گروه‌ها	میانگین	دامنه تغییرات	P-value
	کنترل	۲۳/۰۰۰	۲/۰۰۰	-
نوتروفیل (%)	عصارهگل	۲۳/۳۳۳	۴/۰۴۱	۰/۹۰۴
	عصارهبرگ	۲۱/۶۶۶	۱/۱۶۳	۰/۴۱۱
	کنترل	۷۷/۰۰۰	۲/۰۰۰	-
لنفوسیت (%)	عصارهگل	۷۶/۶۶۶	۴/۰۴۱	۰/۹۰۴
	عصارهبرگ	۷۸/۰۰۰	۲/۰۰۰	۰/۵۷۳

شکل شماره ۱- مقایسه وضعیت هیستوپاتولوژیک بین گروه‌های تیمار و کنترل (مطالعه ۲۸ روزه)

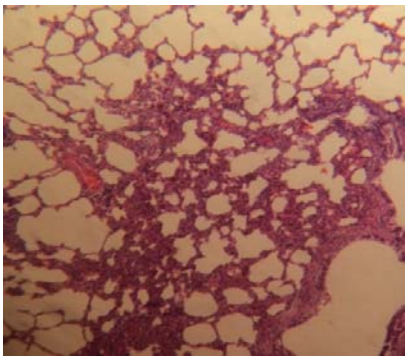
الف: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین از بافت‌های گروه تیمار با عصاره‌ی گل با بزرگنمایی ۴۰:



