بررسی سمیت تحت حاد عصاره آبی هسته سنجد (*Elaeagnus angustifolia* L.) در موش صحرایی (رت)

غلامرضا کریمی[1*]، علیرضا خویی[2]، حسین حسین‌زاده[3]، شبنم شجاعی[4]

۱- استادیار فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲- استادیار آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- استاد فارماکودینامی و سم‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
٤- داروساز
آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵- ۱۳٦۵
تلفن: ٦٦-۸٦۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸٦۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)
پست الکترونیک: gho_karimi@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه سمیت تحت حاد عصاره آبی هسته سنجد (*Elaeagnus angustifolia* L.) در موش صحرایی بررسی گردید. ابتدا دوزهای ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم از عصاره انتخاب گردید و به مدت ۱۴ روز از راه داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. در روز پانزدهم پس از نمونه‌گیری آزمایش‌های خون‌شناسی، بیوشیمی و آسیب‌شناسی انجام شد. عصاره باعث کاهش معنی‌دار مقدار هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز شد. دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم باعث نکروز سلول‌های قلب و کبد گردید و مقدار آنزیم‌های AST،ALT، LDH و ALP افزایش یافت. کلیه‌ها دچار آزار خفیف و برگشت‌پذیر شدند لیکن نکروز در آنها دیده نشد. براساس نتایج به‌دست آمده عصاره باعث آسیب به سلول‌های کبد، کلیه و قلب گردیده و آنمی نورموکروم نورموسیت ایجاد می‌نماید.

گل‌واژگان: سنجد، عصاره آبی، سمیت تحت حاد، آنمی

مقدمه

تیره سنجد گیاهانی به صورت درخت یا درختچه را شامل می‌شود که اغلب خاردار بوده و دارای ۳ جنس و بیش از ۲۰ گونه است. درخت سنجد (*Elaeagnus angustifolia* L.) در این خانواده قرار می‌گیرد [۱]. میوه سنجد حاوی پتاسیم، منیزیم، سدیم، آهن، کلسیم، روی و مس می‌باشد. همچنین دارای اسیدهای چرب لینولئیک، پالمتیک، اولئیک و لینولنیک است. کافئیک اسید نیز در آن دیده شده و هسته آن دارای اسید چرب لینولئیک، اسید مالیک، فسفولیپید و بتا سیتوسترول است [۴،۲].

برگ درخت سنجد دارای اثر قابض است. میوه آن مقوی و مفرح بوده و دارای اثر قابض، مدر، مقوی معده، ضدسرفه و بندآورنده اسهال می‌باشد. جوشانده یا دم‌کرده گل سنجد برای بیماری‌هایی مانند فلج، کزاز، تنگی نفس و یرقان مفید است [۱،۵]. در عصاره حاصل از پوست شاخه‌های گونه‌ای از درخت سنجد (E. glabra) اثر ضدباکتریایی مشاهده شده است [۶]. در مطالعات داروشناسی عصاره آبی هسته اثر ضد درد و شل‌کننده عضلات نشان داده است [۶،۳]. هر فرآورده گیاهی قبل از آنکه به صورت یک شکل دارویی مورد استفاده قرار گیرد باید از لحاظ مطالعات سم‌شناسی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. بسیاری از اثرات سمی بر روی ارگان‌های مختلف بدن با یک دوز حاصل نگردیده، بلکه بعد از دوزهای مکرر مشاهده می‌شود. این مطالعه جهت بررسی سمیت تحت حاد عصاره آبی هسته سنجد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوان

رت‌های نر از جنس Wistar، با وزن ۲۵۰- ۲۰۰ گرم که از موسسه رازی تهیه گردیده و در مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشکده داروسازی در شرایط دمایی ۲ ± ۲۲ °C، سیکل روشنایی / تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری می‌شدند.

گیاه

میوه درخت سنجد از باغ‌های اطراف شهر کاشمر جمع‌آوری گردید و توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد، شناسایی و تایید گردید (شماره هرباریوم ۱-۰۵۰۱-۹۷).

