● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ چهاردهم، شمارهٔ ۱، ص ۵۴-۴۴، ۱۳۸۵

مقالهٔ پژوهشی

بررسی سمیت کبدی دوزهای معمول دم‌کرده گل گاوزبان بر موش صحرایی

دکتر میترا مهربانی[*1]، دکتر مهرزاد مهربانی[2]، شاهرخ رفتاری[3]، دکتر فاطمه نبی‌پور[4]،
دکتر محمودرضا حیدری[5]، زهرا مهدوی‌میمند[6] و بهنام صادقی‌راد[7]

خلاصه

مقدمه: سال‌های زیادی است که گل‌برگ‌های بنفش- ارغوانی گیاه گل گاوزبان از خانواده گاوزبان (Boraginaceae) با نام علمی *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey. در طب سنتی ایران به عنوان مقوی، آرام‌بخش، معرق و در درمان سرماخوردگی، گلودرد و سرفه به کار می‌روند. از آنجا که این گیاه دارای آلکالوئیدهای پیرولیزیدین با اثرات سمیت کبدی می‌باشد و دم کرده آن در طب سنتی مصرف می‌شود در تحقیق حاضر سعی شده سمیت کبدی آن مورد بررسی قرار گیرد.

روش: به ترتیب سه دوز ۴۰ mg/kg، ۴۰۰ mg/kg و ۸۰۰ mg/kg از دم کرده خشک شده گل گاوزبان (براساس دوز مصرفی انسان) با استفاده از روش گاواژ به مدت ۲۸ روز به موش صحرایی خورانده شد. به گروه کنترل حلال عصاره یعنی آب تجویز گردید. هر گروه شامل پنج موش ماده و پنج موش نر بود. در روز بیست و نهم، سرم حیوانات از نظر آزمون‌های عملکردی کبد مورد آزمایش قرار گرفت و کبد حیوانات نیز جدا و از نظر هیستوپاتولوژی بررسی شد.

یافته‌ها: از نظر آزمون‌های عملکرد کبدی (ALT،AST، بیلی‌روبین تام و آلکالین فسفاتاز) هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده عصاره و شاهد به دست نیامد. مطالعات هیستوپاتولوژی کبد نیز نشان داد عصاره در دوزهای مورد استفاده، سمیتی ایجاد نکرده است.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از عدم سمیت دم کرده گل گاوزبان در دوزهای مصرفی توسط انسان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گل گاوزبان، سمیت کبدی، موش صحرایی، دم کرده

۱- استادیار فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، محقق مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان ۲- پزشک عمومی ۳- کارشناس، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان ۴- استادیار پاتولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۵- استاد سم‌شناسی فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان ۶- کارشناس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان ۷- دانشجوی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان

* **نویسنده مسؤول:** گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک :** mmehrabani@hotmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۳۰ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۵/۱۰/۲۰ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۵/۱۱/۴

مقدمه

از زمان‌های قدیم استفاده از داروهای گیاهی در درمان بعضی از بیماری‌ها رایج بوده است. سالیانه مقادیر قابل‌توجهی از داروها و مکمل‌های غذایی طبیعی استفاده می‌شود. انتظار می‌رود این میزان در سال‌های آینده رشد چشمگیری نیز پیدا کند که ناشی از اعتقاد مصرف کنندگان به بی‌خطر بودن فرآورده‌های گیاهی است. از آنجا که بدون شک برخی از گیاهان دارویی که تا به حال به صورت سنتی استفاده شده‌اند مسمومیت شدید وگاه کشنده‌ای ایجاد می‌کنند، جای تعجّب نیست که به‌طور مداوم با گزارش‌های موردی از عوارض سمی داروهای گیاهی در مجلات تخصصی پزشکی روبرو شویم و مقالات متعددی وجود دارد که در باره ایمنی و سلامت مصرف گیاهان دارویی اظهار نظر کرده‌اند (۱).

گیاه *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. از خانوادهٔ گاوزبان(Boraginaceae)، بومی فلات ایران و محدود به حاشیه شمالی کشور و قفقاز می‌باشد (۲۷). از گذشته‌های دور، گل‌های خشک و ارغوانی- آبی رنگ این گیاه به صورت دم کرده در طب سنتی به عنوان آرام‌بخش، مدر و معرق استفاده فراوانی داشته است (۲). مقبولیت این داروی گیاهی در بین عامه مردم ایران به گونه‌ای است که تقریباً در هر بیماری به خصوص مشکلات عصبی و سرماخوردگی اولین انتخاب به شمار می‌رود (۱۶). تاکنون در پژوهش‌های دارویی انجام شده، اثرات ضداضطرابی (۲۵،۲۹)، تحریک‌کننده سیستم ایمنی (۹)، ضدافسردگی (۴،۲۸) و ضددردی ناشی از خواص ضدالتهابی (۱۵) آن به اثبات رسیده است.

سایر گیاهان خانواده گاوزبان از قبیل گاوزبان اروپایی *(Borago officinalis)* که در سرماخوردگی استفاده می‌شده‌اند، به دلیل داشتن آلکالوئیدهای پیرولیزیدین - که سمیت کبدی ایجاد می‌کند - محدودیت مصرف یافته‌اند (۲۲).

مطالعات انجام شده برای تعیین مواد موجود در گل‌های گاوزبان ایرانی، وجود مقادیر کم آلکالوئیدهای پیرولیزیدین را در گل‌های این گیاه اثبات کرده است. البته این آلکالوئیدها به دلیل غیرقطبی بودن، به مقادیر بسیار ناچیزی در دم کرده گل‌های گاوزبان وارد می‌شود (۲۱).

