فصلنامه دانش و تندرستی، دوره ۵، شماره ۲ و ۳، تابستان و پاییز ۱۳۸۹
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

ارزیابی میزان سمیت سه گیاه تاج خروس، بندواش و بابا آدم با استفاده از آزمون آرتمیا سالینا

پریسا صدیق‌آرا[۱] (Ph.D.)، طاهره علی اصفهانی[۲] (B.Sc.)، مهدیه جعفری[۳] (Ph.D.)، آتوسا ضیایی[۴] (Ph.D.)، طاهره فرخنده[*۱] (Ph.D.)

۱- دانشگاه تهران- دانشکده دامپزشکی- دکتری تخصصی سم‌شناسی. ۲- دانشگاه تهران- دانشکده دامپزشکی- گروه سم‌شناسی- کارشناس. ۳- دانشگاه پوترای مالزی- دکتری تخصصی شیلات. ۴- وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، معاونت غذا و دارو، دکترای دارو سازی.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۲۹، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۸۹/۲/۲۹

چکیده

مقدمه: *تاج خروس یا آشکنی به‌صورت علف هرز در مراتع ایران می‌روید. این گیاه توسط افراد بومی منطقه در غذاهای سنتی استفاده می‌گردد. بندواش یا سگ‌واش با سرعت رشد و انتشار بسیار بالا، آفتی خطرناک برای یونجه‌زارها به شمار می‌آید و موجب سندرم ترومورژنیک در گاو و گوسفند می‌شود. «بابا آدم» که در بسیاری از مناطق ایران می‌روید به‌عنوان گیاه دارویی استفاده می‌گردد. در این مطالعه میزان سمیت سه گیاه تاج خروس، بندواش و بابا آدم با استفاده از آزمون آرتمیا سالینا مورد بررسی قرار گرفت.*

مواد و روش‌ها: *این گیاهان از منطقه قائمشهر جمع‌آوری و پس از خشک نمودن، عصاره این گیاهان تهیه شد، سپس سیست‌های آرتمیا سالینا در آب دریای مصنوعی و در ۲۶ درجه سانتی‌گراد تفریخ گردید و عصاره گیاهان در غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰ppm و ۱۰۰ ppm و ۱۰ ppm) با لاروهای آرتمیا مواجه شدند. میزان غلظتی که نیاز است تا نیمی از لاروها را از بین ببرد (LC50) با استفاده از معادله رگرسیون محاسبه گردید.*

نتایج: *میزان LC50 سه گیاه تاج خروس، بندواش و بابا آدم به‌ترتیب ۱۶۴۰ ppm، ۹۹۰ ppm و ۸۴۰ ppm بود.*

نتیجه‌گیری: *براساس نتایج حاصله گیاه بابا آدم نسبت به دو گونه دیگر دارای اولویت بیش‌تری جهت مطالعه تکمیلی و شناسایی ترکیبات سمی می‌باشد.*

واژه‌های کلیدی: آرتمیا سالینا، تست سمیت، گیاهان.

Original Article **Knowledge & Health 2010;5(2,3):1-4**

Assessment of Cytotoxic Activity of Three Plants of Pigweed, Bermuda grass and Burdock via Artemia Salina Test

Parisa Sadighara[1], Tahere Ali Esfahani[2], Mahdieh Jafari[3], Atousa Ziaei[4], Tahere Farkhondeh[5*]

1- Ph.D.of Toxicology, Tehran University, Tehran, Iran. 2- B.Sc. of Toxicology, Tehran University, Tehran, Iran. 3- Ph.D. of Fishery, Putra University, Malaysia. 4- Pharmacology Doctor. Food & Drug Vice-presidency, Tehran, Iran.