عصاره‌گیری

۱۰۰ گرم پودر گیاه را به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در حال جوشیدن افزوده و مخلوط را به مدت ۱۵ دقیقه در حالی که به آرامی می‌جوشید، هم زده شد. آنگاه تا دمای ۴۰ °C سرد و توسط کاغذ صافی و قیف بوخنر صاف گردید. عصاره حاصل را در پلیت‌های کوچک ریخته و روی بن ماری با حرارت ۴۵ °C قرار داده شد تا خشک گردد.

بررسی سمیت تحت حاد

ابتدا دوزهای ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم از عصاره آبی انتخاب و به مدت ۱۴ روز از راه داخل صفاقی به گروه‌های ۶ تایی از حیوانات آزمایشگاهی تزریق گردید. یک گروه نیز نرمال سالین به عنوان شاهد دریافت نمودند. در طول این مدت تغییر وزن و رفتار حرکتی حیوانات بررسی گردید. در روز پانزدهم حیوانات را توسط مخلوطی از گزیلازین (۱۰ mg/kg) و کتامین (۱۰۰ mg/kg) بیهوش نموده و پس از شکافتن شکم، خون‌گیری از قلب انجام گرفت. نمونه پلاسما و سرم جهت آزمایش‌های خون‌شناسی و بیوشیمی استفاده گردید. در مرحله بعد ارگان‌های اصلی شامل قلب، ریه، کبد، طحال و کلیه به دقت جدا و در فرمالین ۱۰ درصد برای آزمایش‌های آسیب‌شناسی نگهداری شد.

جدول شماره ۱- تغییرات وزن حیوانات در طی ۱۴ روز تزریق داخل صفاقی عصاره آبی هسته سنجد

	دوز	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۲۲٦/۰±۱۹/٦	۲۳۳/۰±۲۰/٥	۲۳٦/٥±۱۹/۸
عصاره	۰/۱۲٥ g/kg	۲۳۳/۳±۱۳/٦	۲۲٥/۰±۱٤/۸	۲۱٦/٦±۱٤/۰
عصاره	۰/۲٥ g/kg	۲۲٦/۷±۲۰/٦	۲۱٥/۸±۲۳/٥	۲۰٦/۲±۲۸/٥*
عصاره	۰/٥ g/kg	۲۳٦/۷±۸/۲	۲۱۲/۳±٤/۲	۱۹۲/۷±۷/۹**

$n = ۶$ ، mean±SEM ، * $p < ۰/۰۵$ ، ** $p < ۰/۰۱$

نتایج

تغییرات وزن و رفتار

همان‌طور که در جدول شماره ۱ آمده است، حیواناتی که دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم از عصاره را دریافت کردند، در پایان آزمایش، کاهش وزن معنی‌داری نشان دادند. از لحاظ رفتاری نیز کاهش فعالیت حرکتی و مصرف غذا در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره مشاهده گردید به نحوی که با افزایش دوز، کاهش فعالیت و مصرف غذا محسوس‌تر بود (جدول شماره ۲).

آزمایش‌های خون‌شناسی و بیوشیمی

نتایج آزمایش‌های خون‌شناسی نشان داد که تزریق عصاره باعث کاهش معنی‌دار مقدار هموگلوبین (Hgb)، هماتوکریت (HCT) و تعداد گلبول قرمز (RBC) گردیده ولی بر روی حجم متوسط سلولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین سلولی (MCHC) اثری نگذاشته است. در گروه ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم افزایش تعداد پلاکت (PLT) و گلبول سفید (WBC) دیده شد (جدول شماره ۳). براساس آزمایش‌های بیوشیمی تجویز عصاره تاثیری بر روی میزان بیلی روبین، کراتی نین و نیتروژن اوره خون (BUN) نداشته، لیکن آنزیم‌های AST ALT، LDH و ALP افزایش یافته بودند که این افزایش وابسته به دوز بود (جدول شماره ٤).