در پژوهشی که اثرات سمیت کبدی عصاره متانلی گل‌گاوزبان بررسی شده، افزایش آنزیم‌های کبدی قابل توجه بوده است (۳). چون آلکالوئیدهای پیرولیزیدین به راحتی در متانل حل می‌شوند، این نتیجه دور از ذهن نمی‌باشد (۲۰،۲۱). لازم به ذکر است که در طب سنتی ایران با اینکه گلبرگ‌های گاوزبان، بافت نرم و لطیفی دارد و می‌توان آن را به صورت گیاه خشک مصرف نمود تأکید زیادی به استفاده از دم کرده آن شده است (۶).

با توجه به پژوهش‌های انجام گرفته روی آلکالوئیدهای پیرولیزیدین موجود در گیاه و حلالیت بسیار کم آن‌ها در آب (۲۰،۲۱)، در پژوهش حاضر امکان ایجاد سمیت کبدی عصاره آبی گاوزبان با استفاده از بررسی آنزیمی و هیستوپاتولوژی کبدی در موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت تا سلامت مصرف دم‌کرده این گیاه در دوزهای متداول بررسی گردد. علت انتخاب موش صحرایی شبیه بودن متابولیسم این حیوان به متابولیسم انسان بود (۷).

روش بررسی

۱ـ حیوانات

در این تحقیق از موش‌های صحرایی سفید با نام علمی *Rattus norvegicus* (۳۵) از نژاد NMRI خریداری شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان استفاده شد که همگی بکر، جوان و در محدوده سنی دو ماه و نیم بودند. موش‌های ماده ۱۰±۲۰۰ گرم و موش‌های نر ۱۰±۲۵۰ گرم وزن داشتند. محل نگهداری حیوانات از نظر روشنایی، رطوبت، کفپوش قفس‌ها، آب آشامیدنی و غذا مطابق استانداردهای ذکر شده در منابع بود (۵). غذای فشرده حیوانات از کارخانه پارس دام تهیه گردید. چهار ساعت قبل و یک ساعت پس از گاواژ، حیوان ناشتا نگه داشته می‌شد و هر روز در ساعت دوازده ظهر گاواژ انجام می‌گرفت. برای یکسان‌سازی نتایج و حذف عوامل جانبی، کلیه اقدامات در تمام گروه‌ها هم‌زمان انجام گردید.

حیوانات به چهار گروه ده‌تایی تقسیم شدند که هر گروه شامل پنج موش نر و پنج موش ماده بود که در شروع کار، برای علامت‌گذاری حیوانات در هر گروه از محلول اسیدپیکریک اشباع به عنوان رنگ ثابت استفاده شد. دسته اول به عنوان گروه شاهد، دسته دوم گروه آزمایش mg/kg ۴۰، دسته سوم گروه آزمایش ۴۰۰mg/kg و دسته چهارم گروه آزمایش ۸۰۰mg/kg در نظر گرفته شدند.

۲ ـ مشخصات گیاه

گلبرگ‌های گیاه گاوزبان از مزرعه‌ای واقع در بیست کیلومتری شهر بافت استان کرمان در محدوده زمانی اردیبهشت تا تیر ماه ۱۳۸۴ جمع‌آوری و در سایه خشک شدند. نمونه هرباریومی گیاه پس از تهیه، توسط گیاه‌شناس از لحاظ نام علمی تایید و در هرباریوم دانشکده داروسازی کرمان نگهداری شد.

۳ ـ روش عصاره‌گیری

با توجه به اینکه در تحقیق حاضر در نظر بود که سمیت کبدی دم کرده گل گاوزبان بررسی شود عصاره مورد آزمایش نیز دقیقاً با روش مورد استفاده در طب سنتی تهیه گردید. برای این کار هر ۴ گرم گل گاوزبان نرم شده به روش دستی با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری دم شده، سپس به وسیله قیف بوخنر صاف گردید. عصاره آبی حاصل توسط دستگاه فریز درایر مدلEyela FD-8 ژاپن خشک شد. پودر به دست آمده تا زمان انجام آزمایش در یخچال در مجاورت مواد رطوبت‌گیر نگهداری گردید و در صبح روز انجام گاواژ برای تهیه دوزهای مورد نیاز به کار رفت.

٤- تهیه دوزهای مورد نیاز و نحوه محاسبه

حداکثر حجم گاواژ برای جلوگیری از استرس ناشی از آن در یک موش، روزانه ۱۰ml/kg است (۱۱) که با توجه به وزن متفاوت موش‌های نر و ماده، این میزان در موش‌های ماده ۲ میلی‌لیتر و در موش‌های نر ۲/۵ میلی‌لیتر است. بنابراین برای تهیه دوزها نیز به این نکته توجه گردید. گروه شاهد با آب مقطر و سه گروه آزمایش با عصاره گل گاوزبان گاواژ شدند.

از آنجایی که مصرف روزانه گل گاوزبان در یک انسان با وزن متوسط ۵۰ کیلوگرم، حداکثر ۴ گرم است که تقریباً معادل ۲ گرم عصاره خشک شده گیاه است (۴)، مقدار محاسبه شده بر حسب وزن ازعصاره خشک شده ۴۰mg/kg است. لذا گروه دوم موش‌ها با دوز mg/kg ۴۰ برابر با دوز مصرفی انسان گاواژ شد. با توجه به اینکه متابولیسم کبدی موش صحرایی حدود ۱۰- ۵ برابر انسان است (۷،۱۰)، گروه سوم با دوز ده برابر انسان یعنی mg/kg ۴۰۰ و گروه چهارم با دوز بیست برابر انسان معادل mg/kg ۸۰۰ گاواژ گردیدند.

۵- نحوه تجویز عصاره

در این تحقیق از روش گاواژ برای تجویز عصاره استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با حجم مشخص در سرنگ کشیده و در زمان تجویز تا دمای بدن موش صحرایی گرم شد. گاواژ با استفاده از لوله استیل مخصوص با انتهای گرد انجام گردید.