Abstract:

Introduction: *Pigweed is a weed which grows in the pastures of Iran. Local people use the plant leaves to cook traditional food. Bermuda grass with its rapid growth and distribution is regarded a real threat to prairies and it can lead to tremors syndrome in cattle and sheep. Burdock which also grows in many parts of Iran is used as a medicinal herb. In this study, the cytotoxicity potential of the three plants was assessed via Artemia Salina test.*

Methods: *Pigweed, Bermuda grass and burdock were collected from Ghaemshahr in the North of Iran. The leaves were dried and the essence of the three plants was extracted. The larvaes were hatched from cysts of Artemia salina at 26˚C in filtered seawater. The plant extracts with different concentration (10,100 and 1000ppm) were added to the solution larvaes.*

Results: *The LC50 values (the concentration which needed to die half the larvaes) were measured for pigweed, Bermuda grass and burdock at 1640, 990, and 840 ppm, respectively.*

Conclusion: *The results indicate that compared to the two other species, there is more priority for burdock to be studied in further studies for identification and assessment of toxicity.*

Keywords: Artemia salina; Toxicity test; Plants.

Received: 19 January 2010 Accepted: 19 May 2010

***Corresponding author:** T.Farkhondeh, **Email:** Farkhondeh2324@gmail.com*

[*] **نویسنده مسوول:** دانشگاه تهران- دانشکده دامپزشکی- دپارتمان سم‌شناسی، تلفن: ۶۱۱۱۷۰۲۷-۰۲۱، **Email**:farkhondeh2324@gmail.com

مقدمه

گیاهان، دارای ترکیبات مختلف آلکالوئیدها، ساپونین‌ها و سایر ترکیبات شیمیایی می‌باشند (۱). آن‌ها توانایی منحصر به فرد در تولید متابولیت-های متفاوت دارند. برخی از این متابولیت‌ها دارای خواص درمانی و بسیاری نیز سمی می‌باشند (۲).

هزاران سال است که مردم به گیاهان به‌عنوان ترکیبات طبیعی اعتماد دارند. بر طبق گزارشات رسمی سازمان بهداشت جهانی، ۸۰- ۷۰ درصد مردم دنیا و یا به عبارتی چهار بیلیون نفر، از گیاهان در طب سنتی و درمان اولیه بیماری‌ها استفاده می‌نمایند. در اکثر جوامع، گیاهان بومی نقش مهمی در درمان عفونت‌های عمومی دارند. علاوه بر استفاده درمانی، گیاهان دارای ترکیبات با ارزشی می‌باشند که در مواد آرایشی، رنگ‌ها و نیز به‌عنوان نوشیدنی و ادویه‌ها استفاده می‌گردند (۳).

متأسفانه با وجود استفاده گسترده گیاهان در درمان بیماری‌ها و در صنایع مختلف، سمیت بسیاری از آن‌ها بررسی نگردیده است. لذا می-بایست مراقب بود که گیاهان سمی به زنجیره استفاده وارد نگردند. گیاهان سمی یکی از مشکلات بهداشتی در سراسر دنیا می‌باشند. ۵ تا ۱۰ درصد از موارد مسمومیت‌ها مربوط به گیاهان است. سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۷۹ میلادی بر این تأکید نمود که کلیه گیاهان مورد استفاده در درمان می‌بایست غیر سمی باشند (۴).

ایران از تنوع بالایی در گونه‌های گیاهی برخوردار است که متأسفانه ارزیابی جامع در این خصوص صورت نگرفته است. شناسایی گیاهان سمی اولین قدم در پیش‌گیری از مسمومیت‌های ناشی از مصرف این گیاهان است.