آسیب‌شناسی

در بررسی میکروسکوپی نمونه‌های ریه و طحال آسیب قابل ملاحظه‌ای در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره دیده نشد و شباهت زیادی به گروه نرمال سالین داشت. سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی در گروهی که دوز ۰/۱۲۵ g/kg از عصاره دریافت کرده بودند، دارای مقدار کمی پیگمان لیپوفوشین بودند انباشتگی این پیگمان با افزایش غلظت عصاره افزایش چشمگیری داشت. همچنین در دو گروه ۰/۲۵ و ۰/۵گرم بر کیلوگرم تغییرات دژنراتیو در سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی مشاهده گردید. در هیچ‌یک از

جدول شماره ۲- تغییرات مصرف غذا و فعالیت حرکتی حیوانات در طی ۱۴ روز تزریق داخل صفاقی عصاره آبی هسته سنجد

	دوز	کاهش فعالیت حرکتی	کاهش مصرف غذا
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	-	-
عصاره	۰/۱۲٥ g/kg	+	+
عصاره	۰/۲٥ g/kg	++	++
عصاره	۰/٥ g/kg	+++	+++

جدول شماره ۳- نتایج آزمایش‌های خون‌شناسی بعد از تجویز داخل صفاقی عصاره آبی هسته سنجد به مدت ۱۴ روز در رت

		نرمال سالین	۰/۱۲۵ g/kg	۰/۲۵ g/kg	۰/۵ g/kg
هموگلوبین	Hgb (g/dl)	۱۵/۴۲±۰/۶۴	۱۳/۶۰±۰/۹۳ **	۱۲/۸۵±۰/۷۶ ***	۱۱/۳۵ ±۰/۴۸***
هماتوکریت	HCT (%)	۴۴/۰۰±۱/۵۸	۳۹/۵۷±۲/۲۰**	۳۷/۴۸±۱/۶۳***	۳۴/۴۵±۱/۲۱***
حجم متوسط سلولی	MCV (fl)	۵۱/۷۲±۱/۱۹	۵۱/۹۰±۱/۱۸	۵۱/۳۵±۱/۶۰	۵۰/۸۲±۱/۵۶
هموگلوبین متوسط سلولی	MCH (pg)	۱۷/۹۵±۰/۷۱	۱۷/۴۵±۰/۴۹	۱۷/۶۵±۰/۵۹	۱۷/۶۸±۰/۵۹
غلظت‌هموگلوبین‌متوسط‌سلولی	MCHC (g/dl)	۳۵/۰۰±۰/۴۶	۳۳/۹۵±۰/۶۳	۳۴/۰۵ ±۰/۶۵	۳۴/۵۵±۰/۹۳
پلاکت	PLT ($\times10^3$/ml)	۱۰۴۹/۷۰±۷۸/۷۰	۱۰۴۶/۸۰±۶۸/۸۰	۱۱۸۰/۵۰±۴۶/۶*	۱۲۱۱/۸۰±۶/۰۴***
گلبول‌های سفیدخون	WBC ($\times10^3$/ml)	۷/۷۲±۰/۲۴	۸/۲۸±۰/۷۹	۹/۲۲±۰/۵۸**	۹/۲۵±۰/۵۶***
گلبول‌های قرمزخون	RBC ($\times10^6$/ml)	۸/۶۳±۰/۵۷	۷/۷۴±۰/۶۳*	۷/۴۶±۰/۳۸**	۶/۶۱±۰/۵۵***

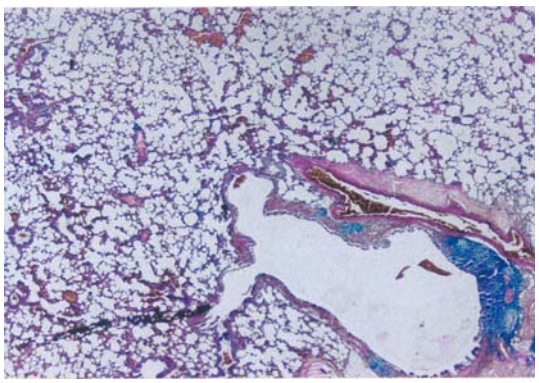
n =۶ ، mean±SEM ، * p< ۰/۰۵ ، ** p< ۰/۰۱، *** p< ۰/۰۰۱