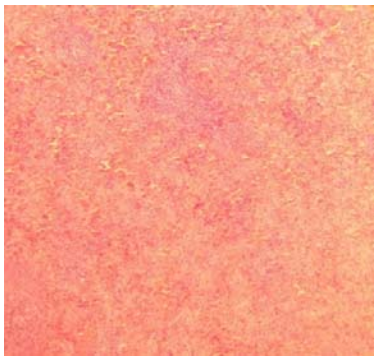
بافت نرمال کلیه



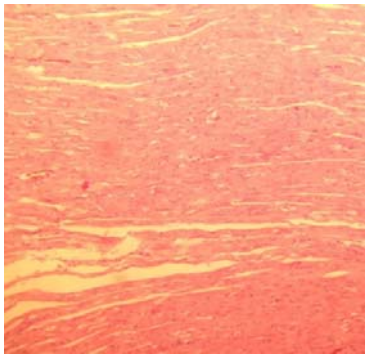
بافت نرمال کبد



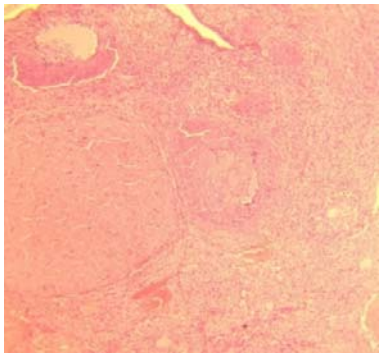
بافت نرمال ریه



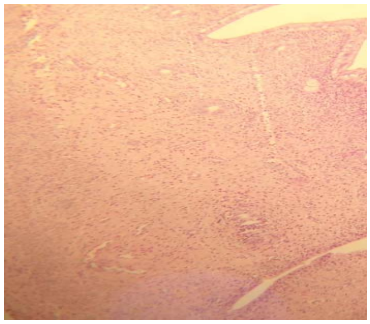
بافت نرمال طحال



بافت نرمال قلب

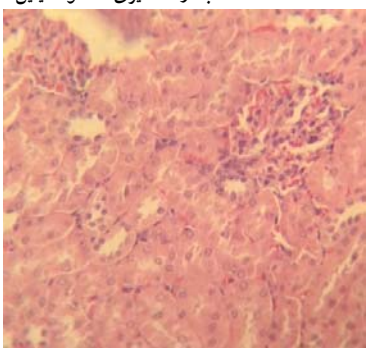


بافت نرمال تخمدان

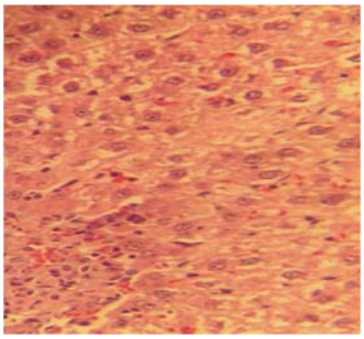


بافت نرمال رحم

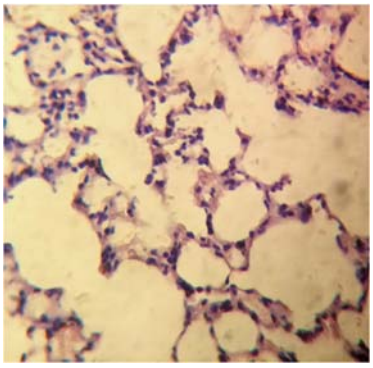
ب: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین از بافت‌های گروه تیمار با عصاره‌ی گل با بزرگنمایی ۴۰:



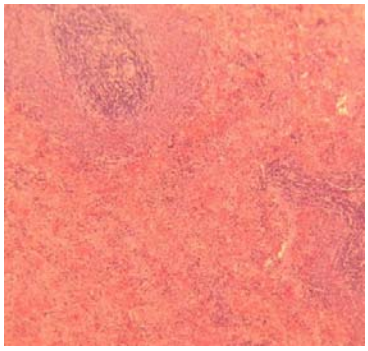
بافت نرمال کلیه



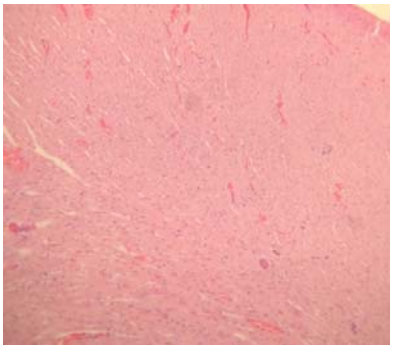
بافت نرمال کبد



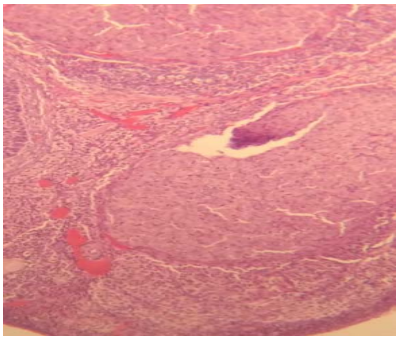
بافت نرمال ریه



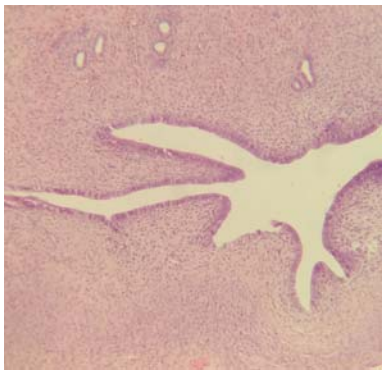
بافت نرمال طحال همراه با پالپ سفید و قرمز طبیعی



بافت نرمال قلب

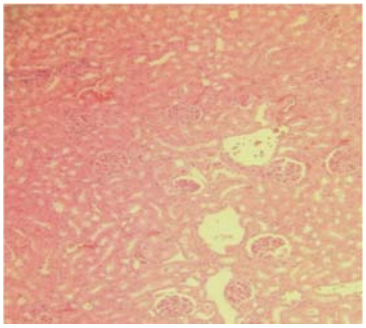


بافت نرمال تخمدان

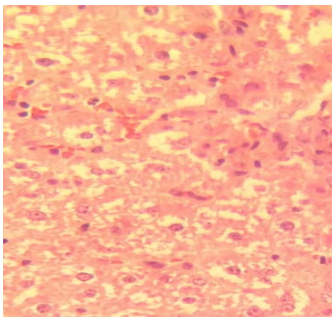


بافت نرمال رحم

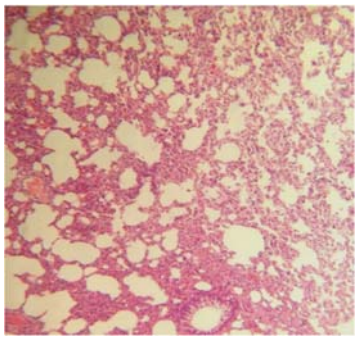
ج: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین از بافت‌های گروه کنترل با بزرگنمایی ۴۰:



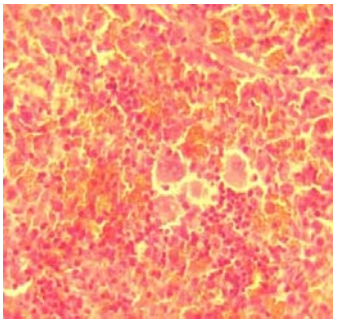
بافت نرمال کلیه



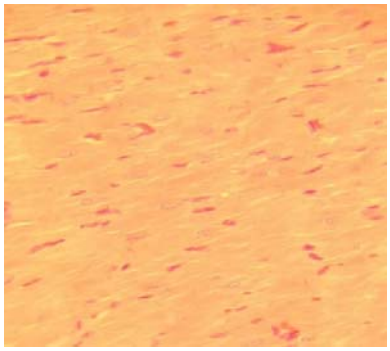
بافت نرمال کبد



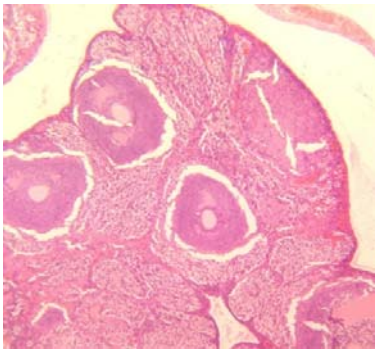
بافت نرمال ریه



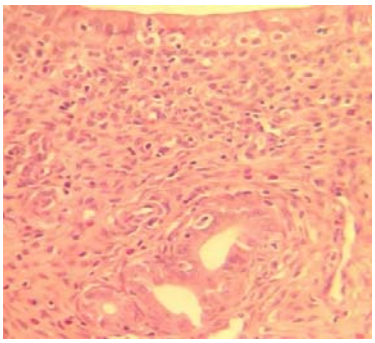
بافت نرمال طحال



بافت نرمال قلب



بافت نرمال تخمدان



بافت نرمال رحم که در آن بیشتر غدد اندومترال در فاز تکثیر هستند

بحث

در این تحقیق برای نخستین بار ۶ نوع پاسخ سمی در ۲ عصاره مختلف از بخش‌های هوایی گیاه بررسی شد که شامل سمیت حاد خوراکی هر دو نوع عصاره و سمیت تحت مزمن هر دو نوع عصاره از دیدگاه عوارض ظاهری، پاراکلینیکی و هسیتوپاتولوژیکی بود که کلیه شواهد و مستندات دلالت بر ایمنی این عصاره‌ها در مصرف خوراکی حاد تا سقف ۲۰۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن و ایمنی مصرف طولانی مدت روزانه تا سقف ۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن داشتند که یافته‌ای جدید و غیرقابل مقایسه با مطالعات مشابه قبلی در سطح ملی و بین‌المللی است. با این وجود نتایج این مطالعه در مقایسه با مطالعه‌ای که توسط قربانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ارزیابی سمیت عصاره‌ی هیدروالکلی ریشهٔ گیاه فرولا گوموزا انجام شد، قابل تحلیل است. در این مطالعه مشابه با تحقیق حاضر، پروفایل سمیت تحت مزمن (۲۸ روزه) تجویز خوراکی عصاره‌ی هیدروالکلی فرولا گوموزا با دوزهای ۱۰۰ و ۶۰۰ در موش صحرایی نر ارزیابی شد که مشابه با این تحقیق هیچ گونه مرگ و میر، تغییرات معنی‌دار وزن بدن، مصرف غذا و آب، وزن ارگان‌ها، هماتولوژی، مشخصات بیوشیمیایی سرم و تغییرات رفتاری و بیماری‌های بافتی دیده نشد [۱۴].