با توجه به بررسی سمیت مزمن عصاره در این تحقیق، گاواژ روزانه یک بار به مدت ۲۸ روز انجام گردید (۲۴).

٦- زمان خون‌گیری و جداسازی نمونه‌ها

موش‌های آزمایشگاهی بعد از ۲۸ روز یعنی در روز بیست و نهم پس از توزین، بی‌هوش شد و خون‌گیری به روش Cardiac puncture انجام شد (حجم خون به دست آمده ۵-۲ میلی‌لیتر) و بعد از کالبدشکافی، کبد خارج گردید.

۷- بی‌هوشی

در این بررسی، بی‌هوشی با استفاده از محفظه شیشه‌ای درب‌دار محتوی پنبه آغشته به دی‌اتیل‌اتر(Merck) (۳۰) انجام شد که پس از گذشت ۵-۳ دقیقه، حیوان در بی‌هوشی مناسب قرار می‌گرفت.

۸- انجام آزمون‌های عملکرد کبدی

پس از جمع‌آوری خون به مدت نیم ساعت نمونه‌ها در محیط آزمایشگاه قرار داده شد تا منعقد گردند. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ده دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. سرم‌ها جدا گردید و برای انجام آزمون‌های عملکرد کبدی (شامل: ALT، AST، بیلی‌روبین تام سرم، آلکالین فسفاتاز) بلافاصله به آزمایشگاه تشخیص طبی ارسال شد و با توجه به این که برای هر بار آزمایش تنها ۲۰۰ میکرولیتر سرم نیاز است هر نمونه سه بار اندازه‌گیری و میانگین اعداد محاسبه شد.

۹- روش بررسی هیستوپاتولوژی

پس از خارج ساختن کبد از بدن موش صحرایی، این ارگان در محلول فرمالین (۱۳ میلی‌لیتر از فرمالدئید ۳۷٪ با محلول آبی NaCl ۰/۹ درصد به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) ثابت و پس از آب‌گیری با الکل، به وسیله گزیلن باقیمانده الکل خارج شد وتوسط دستگاه آماده‌ساز بافت (تیشو پروسسور مدل Lica)، بلوک پارافینی تهیه گردید. با میکروتوم (Lica) از بلوک‌ها، برش با ضخامت ۵-۴ میکرون تهیه و به روش معمولی با هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکاسی (Olympus) بررسی هیستوپاتولوژی انجام شد. کبد دو موش صحرایی کاملاً سالم بکر نر و ماده نیز برای مقایسه با گروه‌های آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

۱۰- محاسبات آماری

با توجه به مقالات در دسترس که تعداد ۱۰-۵ حیوان در هر گروه، جهت بررسی اثرات سمیت کبدی استفاده می‌شود در این بررسی، ۵ موش ماده و ۵ موش نر برای هر گروه در نظر گرفته شد (۲۴-۲۳ و ۱۹-۱۷).

نتایج به دست آمده از آزمون‌های عملکرد کبدی پس از تجویز آب‌مقطر و عصاره گیاهی به صورت میانگین و خطای استاندارد میانگین (Mean± SEM) در ۱۰ موش صحرایی (۵ موش ماده، ۵ موش نر و مجموع ۱۰ موش) ثبت گردید. محاسبه آماری برای تعیین وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) میان گروه‌های آزمایش و شاهد با استفاده از آزمون آماری One way ANOVA و اعمال Post Hoc Tukey با نرم‌افزار SPSS 11.5 انجام شد. نتیجه با آزمون Linear regression نیز تأیید شد.

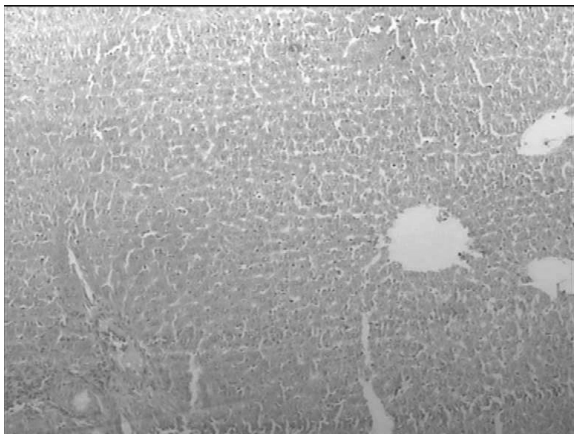
نتایج

۱- نتایج حاصل از آزمون‌های کبدی

تجویز خوراکی دوزهای ۴۰ mg/kg، ۴۰۰ mg/kg و ۸۰۰ mg/kg عصاره آبی گل گاوزبان با استفاده از روش گاواژ به مدت ۲۸ روز در مقایسه با گروه شاهد که تنها آب مقطر دریافت کردند تغییر معنی‌داری در میزان ALT، AST، بیلی‌روبین تام سرم، آلکالین فسفاتاز ایجاد نکرد (جدول ۱). مقایسه بین گروه‌های دریافت‌کننده سه دوز دارو با گروه شاهد به صورت مقایسه گروه ماده با ماده و نر با نر و مقایسه Mean± SEM مجموع ماده و نر در هر گروه دوزی با شاهد به همان نحو، اختلاف معنی‌داری در ALT، AST، بیلی‌روبین تام سرم، آلکالین فسفاتاز نشان نداد ($P>0/05$) که بیانگر عدم ایجاد آسیب کبدی می‌باشد. تنها در مقایسه آماری بین گروه مجموع ماده و نر دوز ۴۰mg/kg با گروه معادل در دوز ۸۰۰mg/kg اختلاف آماری معنی‌داری ($P=0/023$) در میزان آلکالین فسفاتاز به دست آمد که با توجه به تغییرات زیاد آلکالین فسفاتاز در موش صحرایی (۳۵) حائز اهمیت نمی‌باشد. .