نمونه‌های کلیه، نکروز بافتی، تغییر گلومرولی، عروقی و واکنش‌های التهابی مشاهده نشد. در گروه دریافت‌کننده عصاره با دوز ۰/۱۲۵ g/kg تنها در کبد یک جانور، کانون‌های کوچکی از نکروز انعقادی و میعانی مشاهده شد. در گروه ۰/۲۵ g/kg از عصاره در کبد اکثر جانوران نکروز انعقادی به میزان مختلف مشاهده گردید که اکثر این کانون‌ها توسط انفیلترای لکوسیتی محصور گردیده و بافت نکروزه انعقادی در حال تبدیل به نکروز میعانی بود. در گروه ۰/۵ g/kg از عصاره علاوه بر اینکه کانون‌های وسیع نکروز انعقادی مشاهده گردید، پدیده فیبروز آماسی نیز دیده شد. در نمونه‌های قلب گروه ۰/۱۲۵ g/kg از عصاره نکروز خفیف و پراکنده الیاف عضلانی میوکارد مشاهده گردید. با افزایش دوز کانون‌های نکروز انعقادی فیبرهای عضلانی از لحاظ وسعت و شدت افزایش نشان می‌داد.

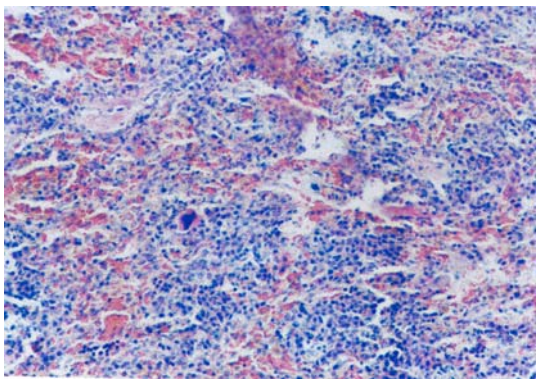
جدول شماره ۴- نتایج آزمایش‌های بیوشیمی سرم بعد از تجویز داخل صفاقی عصاره آبی هسته سنجد به مدت ۱۴ روز در رت

		نرمال سالین	۰/۱۲۵ g/kg	۰/۲۵ g/kg	۰/۵ g/kg
نیتروژن اوره خون	BUN (mg/dl)	۲۰/۳۳±۰/۸۲	۲۰/۰۰±۰/۸۹	۲۰/۱۷±۰/۹۸	۲۰/۱۷±۰/۹۸
کراتینین	Cr (mg/dl)	۰/۵۲±۰/۰۴	۰/۵۳±۰/۰۵	۰/۵۸±۰/۰۷	۰/۵۵±۰/۰۸
بیلی روبین کل	T.bilirubin (mg/dl)	۰/۲۵±۰/۰۶	۰/۲۷±۰/۰۵	۰/۲۸±۰/۰۴	۰/۳۵±۰/۱۸
بیلی روبین مستقیم	D.bilirubin (mg/dl)	۰/۱۰±۰/۰۰	۰/۱۰±۰/۰۰	۰/۱۳±۰/۰۵	۰/۱۸±۰/۱۶
آسپارتات آمینوترانسفراز	AST (u/l)	۱۴۶/۷۰±۳/۷۰	۱۵۴/۲۰±۷/۹۰	۱۶۶/۳±۸/۲۰***	۱۷۳/۸۰±۸/۶۰***
آلانین آمینوترانسفراز	ALT (u/l)	۷۴/۰۰±۱/۴۱	۸۰/۰۰±۶/۲۶	۱۰۷/۸۳±۸/۱۳***	۱۱۱/۶۷±۹/۶۳***
آلکالین فسفاتاز	ALP (u/l)	۱۸۶/۳۳±۶/۳۰	۱۹۳/۳۳±۸/۵۰	۳۰۷/۸۳±۸/۳۰***	۳۳۷/۰۰±۹/۵۳***
لاکتات دهیدروژناز	LDH (u/l)	۵۷۸/۸۰±۴۰/۳۰	۶۷۳/۰۰±۳۶/۳۰	۸۰۹/۷۰±۳۹/۱۰***	۹۷۹/۳۰±۹۸/۰۰***

