

بررسی آثار تراژون عصاره گیاه اسپند بر سیستم اسکلتی و رشد جنین موش سوری با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین قرمز

فاطمه کرمانیان M.Sc.*، محمدتقی جفتابی Ph.D.*، مهدی مهدیزاده Ph.D.*

*گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ایران

تاریخ وصول: خردادماه ۸۱، تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۱

چکیده

هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی عوارض جانبی مانند اثرهای تراژون روی سیستم اسکلتال، کاهش رشد جنین و سقط به دنبال مصرف عصاره اسپند طی دوران بارداری در جنین موش سوری است.

مواد و روشها: در این بررسی به موشهای باردار در طی ده روز اول بارداری عصاره اسپند با سه دوز ۳۰، ۱۵ و ۶ mg/Kg/day به صورت داخل صفاقی تزریق شد. سپس موشها از روز ۱۵ تا ۱۹ بارداری کشته شدند. پس از لاپاراتومی، جنینها داخل سرم فیزیولوژی قرار داده شده و قد و وزن آنها اندازه گیری شد. برای بررسی آنومالیهای اسکلتال نمونه‌ها با آلیزارین قرمز رنگ آمیزی شده و با استریو میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تجویز عصاره اسپند به صورت intraperitoneal (ip) در جنین موش سبب آنومالی اسکلتال نمی شود ولی مصرف هر سه دوز ذکر شده نه تنها موجب سقط یا جذب جنین می گردد بلکه باعث کاهش قد و وزن جنینها در مقایسه با گروه کنترل می شود.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه بیشترین میزان جذب جنین در روزهای آخر بارداری یعنی روزهای ۱۸ و ۱۹ بوده است، به نظر می رسد که عصاره اسپند ابتدا وقفه ای روی رشد و تمایز جنین به وجود آورده و در نهایت سبب سقط شده است.

واژه‌های کلیدی: اسپند، سقط، تراژون، تأخیر رشد

مقدمه

آسیای میانه و مدیترانه است. این گیاه به صورت خودرو در اطراف جاده‌ها می روید. ظاهری بوته مانند و پریبرگ دارد. میوه آن به صورت کپسولهای مدور دارای ۳ تا ۴ قسمت است که داخل کپسول تعداد زیادی دانه‌های گرد سیاه رنگ وجود دارد. [۱].

از نظر ترکیبات شیمیایی دارای دو دسته آلکالوئید است:

- ۱- آلکالوئیدهای اندولی مانند هارمین، هارمالین، هارمالون، هارمیدین و روئین، ۲- آلکالوئیدهای کینازولینی مانند پگانین، پگانین، وازیسینون [۲].

امروزه آلکالوئیدهای اسپند به علت اثرهایی که روی سیستم عصبی و قلبی عروقی دارند، مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله

گیاه اسپند یکی از گیاهان بومی ایران است که از قدیم‌الایام در طب سنتی از آن به عنوان یک داروی آرامبخش، قاعده آور، تهوع آور، ضد آسم، ضد میکرب و انگل استفاده شده است. وجود آلکالوئیدهای Vasicine و Vasicinone در این گیاه که از نظر اثرهای انقباضی روی رحم مشابه مترژین واکسی توسین است موجب شده که در طب سنتی از آن به عنوان دارویی برای سقط غیر قانونی یا کنترل خونریزی پس از زایمان استفاده شود. peganum Harmala گیاه بومی نواحی شمال آفریقا،

آدرس مکاتبه: بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز علوم پایه،
گروه علوم تشریح Email: Joghataei@uswr.ac.ir

نتیجه گرفت که وازیسین تمایل به تجمع در رحم دارد [۵].
 shapira و همکاران در سال ۱۹۸۹ اثرهای عصاره متانولی پگانوم هارمالا را روی رتهای ماده بررسی کردند. آنها نتیجه گرفتند که تعداد جنینهای زنده کم شده و میزان جذب جنین افزایش یافته است. این عصاره با دوزهای ۲-۳/۵ g/kg/day موجب کاهش اندازه جنین نیز شده است. در تمام رتهای مورد آزمایش فولیکولهای در حال رشد و جسم زرد در تخمدانها مشاهده شده است. به نظر می رسد که آلكالوئیدهای کینازولینی مسئول این خاصیت هستند. این آلكالوئیدها از طریق آزادکردن پروستاگلندینها عمل می کنند [۶، ۷ و ۹].