۲- نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژی کبد

به منظور بررسی تأثیر عصاره آبی گل‌گاوزبان روی کبد موش‌های صحرایی پس از رنگ‌آمیزی H&E، تغییرات آسیب‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت و با کبد موش‌های صحرایی سالم (شکل۱) مقایسه گردید که نتایج آن بدین شرح است:



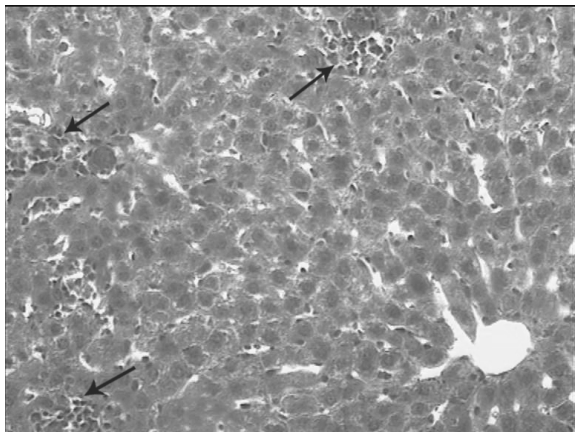
شکل ۱: *نمای هیستولوژی کبد موش صحرایی سالم رنگ شده با H&E و بزرگنمایی ×۱۰*

در گروه اول که به مدت ۲۸ روز با آب مقطر گاواژ شدند ارتشاح سلول‌های التهابی مزمن (لنفوسیت‌ها) خصوصاً در اطراف فضاهای پورت دیده می‌شود که در مواردی حتی به داخل پارانشیم کبدی نیز گسترش یافته است. وجود ارتشاح سلول‌های التهابی در این گروه که به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند می‌تواند به علت استرس ناشی از گاواژ طولانی مدت باشد (۱۱) (شکل۲).

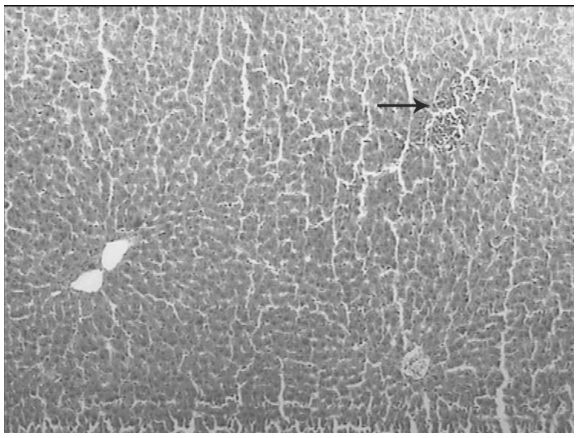
در گروه دوم که روزانه ۴۰mg/kg عصاره دریافت کرده بودند، تغییرات آسیب‌شناسی کبد منحصر به ارتشاح لنفوسیت‌ها در اطراف فضاهای پورت است که میزان آن نسبت به گروه شاهد کمتر است (شکل ۳).

در گروه سوم با دوز دریافتی ۴۰۰mg/kg ارتشاح سلول‌های التهابی مزمن به حداقل رسیده است و به ندرت در اطراف فضاهای پورت مشاهده می‌شود (شکل۴) .

در گروه چهارم نیز که با دوز ۸۰۰ mg/kg گاواژ شدند ارتشاح سلول‌های التهابی دیده نمی‌شود و به بافت طبیعی کبد بسیار نزدیک است (شکل۵).



شکل ۲: *نمای هیستوپاتولوژی کبد موش صحرایی شاهد رنگ شده با H&E و بزرگنمایی ×۴۰ (فلش‌ها به کانون‌های ارتشاح سلول‌های التهابی اشاره دارد)*



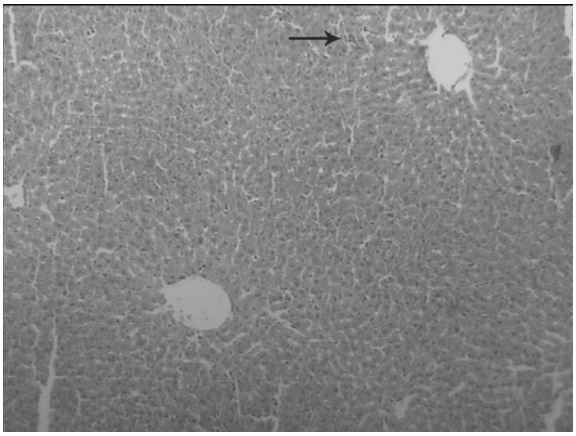
شکل۳: *نمای هیستوپاتولوژی کبد موش صحرایی گروه دریافت کننده دوز ۴۰ mg/kg عصاره آبی گل‌گاوزبان رنگ شده H&E و بزرگنمایی ×۱۰ (فلش به کانون ارتشاح سلول‌های التهابی اشاره دارد)*

جدول ۱: *اثر عصاره آبی (دم کرده) گل گاوزبان بر آزمون های کبدی موش های صحرایی گروه‌های آزمایش بر اساس*