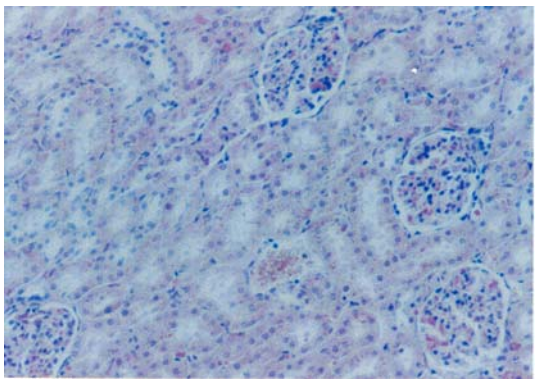
n =۶ ، mean±SEM ، * p< ۰/۰۵ ، ** p< ۰/۰۱، *** p< ۰/۰۰۱



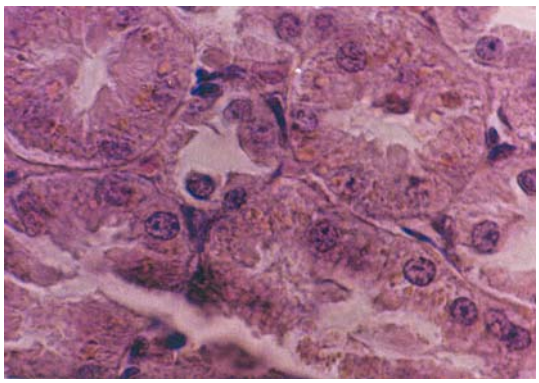
شکل شماره ۱- بافت ریهٔ سالم، بزرگنمایی X-100



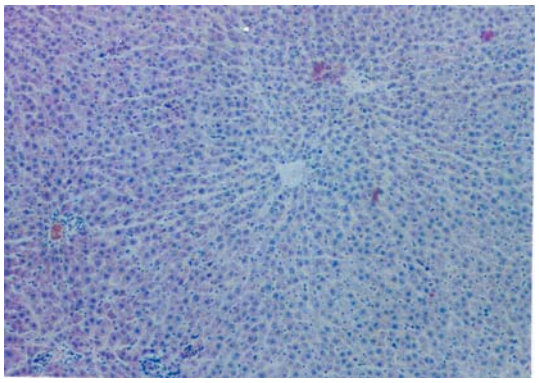
شکل شماره ۲ - بافت طحال سالم، بزرگنمایی X-200



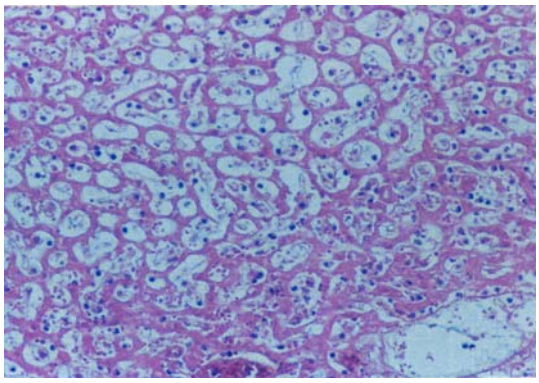
شکل شماره ۳- بافت کلیهٔ سالم، بزرگنمایی X-100