امروزه روش‌های متعدد سنجش زیستی قابل اطمینان و معتبر در اکثر آزمایشگاه‌های سم‌شناسی تدوین شده است. یکی از آزمون‌های تعیین سمیت، آزمون «آرتمیا سالینا» می‌باشد. آرتمیا صدها میلیون سال است که بر روی کره زمین زیست می‌کند و در حال حاضر در ۵۰۰ دریاچه شور مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان یافت می‌شود. در شرایط طبیعی این موجودات تولید سیست می‌کنند. سیست‌های آن‌ها دارای یک پوسته و پوشش غشایی در اطراف جنین است (۵). این سیست‌ها به‌طور معمول دارای ۶ تا ۱۰ درصد رطوبت و دارای قابلیت بقا تا ۵۰ سال می‌باشند. سیست‌ها پس از قرار گرفتن در آب دریا برای ۲۰ – ۱۵ ساعت تولید موجوداتی به نام لارو یا ناپلی می‌کنند که در حدود ۰/۲۵ میلی‌متر طول داشته و دارای یک جفت چشم می‌باشند. ۱۲ ساعت پس از تفرج، لارو وارد مرحله دوم می‌شود. در حدود دو هفته طول می‌کشد تا ناپلی‌ها بالغ گردند.

استفاده از روش‌های تجزیه دستگاهی گران و بعضاً غیر قابل دسترس، نیازمند پرسنل ماهر می‌باشد. لذا تعبیه روش‌های ساده و سریع و قابل اجرا در کلیه آزمایشگاه‌ها بهترین نتیجه را به‌دنبال خواهد داشت. تست آرتمیا سالینا قابل اطمینان، سریع، ارزان و اقتصادی است (۶). از این آزمون در تست‌های غربالگری و جداسازی ترکیبات سایتوتوکسیک فعال گیاهان و شناسایی بیش‌تر آن‌ها استفاده می‌گردد. تاکنون از این آزمون در مطالعات بسیاری جهت بررسی سمیت انواع گیاهان از جمله گیاهان خانواده Solanacea (۶) و خانواده‌های Euphorbiaceae و Compositae (۷)، Meliaceae (۸) و (Apiaceae) (۹) استفاده گردیده است.

«تاج خروس» در مراتع ایران می‌روید. افراد محلی از این گیاه در غذاهای سنتی استفاده می‌نمایند. «بندواش» با سرعت رشد و انتشار بسیار بالا، یونجه‌زارها را درگیر می‌نماید و گاهی مورد استفاده دام‌ها واقع شده و موجب سندرم ترومورژنیک در گاو و گوسفند می‌شود. «بابا آدم» نیز که در بسیاری از مناطق ایران می‌روید در طب سنتی استفاده می‌گردد. در این مطالعه میزان سمیت سه گیاه مراتع شمال کشور شامل تاج خروس، بندواش و بابا آدم با استفاده از آزمون آرتمیا سالینا مورد بررسی واقع شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از دو گروه آزمون و شاهد استفاده شده است. سه گیاه تاج خروس، بندواش و بابا آدم از منطقه قائمشهر جمع‌آوری گردیده و برای مدت دو هفته در درجه حرارت اتاق، خشک شدند. عصاره کلروفرمی- متانولی- آبی به نسبت ۲:۱:۱ در دستگاه سوکسیله برای مدت ۲۴ ساعت تهیه شد. با این روش هم ترکیبات قطبی و هم غیر قطبی استخراج می‌شود (۷). عصاره حاصله در سیستم روتاری تحت خلاء تبخیر گردید و سپس به ویال‌ها منتقل شد و در 4^{oc} نگهداری گردید.

جهت انجام آزمون آرتمیا سالینا از روش‌های معتبرکه قبلاً توضیح و تفسیر شده بود، استفاده شد (۷). به‌طور خلاصه، ۳۰۰ میلی‌گرم کیست آرتمیا سالینا در ظروف مخروطی شکل حاوی یک لیتر آب دریا مصنوعی (pH= ۸-۸/۵)، با هوادهی مداوم، در درجه حرارت اتاق و تحت تأثیر نور مصنوعی تفرج شد. سپس ۰/۵ سی سی از عصاره گیاه را در غلظت‌های ۱۰۰۰ppm و ۱۰۰ ppm و ۱۰ ppm به ۴/۵ سی‌سی محلول لارو یک روزه اضافه نمودیم. آزمایش در گروه‌های پنج تایی برای هر غلظت صورت گرفت. میزان لاروهای زنده و مرده در هر لوله پس از ۲۴ ساعت مواجهه توسط دستگاه لوپ شمارش شد.