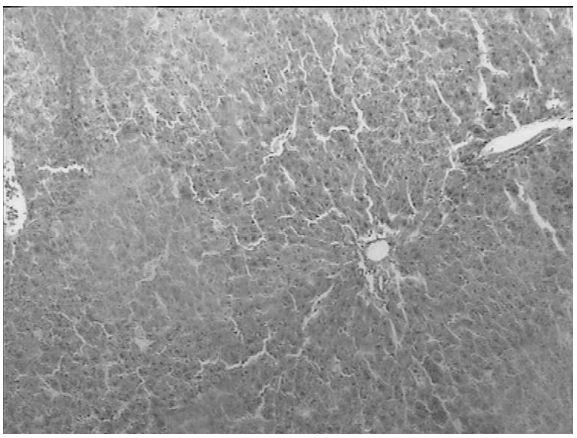
گروه / آزمون‌های کبدی		AST (IU/l)	ALT (IU/l)	T Bil (mg/dl)	ALK-P (IU/l)
شاهد	ماده	۲۴۲±۶۶	۱۳۴±۲۱	۰/۰۸۷±۰/۰۱۲	۳۷۷±۵۸
	نر	۳۸۳±۷۹	۲۳۶±۶۷	۰/۰۹۲±۰/۰۰۸	۵۳۰±۲۸
	ماده و نر	۳۱۲±۵۵	۱۸۵±۳۸	۰/۰۹۰±۰/۰۰۷	۴۵۳±۴۲
۴۰mg/kg	ماده	۲۲۷±۳۹	۱۰۵±۳۴	۰/۱۰۷±۰/۰۱۸	۲۱۰±۱۱
	نر	۲۹۶±۳۵	۱۳۸±۲۰	۰/۰۹۲±۰/۰۰۶	۳۹۰±۸۰
	ماده و نر	۲۶۶±۲۸	۱۲۴±۱۸	۰/۰۹۹±۰/۰۰۸	۳۱۳±۵۶
۴۰۰mg/kg	ماده	۲۰۲±۲۰	۸۷±۱۳	۰/۰۹۳±۰/۰۱۳	۳۹۵±۱۳۵
	نر	۲۵۸±۳۷	۱۲۶±۲۲	۰/۰۸۹±۰/۰۰۶	۵۱۳±۱۳۳
	ماده و نر	۲۲۵±۲۱	۱۰۴±۱۳	۰/۰۸۹±۰/۰۰۸	۴۴۵±۹۱
۸۰۰mg/kg	ماده	۲۵۰±۶۰	۱۰۱±۱۱	۰/۱۱۰±۰/۰۱۵	۴۲۷±۱۲۳
	نر	۲۵۹±۶۴	۱۴۷±۲۷	۰/۱۱۲±۰/۰۱۳	۸۰۴±۷۹
	ماده و نر	۲۵۵±۴۱	۱۲۷±۱۸	۰/۱۱۱±۰/۰۰۹	۶۴۲±۹۹

AST: آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز سرم، ALT: آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز سرم، T Bil: بیلی‌روبین تام سرم، ALK-P: آلکالین فسفاتاز سرم

Mean ± SEM: تمام اعداد بر اساس میانگین ± خطای استاندارد میانگین گزارش شده اند.



شکل ٤: *نمای هیستوپاتولوژی کبد موش صحرایی گروه دریافت‌کننده دوز ٤٠٠ mg/kg عصاره آبی گل‌گاوزبان رنگ شده با H&E و بزرگنمایی ×۱۰ (فلش به کانون ارتشاح سلول‌های التهابی اشاره دارد)*



شکل ٥ : *نمای هیستوپاتولوژی کبد موش صحرایی گروه دریافت‌کننده دوز ۸۰۰ mg/kg عصاره آبی گل‌گاوزبان رنگ شده با H&E و بزرگنمایی ×۱۰*

بحث

گیاهان مختلف خانواده گاوزبان که استفاده‌های دارویی گوناگونی دارند، به سبب داشتن آلکالوئیدهای پیرولیزیدین که برخی دارای سمیت کبدی اثبات‌شده‌ای هستند، بسیار مورد توجه واقع شده‌اند و تحقیقات مختلف نشان داده است به سبب نوع و روش تجویز و محتوای آلکالوئیدی آنها که باعث بروز سمیت کبدی می‌گردد، نمی‌توان به مصرف آنها ادامه داد (۱،۳).

در این میان گیاهان مشهور گل‌گاوزبان اروپایی *(Borago officinalis)* و زنیفون *(Symphytum officinalis)* که پیش از این برگ‌های آنها در سالاد و دم کرده شان در سرماخوردگی استفاده بسیاری داشته است به دلیل سمیت اثبات شده آنها، محدودیت مصرف پیدا کردند (۱،۱۲،۲۰).

وجود چنین مثال‌هایی باعث شده مطالعات زیادی درباره سمیت کبدی گیاهان دارای آلکالوئیدهای پیرولیزیدین انجام گیرد. این آلکالوئیدها در کبد به ترکیبات پیرولی آلکیله‌کننده تبدیل شده، به این ترتیب با اتصال به DNA و RNA و پروتئین‌های سلول‌های کبدی باعث بروز سیروز، آسیت و حتی سرطان کبد می‌گردند (۱۱،۲۰).

Echium amoenum که تنها دم کرده گلبرگ‌های آن در ایران به وفور به عنوان دارویی آرام‌بخش و ضد سرماخوردگی مصرف خوراکی دارد مانند گونه‌های دیگر این جنس از جمله *E. plantagineum* و *E. vulgare* از نظر ایجاد سمت کبدی مؤثر بحث است (۱۲،۲۳،۲۴)، ولی با توجه به تحقیقات انجام گرفته در زمینه مواد مؤثر آن و این واقعیت که تنها دم کرده گل‌های این گیاه مورد مصرف می‌باشد و عصاره آبی حاصل دم‌کرده، توانایی استخراج مناسب و کامل آلکالوئیدهای هر چند کم، ولی سمی آن را ندارد (۲۰،۲۱)، به نظر می‌رسد که دم کرده گل گاوزبان با حداکثر میزان مصرف معمول آن یعنی دم‌کرده حاصل چهار گرم در روز، ایجاد سمیت کبدی نکند (۶،۲۱). همچنین وجود ترکیباتی همچون اسیدرزمارینیک در آن که به عنوان آنتی‌اکسیدان و ضدسمیت کبدی شناخته شده، سبب می‌گردد این شک به یقین نزدیک شود (۱۳،۲۱).