در مطالعه ۲۸ روزه‌ای که گوداه و همکاران در سال ۲۰۱۵ روی ارزیابی سمیت حاد و تحت مزمن فرولا آسافوئتیدا در رت گونه اسپراگ داولی با دوزهای ۲۵۰ mg/Kg در rat اسپراگ داولی انجام دادند هیچ تغییر مشهودی در افزایش یا کاهش وزن و پارامترهای بیوشیمیایی (آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، کراتینین و اوره) و هماتولوژیک نشان داده نشد اما صرفاً در کبد رت‌های تحت آزمایش تغییرات واسکولار خفیفی مانند لکوسیتوز سینوزوئیدال وترومبوز نشان داده شد، ضمن اینکه وریدهای پورت دچار التهاب سلولی شده بودند اما در این مطالعه شواهد مشابهی یافت نشد. کلیه‌ی موش (rat) های تحت آزمایش در محل گره گلومرولی آتروفی نشان داد همچنین لایه‌ی جداری کپسول بومن

ضخیم شد و نکروز توبول مرکزی در دوز روزانه یک چهارم دوز مطالعه حاضر با عوارض سمیت کبدی و کلیوی همراه بود. همچنین اتساع و تراکم عروق خونی کلیوی نیز دیده شد که نشان‌دهنده سمیت سایر عصاره‌های این جنس بوده است. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۵ روی ارزیابی سمیت حاد و تحت مزمن گیاه فرولا آسافوئتیدا در rat اسپراگ داولی انجام شد، بعد از گاواژ عصاره در دوز g/kg ۵ در سمیت حاد و mg/kg ۲۵۰ در سمیت تحت مزمن در طی دوره‌ی ۲۸ روزه هیچ تغییر مشهودی در افزایش یا کاهش وزن، پارامترهای هماتولوژیک، آنزیم‌های AST, ALT, ALP, Cr, Urea مشاهده نشد اما کبد موش‌های تحت آزمایش تغییرات خفیفی مانند لکوسیتوز سینوزوئیدال و ترومبوز نشان دادند، وریدهای پورت دچار التهاب شده و کلیه‌ی موش‌ها در محل گره گلومرولی آتروفی نشان دادند. در کل این نتیجه حاصل شد که فرولا آسافوئتیدا ایمنی گسترده‌ای داشته و سمیت اندکی در کوتاه مدت در دوز mg/kg ۲۵۰ نشان داد [۱۵].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ روی سمیت دستگاه تناسلی و اثرات ناباروری عصاره‌ی اتانولی گیاه فرولا هورمونیس انجام شد، پس از تجویز دوز mg/kg/d ۳ از عصاره طی ۶ هفته کاهش مشهودی در باروری موش‌ها، آمار لقاح و جنین‌های زنده دیده شد. همچنین تغییرات همزمان با آتروفی تخمدان، افزایش بافت پیوندی و زوال تخمک‌ها به دلیل انسداد مجاری فولیکولار بود [۱۵]. اگرچه پتانسیل باوروی به عنوان اهداف این طرح تعیین نشد اما عدم تغییر هیستوپاتولوژیک و تظاهرات نکروپسی در تخمدان و رحم موش‌های سوری ماده می‌تواند دلالت اولیه بر سلامت این عصاره در ارگان‌های جنسی داشته باشد اما این موضوع ضرورت ارزیابی‌های تخصصی این عصاره‌ها را برروی سیستم تناسلی، باروری و اندوکراین منتفی نمی‌نماید.