جهت انجام این آزمون از لارو یا ناپلی مرحله دوم و سوم استفاده شده است. آرتمیاها صرفاً در این دو مرحله حساسیت به سموم دارند (۱۰) به-علاوه لاروها در این مراحل احتیاج به تغذیه نداشته و از ذخیره کیسه زرده خود استفاده می‌نماید (۱۱).

براساس شواهد کسب شده توسط گروه کاری این تحقیق، میزان مرگ-ومیر لارو مرحله سوم در نتیجه گرسنگی قابل توجه است. لذا در این

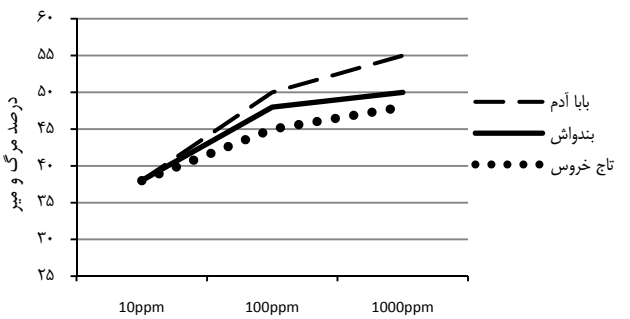
آزمون جهت حذف کلیه اثرات عوامل جانبی همانند گرسنگی، صرفاً از لارو مرحله دوم استفاده گردید. در این صورت مرگ‌ومیر مشاهده شده تنها در اثر عوامل سایتوتوکسیک گیاهان خواهد بود.
پس از انجام آزمایش، تعداد لاروهای مرده و زنده شمارش شد. لاروی که فاقد هیچ حرکت خارجی یا داخلی نیست، مرده در نظر گرفته می‌شود. جهت اطمینان از این‌که میزان مرگ‌ومیر مشاهده شده صرفاً تحت تأثیر ترکیبات فعال گیاه است، می‌بایست تعداد لاروهای مرده در گروه‌های درمانی با تعداد لاروهای مرده در گروه شاهد مقایسه شود. لذا جهت محاسبه درصد مرگ‌ومیر نهایی، درصد مرگ‌ومیر گروه شاهد از درصد مرگ‌ومیر گروه درمانی کاسته می‌شود (۱۰).

نتایج

نمودار ۱ درصد مرگ‌ومیر سه گیاه بابا آدم، بندواش و تاج خروس در سه غلظت ppm ۱۰۰۰ و ۱۰۰ و ۱۰ رانشان می‌دهد.
میزان کشندگی ۵۰ درصد یا LC50 (میزان غلظتی که نیاز می‌باشد تا نیمی ازلارو آرتمیا را از بین برد) با استفاده از معادله رگرسیون محاسبه گردید. نتایج مقایسه‌ای حاصله از میزان سایتوتوکسیتی آرتمیا سالینا توسط عصاره سه گیاه به‌صورت LC50 در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان LC50 سه گیاه تاج خروس، بندواش و بابا آدم به ترتیب ۱۶۴۰، ۹۹۰ و ۸۴۰ ppm محاسبه گردید.