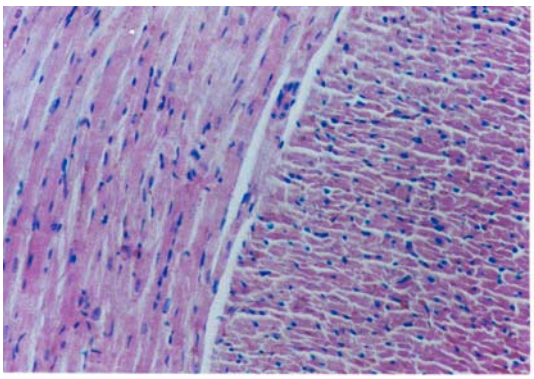
شکل شماره ۴- بافت کلیهٔ آسیب‌دیده، بزرگنمایی X-1000- تجمع لیپوفوشین در سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی همراه با تغییرات دژنراتیو



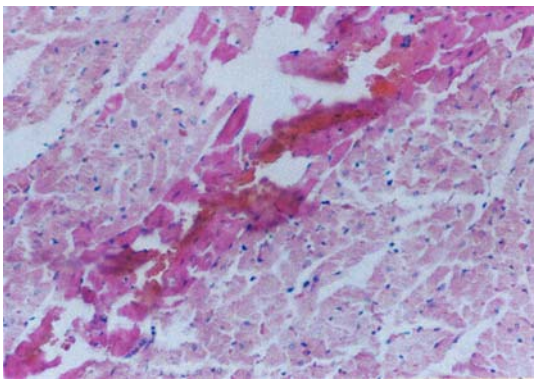
شکل شماره ۵- بافت کبد سالم، بزرگنمایی X-100



شکل شماره ۶- بافت کبد آسیب‌دیده، بزرگنمایی X-200 نکروز مشخص انعقادی بافت کبد با حفظ آرایش سلول‌های کبدی



شکل شماره ۷- بافت قلب سالم، بزرگنمایی X-200



شکل شماره ۸- بافت قلب آسیب‌دیده، بزرگنمایی X-200
یک کانون نواری شکل نکروز انعقادی عضلهٔ قلب

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی هسته سنجد در تجویز ۱۴ روزه باعث ایجاد کم‌خونی و آسیب به سلول‌های بافت کبد، کلیه و قلب می‌شود. حیوانات دریافت‌کننده عصاره در طی مطالعه انجام شده کاهش وزن نشان دادند و این کاهش وزن وابسته به دوز بود، به نحوی که در دوز ۰/۵ g/kg بیشترین کاهش وزن دیده شد. با توجه به اینکه در طول مدت آزمون محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا وجود نداشت و مشاهده گردید که میزان مصرف آب و غذا کاهش یافته است، می‌توان گفت که احتمالاً تزریق عصاره باعث ایجاد حالت بی‌اشتهایی در حیوانات شده است. بی‌اشتهایی بطور شایع در بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد دیده می‌شود [۷]. نتایج آزمون‌های بیوشیمی و آسیب‌شناسی تاییدکننده مطلب فوق است. همچنین گزارش شده است که هسته سنجد دارای اثر شل‌کننده عضلانی است [۳]. بنابراین کاهش فعالیت حرکتی در این حیوانات ممکن است ناشی از شلی عضلانی حاصل از عصاره باشد.

آزمایش‌های خون‌شناسی بیانگر وجود آنمی در حیوانات می‌باشد. از آنجا که فاکتورهایی مانند MCH, MCV و MCHC تغییر معنی‌داری نیافته و فقط تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین کاهش یافته است، آنمی حاصله از نوع نورموکروم نورموسیت می‌باشد [۸، ۷]. در مورد مکانیسم آنمی دو علت همولیز و کاهش تولید RBC توسط مغز استخوان مطرح است. اگر علت همولیز باشد با افزایش MCV و بیلی روبین همراه است که نتایج به‌دست آمده چنین چیزی را تایید نمی‌نماید. بنابراین آنمی ایجاد شده احتمالاً ناشی از اختلال در تولید RBC در مغز استخوان است. افزایش تعداد گلبول‌های سفید نیز می‌تواند به علت وجود التهاب و نکروز شدید در بافت کبد باشد. در نمونه‌های بافتی کبد، تجمع گلبول‌های سفید در اطراف ناحیه نکروز به وضوح دیده می‌شد.