نتیجه‌گیری

در هیچ‌یک از مطالعات قبلی روی سایر گونه‌های فرولا و یا اندام‌های زمینی فرولا پرسیکا، آزمون سمیت حاد و تحت مزمن همزمان روی ۲ بخش مختلف از یک گیاه انجام نشده است در حالی که در این مطالعه همزمان به بررسی اثرات سمیت حاد و تحت مزمن عصاره‌ی گل و برگ گیاه*Ferula persica* پرداخته شده است. به نظر می‌رسد با توجه به ارزیابی‌های کلینیکی، بیوشیمیایی، هماتولوژیک و تغییرات هیستوپاتولوژیک موش‌های تحت تجویز محدوده ایمن برای این دو عصاره (NO-Observed Adverse Effect Level) حداقل ۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در یک محدوده درمانی ۲۸ روزه به صورت خوراکی است که با توجه به حساسیت بیشتر جنس ماده در ازمون‌های سم‌شناسی این مقدار برای جنس نر عدد بالاتری پیش‌بینی می‌شود. به نظر می‌رسد اثرات نورولوژیک و آرامبخشی این عصاره‌ها می‌تواند به طور همزمان با اهداف درمانی و یا مکمل خوراکی مد نظر تحقیقات بعدی قرار گیرد.

منابع

1. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy. 13th ed. Bailliere Tindall. London. 1989, pp: 205-206.

2. Jadidi M. Evaluation of Ferula persica extract on signs of morphine interruption and sleep period in mice. *SBMU. J.* 2011; 34: 225-230.

3. Iranshahi M, Mojarab M, Sadeghian H, Hanafi-Bojd MY and Schneider B. Polar secondary metabolites of Ferula persica roots. *Phytochem. J.* 2008; 69: 473 - 78.

4. Mozaffarian V. The Family of Umbelliferae in Iran-Keys and Distribution. Research Institute of Forests and Rangelands Press. Tehran. 1983, pp: 114-116.

5. Zhou P, Takaishi Y, Duan H, Chen B, Honda G, Itoh M, Takeda Y, Kodzhimatov OK and Lee KH. Coumarins and biocoumarins from Ferula sumbul: anti-HIV activity and inhibition of cytokin release. *Phytochem. J.* 2000; 53: 689-697.

6. Boulus L. Medicinal Plants of North Africa. Reference Publications Inc. Michigan. 1983, pp: 183.

7. Prakash AO, Pathak S and Mathur R. Postcoital contraceptive action in rats of a hexane extract of the aerial parts of Ferula jaeschkeana. *Ethpharm. J*. 1991; 34: 221-234.

8. Singh MM, Agnihotri A and Garg SN. Antifertility and hormonal properties of certain carotane sesquiterpenes of Ferula jaeschkeana. *Planta Med. J*. 1988; 54: 492-494.

9. Aqel MB, al-Khalil S, Afifi F and al-Eisawi D. Relaxant effects of Ferula sinaica root extract on rabbit and guinea pig smooth muscle. *Ethpharm. J*. 1991; 31: 373-381.

10. Al-Khalil S, Aqel M, Afifi F and Al-Eisawi D. Effects of an aqueous extract of Ferula ovina on rabbit and guinea pig smooth muscle. *Ethpharm. J*. 1990; 30: 35-42

11. Janani M. Purification of secondary metabolites and evaluation of some allelopathic aspects of Ferula persica root. Mohaghegh Ardebili Press. Ardebil. 2011, pp: 5-6.

12. Zargari A. Medicinal plants. 4th ed. Tehran University Publications. Tehran. 1988, pp: 592-602.

13. Afifi FU and Abu-Irmaileh B. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on less commonly used medicinal herbs. *Ethpharm. J*. 2000; 72: 101-10.

14. Ghorbani A, Mohebbati R, Jafarian AH, Vahedi MM, Hosseini SM, Soukhtanloo M, Sadeghnia HR and Hosseini A. Toxicity evaluation of hydroalcoholic extract of Ferula gummosa roots. *Reg. Toxicol. Pharm. J*. 2016; 77: 35-41.

15. Goudah A, Abo-El-Sooud K and Yousef MA. Acute and subchronic toxicity assessment model of Ferula assa-foetida gum in rodents. *Vet. World. J*. 2015; 8: 584-589.

16. Akaberi M, Iranshahi M. Review of the traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of giant fennel (*Ferula communis* l. subsp. communis). *Basic. Medic. Sciences. J.* 2015; 18: 1050-1062.