بحث

در این مطالعه میزان سمیت سه گیاه تاج خروس، بندواش و بابا آدم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه بابا آدم سمی‌تر از سایر گیاهان می‌باشد. براساس پروتکل‌های موجود، چنان‌چه میزان LC50 یک گیاه بالاتر از ppm ۱۰۰۰ گزارش شود، گیاه را غیر سمی محسوب می‌نمایند (۶، ۷ و ۱۲). میزان LC50 گیاه بابا آدم ۸۴۰ppm است بنابراین می‌بایست دارای ترکیبات سایتوتوکسیک باشد. این گیاه دارای مواد آنتی‌اکسیدان می‌باشد (۱۳) و در طب سنتی استفاده می‌گردد اما همین گیاه دارای ترکیبات سایتوتوکسیک از جمله ارکتین (Arctine) و ارکتیژنین (Arctigenin) نیز هست (۱۴).
میزان کشندگی گیاه آشکنی ۱۶۴۰ ppm گزارش شده است. پس می توان گفت که سمیت این گیاه نسبت به بندواش و بابا آدم کم‌تر است. برگ‌های گیاه آشکنی قرن‌هاست به‌عنوان منبع غذایی توسط افراد بومی قاره آسیا، آمریکا، افریقا و اروپا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). در شمال ایران (منطقه قائمشهر) این گیاه را به همراه آش طبخ نموده و مصرف می‌نمایند.
ارزیابی ایمنی گیاهان دارویی، علاوه بر کارایی و تعیین خواص درمانی آن‌ها، امری لازم و ضروری است. آزمون آرتمیا سالینا یک روش کاربردی در ارزیابی‌های غربالگری و جداسازی ترکیبات فعال زیستی می‌باشد و در حدود ۳۰ سال است که از آرتمیا سالینا جهت ارزیابی



نمودار ۱- درصد مرگ-ومیر لاروهای آرتمیا سالینا در مواجهه با سه عصاره گیاه بابا آدم، بندواش و تاج خروس

جدول ۱- نتایج ارزیابی میزان سایتوتوکسیته سه گیاه بابا آدم- بندواش- آشکنی با استفاده از آزمون آرتمیا سالینا

نام گیاه	نام علمی گیاه	LC50(ppm)
بابا آدم	L. Arctium lappa	۸۴۰
بندواش	Paspalum distichum L.	۹۹۰
تاج خروس	Amaranthus retroflexus L.	۱۶۴۰

سمیت‌های کلی و سم‌شناسی محیطی استفاده می‌گردد (۱۱).
ارتباط مثبت بین میزان سایتوتوکسیته آرتمیا سالینا و کشت‌های سلولی کارسینومای ریه (A-549) و کارسینومای کولون (HT-29) ارتباط مثبت مشاهده شده است(۱۱). در بررسی دیگری، میزان سمیت حاصله از تزریق عصاره آبی و الکلی گیاه Solanium americanum به‌صورت داخل صفاقی در موش با میزان کشندگی لارو آرتمیا تطابق داشت (۷) هم‌چنین در این بررسی نتایج حاصله از تست آرتمیا سالینا، جهت ارزیابی سمیت مایکوتوکسین فومونیزین B1 ، با آزمون تعیین سمیت با استفاده از جنین جوجه قابل مقایسه بود (۱۵). در مطالعه‌ای بین نتایج حاصله از مواجهه عصاره ۲۰ گیاه با لارو آرتمیا و تجویز خوراکی این عصاره‌ها به موش، همبستگی قابل ملاحظه‌ای (r=۰/۸۵) مشاهده گردید (۱۶).
اگرچه آزمون آرتمیا سالینا جهت تفسیر و توضیح مکانیسم‌های سمیت کافی نیست اما یک روش مفید در ارزیابی مقدماتی و تعیین سمیت ترکیبات مختلف آن‌ها است. این روش نیازمند تجهیزات پیچیده و تکنیک‌های آسپتیک نیست (۱۷). از این آزمون علاوه بر ارزیابی گیاهان، در ارزیابی سمیت سایر مواد، همانند فلزات سنگین، آفت‌کش‌ها، مواد مورد استفاده در دندانپزشکی‌ها (پرکننده دندان)، رنگ‌ها و افزودنی‌های خوراکی، دترجنت، سورفکتانت‌ها (۱۸) و شناسایی غذاهای آلوده به مایکوتوکسین‌ها (۱۵ و ۱۹) نیز استفاده می‌گردد. براساس نتایج حاصله در این بررسی، به‌نظر می‌رسد گیاه بابا آدم نسبت به دو گونه

دیگر دارای اثرات سمیت قابل ملاحظه‌ای باشد. بنابراین دارای اولویت بیش‌تری جهت مطالعه تکمیلی و شناسایی ترکیبات سمی می‌باشد.