بررسی سمیت در حیوانات آزمایشگاهی همچون موش صحرایی که از لحاظ متابولیسم روده‌ای و کبدی شبیه به انسان است معمول‌ترین روش می‌باشد (۷،۱۰،۱۴). ایجاد آسیب‌های کبدی را می‌توان با بررسی آزمون‌های عملکرد کبدی از جمله آزمایش‌های سرولوژیک ALT، AST، بیلی‌روبین و آلکالین فسفاتاز دنبال نمود و در عین حال مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت کبد نیز کمک شایانی در این زمینه می‌کند (۷،۱۰،۱۴،۱۷،۱۸). با توجه به این که مصرف آلکالوئیدهای پیرولیزیدین سمیت مزمن ایجاد می‌کند، بهترین روش مطالعه خوراندن عصاره گیاهی در یک زمان مشخص به حیوانات آزمایشگاهی است (۷،۱۰،۱۴) که این کار معمولاً با استفاده از یک رژیم غذایی خوراکی دارای عصاره گیاهی در موش صحرایی انجام می‌گیرد (۷،۱۰،۱۴،۱۷،۱۸) و این مسئله به خصوص در مواردی که متابولیسم روده‌ای مطرح است (مانند آلکالوئیدهای پیرولیزیدین) بر روش جدید کشت سلول‌های کبدی ارجحیت دارد (۱۹،۲۶).

در مطالعه حاضر پس از تجویز سه دوز از عصاره آبی حاصل از دم‌کرده گل‌گاوزبان که برای جلوگیری از تخریب مواد آن و تعیین دوز دقیق، به روش فریز درای خشک شده بود، آزمایشات انجام گرفت.

سه دوز عصاره آبی مشتمل بر: دوز معادل انسان بر اساس وزن (۴۰mg/kg)، دوز ده برابر آن - با توجه به این نکته که متابولیسم کبدی موش صحرایی ۱۰-۵ برابر انسان است (۴،۱۰) - (۴۰۰mg/kg) و دوز بیست برابر (۸۰۰mg/kg) بود که از طریق گاواژ دوز دقیق یک نوبت در روز به مدت ۲۸ روز برای بررسی سمیت مزمن کبدی (۴،۲۴) به پنج موش صحرایی ماده و پنج موش نر در هر گروه تجویز گردید (۲۴). به عنوان شاهد یک گروه ماده و نر جداگانه، تنها آب مقطر دریافت کردند.

پس از ۲۸ روز، سرم موش‌ها برای بررسی آزمون‌های عملکرد کبدی (شامل ALT، AST، بیلی‌روبین تام و آلکالین‌فسفاتاز) و کبد آن‌ها جهت مطالعات هیستوپاتولوژی جداسازی شد. نتایج آزمون‌های عملکرد

کبدی پس از انجام محاسبات آماری، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های شاهد و مورد آزمایش (اعم از اختلاف بین گروه‌های ماده و گروه‌های نر به صورت جداگانه و مقایسه مجموع ماده‌ها و نرها به صورت یک گروه در هر دوز) نشان نداد به این مفهوم که در تمام مقایسه‌ها P value به نحو قابل‌توجهی بالاتر از ۰/۰۵ بود. با توجه به نتایج به دست آمده برای آزمون ALT، عدم بروز آسیب کبدی، AST عدم بروز آسیب در کبد، عضله قلب، عضله اسکلتی، کلیه‌ها، مغز، پانکراس، ریه‌ها، لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها، و در مورد بیلی‌روبین تام عدم ایجاد بیماری کبدی یا صفراوی و آلکالین فسفاتاز (با توجه به این که در انسان افزایش کمتر از سه برابر آن تقریباً در هر نوع بیماری کبدی و بیشتر از چهار برابر مقدار طبیعی آن عمدتاً در اختلال کلستاتیک کبدی، بیماری‌های ارتشاحی کبد مثل سرطان و برخی بیماری‌های استخوانی دیده می‌شود) و اینکه هیچ‌یک از فاکتورهای مذکور در این تحقیق افزایش معنی‌داری نداشتند، عدم بروز مشکلات مذکور ثابت می‌شود (۸). اختلاف معنی‌دار و البته نسبتاً در حد مرزی دو گروه ۸۰۰ و ۴۰ در مورد آلکالین فسفاتاز در مطالعه حاضر حائز اهمیت زیادی نیست چرا که میزان آلکالین‌فسفاتاز در موش صحرایی محدودهٔ گسترده‌ای دارد و با توجه به جدول ۱ در مورد SEM (Standard Error of Mean) کاملاً مشخص است که این اختلاف معنی‌دار ارزشمند نیست.