عصاره هسته سنجد در دوزهای بالا سبب آسیب قابل برگشت سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی شد. انباشتگی پیگمان لیپوفوشین که پیگمان پیری و فرسودگی لقب گرفته است، نشانه آسیب و زجر سلولی، اما یافته‌ای قابل برگشت پس از حذف عامل

آسیب‌رسان است [۸]. میزان نیتروژن اوره خون و کراتی نین نیز نسبت به گروه کنترل تغییری نیافته است. البته به علت قدرت عملکردی بالای کلیه‌ها، افزایش این دو عامل معمولا زمانی صورت می‌گیرد که حدود ۵۰ درصد کلیه‌ها آسیب‌دیده و دچار نارسایی شده باشند [۸]. مشاهدات آسیب‌شناسی کلیه‌ها نیز تاییدکننده عدم افزایش معنی‌دار مقدار کراتی نین و نیتروژن اوره خون است.

عصاره هسته سنجد به‌ویژه در دوزهای بالا، سبب آسیب جدی بافت کبدی به‌صورت نکروز انعقادی گردید. آنزیم‌هایALP, AST, ALT وLDH نیز همگی افزایش یافته بودند که تمامی این آنزیم‌ها در سنجش ضایعات سلول‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۹]. AST آنزیمی است که در میتوکندری سلول‌های کبدی قرار دارد و افزایش آن نشانه آسیب شدید سلول‌های کبدی است. ALP نیز در بسیاری از بیماری‌های کبد افزایش کم یا متوسط دارد و لیکن افزایش شدید آن بیشتر در آسیب‌های کلستاتیک دیده می‌شود [۹]. عصاره به‌ویژه در دوزهای بالا سبب آسیب میوکارد به شکل کانون‌های نکروز انعقادی گردید. به نظر می‌رسد افزایش آنزیم‌های AST و LDH تا حدودی وابسته به آسیب سلول‌های قلبی نیز باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی هسته سنجد می‌تواند علاوه بر ایجاد کم خونی به‌طور مستقیم بر سلول‌های پارانشیمی برخی اعضاء حساس نظیر کبد، میوکارد و کلیه اثر گذاشته و در صورت استفاده از دوزهای بالا و زمان طولانی، علاوه بر آسیب‌های قابل برگشت، ممکن است تغییرات غیرقابل برگشت مانند نکروز ایجاد نماید. نکروز انعقادی مشاهده شده در آزمایش‌های آسیب‌شناسی ممکن است به علت اثر مستقیم عصاره و یا هیپوکسی و ایسکمی اندام‌ها باشد.

منابع

۱. زرگری علی. *گیاهان دارویی*. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷٦، جلد چهارم، صفحات ۷۷-۲۷٤.

2. Goncharova N, Glushenkova A. Lipids of oleaster fruits. *Khim. Prir. Soedin.* 1990; 1: 17-21.

3. Hosseinzadeh H, Ramezani M, Namju N. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. *Iranian. J. Basic. Med. Sciences.* 2002; 5: 145-153.

4. Kousova RD, Kazakov A. phonolic compounds in fruits of *Elaeagnus angustifolia*. *Khim. Prir. Soedin.* 1998; 3: 455-6.

۵. میرحیدر حسین. *معارف گیاهی و کاربرد آن در پیشگیری و درمان بیماری‌ها*. دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۱۳۷۲، جلد دوم، صفحات ٤- ۱۳٦.

6. Ramezani M, Hosseinzadeh H, Daneshmand N. Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. *Fitoterapia*. 2001; 72: 255-62.

7. Braunwald E, Fauci A, Kasper D. *Harrison's principles of Internal Medicine.* 15 th ed. McGraw Hill. USA. 2001; pp: 348-52, 457.1711.

8. Robbins SI, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* 6th ed. W B Saunders. UK. 1999; pp: 26, 55, 102-6, 851-52.

9. Bartis CA, Ashwood ER. *Tiets Fundamentals of Clinical Chemistry.* 5th ed. WB Saunders. USA. 2001; pp: 680-395, 700-720, 750-70.