17. Dastan D, Salehi P, Ghanati F, Gohari AR, Maroofi H and Alnajar N. Phytotoxicity and cytotoxicity of disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from Ferula pseudalliacea. *Ind. Crops and Products. J*. 2014; 55: 43-48.

18. Bagheri SM, Sahebkar A, Gohari AR, Saeidnia S, Malmir M and Iranshahi M. Evaluation of cytotoxicity and anticonvulsant activity of some Iranian medicinal Ferula species. *Pharm. Bio. J*. 2010; 48: 242-246.

19. Homady MH, Khleifat KM, Tarawneh KA and Al-Raheil IA. Reproductive toxicity and infertility effect of Ferula hormonis extracts in mice. *Theri. Gen. J*. 2002; 57: 2247-2256.

20. Fraigui O, Lamnaouer D, Faouzi MYA, Cherrah Y and Tijjane M. Acute and chronic toxicity of fessoukh, the resinous gum of Ferula communis L, compared to Warfarin. *Vet & Human Toxicol. J*. 2001; 43: 327-330.

21. Aragno M, Tagliapietra S, Nano GM, Ugazio G. Experimental studies on the toxicity of *Ferula communis* in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology J*. 1988; 59: 399-402.

22. Noroozi S, Mosaffa F, Soltani F, Iranshahi M, Karimi G, Malekaneh M and Behravan J. Antigenotoxic effects of the disulfide compound persicasulfide A (PSA) on rat lymphocytes exposed to oxidative stress. *Plantamed. J*. 2009; 75: 32 - 6.

23. Bagheri SM, Sahebkar AH, Gohari AR, Saeidnia S, Malmir M and Iranshahi M. Evaluation of cytotoxicity and anticonvulsant activity of some Iranian medicinal Ferula species. *Pharmaceutical Biology J*. 2010; 48: 242 - 246.

24. Oral acute toxicity, OECD guidelines for the testing of chemicals, No: 423, 2008.

25. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals, No: 407, 2008.

Acute and Subchronic Toxicity Assessment of Aerial Parts of *Ferula persica* in Female Mice

Soleimani Far M (M.Sc.)[1], Mojab F (Ph.D.)[2], Arbabi Bidgoli S (Ph.D.)[3]*

1- Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author: Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Tel: +98-21-22006221, Fax: +98-21-2260009
Email: arbabi@iaups.ac.ir

Abstract

Background: ***Ferula species* have shown wide range of pharmacological properties but there is no study on oral safety profile of *Ferula persica* due to standard toxicology guidelines.**

Objective: This study aimed to evaluate the acute and subchronic oral toxicity of the alcoholic extract of the aerial parts of *Ferula persica* to provide its safe dose for long term oral administrations as a possible herbal remedy.

Methods: Hydroalcoholic extract from leaves and flowers was provided and standardized then acute and repeated dose oral toxicity tests were performed by OECD 423 and 407 guidelines. In the subchronic test, animals in each treatment group received hydroalcoholic extracts 1000 mg/kg/day. At the end of study mortality, weight changes, biochemical, hematological and histopathological studies were performed.

Results: Acute toxicity test did not show any mortality and any sign of toxicity up to 2000 mg/kg in a 14 days study and in the repeated dose toxicity test, no sign of organ toxicity was detected in doses up to 1000 mg/kg during 28 days continuous study according to clinical, hematological, biochemical and histopathological evidences in liver, kidney, uterus, ovaries, heart, lung and spleen of animals.

Conclusion: This study has revealed the safety of *Ferula persica* herbal extract in acute and subchronic oral administrations in doses up to 2000 and 1000 mg/kg respectively. We have defined the limit of oral long term exposure (No Observed Adverse Effects Level /NOAEL) in doses up to 1000 mg/kg which could suggest these aerial parts of *Ferula persica* as a new herbal remedy for future medical and nutritional purposes.

Keywords: ***Ferula persica*, Acute toxicity, Aerial extract, Subchronic toxicity**