نتایج بررسی هیستوپاتولوژی کبد و مقایسه سه گروه دریافت‌کننده دوز با شاهد، (از نظر هیستوپاتولوژی کبد، ماده و نر تفاوتی ندارند بنابراین در یک گروه در نظر گرفته شدند) تنها بروز التهاب خفیف به صورت ارتشاح لنفوسیت‌ها (کانون‌های دارای سلول‌های با هسته پررنگ که به رنگ بنفش در زمینه ارغوانی سلول‌های کبد دیده می‌شوند) را در ماده‌ها و نرهای شاهد نشان داد که می‌تواند به دلیل ایجاد استرس ناشی از ۲۸ روز گاواژ آب‌مقطر در این گروه باشد (۱۱). التهاب مذکور با بالا رفتن دوز تجویزی گل‌گاوزبان بسیار کم شده بود به نحوی که در گروه دریافت‌کننده دوز ۸۰۰mg/kg، بافت کبد همانند بافت کبد موش‌هایی که هیچ آزمایشی روی آن‌ها صورت نگرفته است سالم بود. این مسئله را می‌توان به وجود اسیدرزمارینیک به عنوان یک ضدالتهاب و ضدسمیت کبدی که در دم‌کرده گل‌گاوزبان استخراج می‌شود ربط داد. این مطلب را نیز باید در نظر داشت که گلبرگ‌های گاوزبان اثرات ضداضطراب و ضدافسردگی قابل‌توجهی از خود نشان داده‌اند (۹،۲۵،۲۸،۲۹) و این می‌تواند در مدت ۲۸ روز آزمایش، استرس ناشی از گاواژ را در موش‌هایی که دوزهای بالاتری دریافت می‌کردند کاهش دهد و از التهاب موضعی در کبد جلوگیری کند. با بررسی تحقیق حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که حتی اگر مقادیر بسیار جزئی از آلکالوئیدهای پیرولیزیدین شناسایی شده در گلبرگ‌های گاوزبان که در آب به طور معمول نامحلول می‌باشند (۲۱) وارد دم‌کرده گل‌گاوزبان شود با مصرف طولانی‌مدت این دم‌کرده در دوزهای معمول و حتی دو برابر، تغییری در آزمون‌های عملکردی و هیستولوژی کبد رخ نمی‌دهد یا به عبارتی سمیت کبدی بروز نمی‌کند. سالم‌تر بودن بافت کبد در دوزهای بالاتر حتی می‌تواند این فرض را تقویت کند که دم کرده گل‌گاوزبان با دوز به کار رفته اثر ترمیم‌کنندگی سلول‌های کبد را نیز داراست. در تحقیقی که قبلاً روی عصاره متانولی گل گاوزبان انجام گرفته بود در دوز ۲۰۰mg/kg (معادل یک چهارم حداکثر دوز عصاره آبی به کار رفته در تحقیق حاضر)، افزایش آنزیم‌های کبدی به عنوان نشانگر آسیب کبدی گزارش شده است (۳). با مقایسه تحقیق حاضر و مطالعه ذکر شده می‌توان گفت دلیل بروز سمیت عصاره متانلی به کار رفته، استخراج کامل آلکالوئیدهای پیرولیزیدین به وسیله متانل است که باعث سمیت کبدی می‌شوند و این مسئله نیز با تحقیق حاضر اثبات گردیده است. در عین حال آنچه در تحقیق حاضر اهمیت قابل‌توجهی دارد این است که مصرف داروهای مورد استفاده در طب سنتی باید دقیقاً بر اساس دستورالعمل ذکر شده در مورد آن داروی خاص در طب سنتی باشد تا علاوه بر اینکه اثرات مطلوب درمانی داشته باشد باعث بروز سمیت نیز نگردد.

پیشنهادات: با توجه به این که دوز ۸۰۰mg/kg از عصاره آبی گل گاوزبان در حداکثر حجم ممکن برای گاواژ، بسیار ویسکوز می‌شد لذا پیشنهاد می‌گردد برای تعیین دوز سمی عصاره آبی گل گاوزبان از روش اختلاط عصاره با غذا با طراحی مناسب وسایل آزمایش، جهت تجویز دقیق دارو به حیوان آزمایشگاهی استفاده شود. بررسی اثرات محافظت‌کننده این عصاره روی سلول‌های کبدی نیز با توجه به نتایج به دست آمده می‌تواند موضوع تحقیقات بعدی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که بخشی از هزینه‌های این تحقیق را تقبل نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

Summary

Evaluation of Hepatotoxicity of Common Doses of Decoction of *Echium Amoenum* Fisch and C.A. Mey in Rats

Mehrabani M., PhD.[1], Mehrabani M., MD.[2], Raftari Sh., BSc[3], Nabipour F., PhD.[4], Heidary M.R., PhD[5], Mahdavi Z., BSc[6], Sadeghi Rad B., Pharm D.[7]

1. Assistant Professor of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Kerman Neurosciences Research Center, Kerman University of Medical Science and health Services, Kerman, Iran 2. Physician 3. Researcher, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 4. Assistant Professor of Pathology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 5. Professor of Toxicology, School of Pharmacy, Kerman Neuroscience Research Center and Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 6. Researcher, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 7. Pharmacist

Introduction: Dried violet–blue petals of *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey. (Boraginaceae) have long been used as a tonic, tranquillizer, diaphoretic and as a remedy for coughing, sore throat and common cold. These dried violet–blue petals are known in traditional medicine of Iran as Gol-e- Gavzaban. Because the decoction of its dry petals has hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids, in the present study the hepatotoxicity of it has been evaluated.

Methods: Three doses of 40 mg/kg, 400mg/kg and 800mg/kg of the dried extract of decoct of *E. amoenum* (according to the consumed doses by human) were administrated by oral gavages for 28 days in rats. Water as solvent was given to the control group. Each group contained five female and five male rats. In the 29th day serums were collected for liver function tests (AST, ALT, total bilirubin and alkaline phosphates) and livers were isolated for histopathologic study.

Results: There were no significant difference between experimental and control groups in all tests ($P>0.05$) and histopathologic studies of livers showed no evidence of hepatotoxicity.

Conclusion: The results suggest that decoction of *E. amoenum* has no hepatotoxicity.

Key words: *Echium amoenum*, Hepatotoxicity, Rat, Decoction.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(1): 44-54

منابع

۱. اسمت، پیر؛ کلر، کارل؛ هانسل، راجر و چندلر، ریچارد: عوارض جانبی داروهای گیاهی. جلد اول. ترجمه: تفقدی، محسن و امیری، رضا. مشهد، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۷٦، ص ۲۱-۱۱ و ۳۰٦-۲٦۳.