References

1. Saad B, Azaizeh H, Abu-Hijleh G, Said O. Safety of traditional arab herbal medicine. Evid Based CAM 2006;3(4):433-439.
2. Barthelson RA, Sundareshan P, Galbraith DW, Woosley RL. Development of a comprehensive detection method for medicinal and toxic plant species. Am J Bot 2006;93(4):566-574.
3. Palasuwan A, Soogarum S, Lertlum T, Pradniwat P, Wiwanitkit V. Inhibition of heinz body induction in an in vitro model and total antioxidant activity of medicinal Thai plants. Asian Pac J Cancer Prev 2005;6(4):458-463.
4. Sowemimo AA, Fakoya FA, Awopetu I, Omobuwajo OR, Adesanya SA. Toxicity and mutagenic activity of some selected Nigerian plants. J Ethnopharmacol 2007;113(3):427-432.
5. Tajik H, Moradi M, Razavi SM, Erfani AM, Shokouhi Sabet F. Preparation of chitosan from brine shrimp cyst shell and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties of the product. Molecules 2008;13(7):1263-1274.
6. Silva TM, Nascimento RJ, Batista MB, Agra MF, Camara CA. Brine shrimp bioassay of some species of solanum from northeastern Brazil. Revista Brasileira de Farmacogn 2007;17(21):35-38.
7. Caceres A, Lopez B, Gonzalez S, Berger I, Tada I, Maki J. Plants used in guatemala for the treatment of protozoal infections. I screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. J Ethnopharmacol 1998;62(31):195-202.
8. Pisutthanan S, Plianbangchang P, Pisutthanan N, Ruanruay S, Muanrit O. Brine shrimp lethality activity of thai medicinal plants in the family meliaceae. Naresuan Univ J 2004;12(6):13-18.
9. Deciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Corral G, Lopez GE, Navarrete A, et al. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. J Ethnopharmacol 2007; 110(2):334-342.
10. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia- Gravalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnol 2002; 2(6):17.
11. Costello MJ, Fretwell K, Read P. Toxicity of sewage sludge to Crangon crangon and artemia salina, with reference to other marine Crustacea. Aquat Living Resour 1993;6(4):351-356.
12. Alanis-Garza BA, Gonzalez-Gonzalez GM, Salazar-Aranda R, Waksman de Torres N, Rivas-Galindo VM. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. Journal of Ethnopharmacology 2007;114(3):468-471.
13. Duh P. Antioxidant activity of burdock: Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. JAOCS 1997;75(4):455-461.
14. Aslani M, Sifi H. Toxic plant of Iran. Mashad: Ferdosi publication;2005.p.84.[Persian].
15. Hlywka JJ, Beck MM, Bullerman LB. The use of the chicken embryo screening test and brine shrimp bioassays to assess the toxicity of fumonisin B1 mycotoxin. Food Chem Toxicol 1997;35(11):991-999.
16. Logarto Parra A, Silva Yhebra R, Guerra Sardinas I, Iglesias Buela L Comparative study of the assay of artemia salina and the estimate of the medium lethal dose in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine 2001;8(5):395-400.
17. Hartl M, Humpf HU. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp bioassay. FCT 2000;38(44):1097-1102.
18. Krishnaraju AV, Rao VN, Sundararju D, Vanisree M, Tsay H, Subbaraju GV. Assessment of bioactivity of indian medicinal plants using brine shrimp lethality assay. IJASE 2005;3(4):125-134.
19. Kanwar AS. Brine shrimp (Artemia salina)-a marine animal for simple and rapid biological assays. CJMED 2007;2(4):236-240.