۲. امین، غلامرضا: متداول‌ترین گیاهان دارویی سنتی ایران. تهران، انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت و درمان، ۱۳۸٤، ص ۲۳٦.

۳. زاهدی، محمدجواد؛ حیدری، محمودرضا و مهاجری، مهدی: تأثیر دو فرآورده گیاهی سنبل‌الطیب و گل گاوزبان بر آزمون‌های کبدی عملکرد کبد و کلیه در موش صحرایی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۸۲، دوره یازدهم، شماره ۱، ص ۷-۲۲.

۴. سیاح برگرد، مهدی؛ اسعدی، سید محمد؛ امینی، همایون؛ سیاح، محمد؛ آخوندزاده، شاهین و کمالی‌نژاد، محمد: اثربخشی عصاره آبی گاوزبان *(Echium amoenum)* در درمان اختلال افسردگی عمده خفیف تا متوسط: کارآزمایی دوسویه بی‌خبر در مقایسه با دارونما. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۳۸۳، جلد ۱۰، ص ۸-٦۱.

۵. کریمیان، سیدمرتضی: دانستنی‌های ضروری در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی. تهران: نشر یاد، ۱۳۷۷، ص ۸، ۱٦، ۲۸، ۲۹، ٥٤، ٦۱، ٦۳، ٦٤، ۷٤-٦۱، ۸۰-۷٥ و ۹۹-۸۲.

٦. کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران: فارماکوپه گیاهی ایران. جلد دوم. تهران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت غذا و دارو، ۱۳۸۱، ص ۷۲-٦٦۷.

۷. لومیس، تد. اصول زهرشناسی. ترجمه: میرستاری، قوام .تهران، مرکز نشر دانشگاهی، ۱۳٦۹، ص ٤۰-۲۲۳.

۸ هاریسون: اصول طب داخلی هاریسون ۲۰۰۱. ترجمه: غازیانی، میترا و همکاران. تهران، نشر طبیب، ۱۳۸۱.

9. Amirghofran Z, Azadbakht M, Keshavarzi F. *Echium amoenum* stimulate of lymphocyte proliferation and inhibit of humoral antibody synthesis. *Iranian Journal of Medical Sciences* 2000; 25: 119-24.
10. Ballantyne B, Marrs T, Syversen T. General and applied toxicology. Vol: 1, 2, 3, New York, Groves Dictionary INC, 1999; pp56, 230, 231, 553, 1760- 1762.
11. Brown AP, Dinger N and Levine BS. Stress produced by gavage administration in rat. Contemp Top Lab Anim Sci 2000; 39(1): 17- 21.
12. Chevallier A. Encyclopedia of medicinal plants. London, Dorling Kindersley, 1996; p201.
13. Dictionary of natural products. Vol. 1-9. London, Chapman & Hall,1994.
14. Hayes AW. Principles and methods of toxicology. New York, Reven Press, 1994; pp420-21.
15. Heidari MR, Azad EM, Mehrabani M. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: Possible mechanism involved. *J Ethnopharmacol* 2006; 103(3): 345–9.
16. Hooper D. Useful plants and drugs of Iran and Iraq. Chicago, Field Museum of Natural History, 1937; p115.
17. Katoch R, Sharma OP, Dawra PK, Kurade NP. Hepatotoxicity of *Eupatorium adenophorum* to rats. *Toxicon* 2000; 38(2): 309-14.
18. Kaushal V, Dawra RK, Sharma OP, Kurade NP. *et al.* Hepatotoxicity in rat induced by partially purfied toxins from *Eupaturium adenophorum* *Toxicon* 2001; 39(5): 615-9.
19. Lake BG, Evans JG, Chapuis F, Walters DG, Price RJ. Studies on the disposition metabolism and hepatotoxicity of coumarin in the rat and Syrian hamster. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(6): 809-23.
20. Mattocks AR. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Florida, Academic Press, 1986.
21. Mehrabani M, Ghannadi A, Sajjadi E, Ghassemi N, Shams-Ardakani MR. Toxic pyrrolizidine alkaloids of *Echium amoenum* Fisch. & Mey. *DARU* 2006; 14 (3): 122-7.
22. Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines. London, The Pharmaceutical Press, 1996: pp 49, 87.
23. Peterson JE: The toxicity of Echium plantagineum. In: Peterson JE (Editor). Plant toxicology. Proc Aust, USA poisonus plants symp 1984(Pub 1985): pp192-9.

24. Peterson JE, Jago MV. Toxicity of *Echium plantagineum* (paterson's curse). 2. pyrrolizidine alkaloid poisoning in rats. *Aust J Agric Res* 1984; 35: 305-15.
25. Rabbani M, Sajjadi SE, Vaseghi G, Jafarian A. Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Fitoterapia* 2004; 75(5): 457–64.
26. Rakba N. Irniine a pyrrolidine alkaloid isolated from *Arisarum vulgare* can induce apoptisis and/or necrosis in rat hepatocyte culture. *Toxicon* 2000; 38(10): 1389-40z.
27. Riedl HH. Boraginaceae. In: Rechinger KH (Editor), Flora Iranica. Graz, Akademische Druck_u. Verlagsanstalt, 1967; 48, p215.
28. Sayyah M, Sayyah M, Kamalinnejad M. A preliminary randomized double blind clinical trial on the efficacy of aqueous extract of Echium amoenum in the treatment of mild to moderate major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30(1): 166–9.
29. Shafaghi B, Naderi N, Tahmasb L, Kamalinjad M. Anxiolytic effect of *Echium amoenum* in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2002; 1: 37-41.
30. Sharp PE, LaRegina MC. The laboratory rat. London, CRC Press, 1998.