حال با توجه به اینکه گیاه اسپند گیاه بومی ایران بوده و در طب سنتی و بومی برای ایجاد سقط غیرقانونی استفاده می شده است، لازم است تا صحت این مطلب ثابت شود. از آنجایی که بسیاری از موادی که خانمهای باردار به صورت خود درمانی برای سقط مصرف می کنند دارای عوارض جانبی بوده، بنابراین هدف این تحقیق بررسیهای زیر است:

۱. اثر تجویز عصاره اسپند بر میزان سقط یا جذب جنین
۲. اثر تجویز عصاره اسپند روی رشد جنین
۳. بررسی آنومالیهای اسکلتال جنین پس از مصرف عصاره اسپند توسط مادر باردار

مواد و روشها

در این تحقیق از موش سوری ماده واریته آلبینو استفاده شد. سن همه موشها بالای ۹۰ روز و وزن آنها بالای ۲۲ گرم بود که برای باروری مناسب است. موشها در تمام مدت آزمایش در حیوانخانه با حرارت ۲۶-۲۲ درجه سانتیگراد و رطوبت ۴۵-۵۵ نگهداری شدند. موشها مطابق جدول ۱ تقسیم بندی شدند. همچنین تعداد ۲۵ عدد موش نیز برای گروه کنترل انتخاب شد که به آنها به عنوان دارونما در روزهای ۱۰-۱ آب مقطر تزریق شد.

عصاره اسپند مورد استفاده به صورت محلول آبی آماده از داروپخش تهیه شد. این عصاره محلول ناهمگن ارغوانی رنگی است که باید هر بار قبل از استفاده خوب تکان داده شود. محلول

این آثار می توان اثرهای رفتاری، تشنج زایی مرکزی، توهم زایی، هیپوترمی، افت فشار خون، برادیکاردی و آریتمی را نام برد [۲ و ۳]. آلكالوئیدهای کینازولینی دارای اثرهای محرک تنفسی و انقباضی روی رحم هستند به همین علت در طب سنتی از اسپند برای کنترل خونریزی پس از زایمان استفاده می شود [۴، ۵، ۶ و ۷] انقباض رحم در حیوانات بیهوش یا حیواناتی که کمتر از نیمی از طناب نخاعی آنها نابود شده است، دیده می شود. بنابراین این تحریک را نمی توان به مرکز اعصاب یا نخاع مربوط دانست [۱].

مهمترین آلكالوئید uterotonic اسپند، vasicine است که در سال ۱۹۷۸ اثرهای آن روی رحم رت و خوکیچه هندی توسط Gupta انجام شده است [۵]. در این مطالعه مشاهده شد که آثار انقباضی رحم در خوکیچه هندی وابسته به مراحل مختلف بارداری و درمان قبلی حیوان با استرادیول است. در رت به دنبال تزریق داخل صفاق عصاره اسپند با دوز ۵-۱۵ mg/kg در روزهای ۸ و ۱۶ بارداری زایمان ترم مشاهده شد ولی به دنبال تزریق در روز ۱۰ بارداری همراه با تزریق استروژن، جذب جنین دیده شد. بنابراین با توجه به اینکه اثر وازیسین بر انقباض رحم به دنبال درمان با استروژن بیشتر می شود، می توان نتیجه گرفت که وازیسین از طرف سنتز پروستاگلندینها موجب انقباض رحم می شود و این در حیوانی که استروژن دریافت کرده بیشتر است، زیرا استروژنها سنتزها پروستاگلندینها را زیاد می کنند. در این مطالعه همچنین مشاهده شد که اگر وازیسین در اواخر بارداری به خوکیچه هندی تزریق شود ۵۰ درصد سقط ایجاد می کند [۶ و ۷].

در مطالعه دیگری که در سال ۱۹۸۰ توسط Zutshi و همکاران در مورد جذب و پراکندگی وازیسین روی موش انجام شد، مشاهده گردید که با تزریق، وازیسین نشاندار شده رادیوآکتیو به صورت وریدی (IV^۱)، عضلانی (IM^۲) و زیرجلدی (SC^۳) بدون توجه به نوع تزریق، نحوه جذب و پراکندگی یکسان بوده است. ده دقیقه پس از تزریق، بیشترین غلظت آن در رحم مشاهده شده است ولی تجمع وازیسین در سایر عضلات صاف و مخطط بعد از ۹۰ دقیقه دیده شد. تجمع قابل ملاحظه ای در کبد گزارش نشده است. بنابراین می توان

1- Intravenous
3- Subcutaneous

2- Intramuscular

تی‌یابا، فسیولا، دنده‌ها، استرنوم و بازبودن قوس خلفی مهره‌ها است.

جدول ۱. گروه‌بندی موشها بر اساس دوز تزریق عصاره اسپند

گروه	تعدادموش	دوزتزریق (mg/kg)	روزهای تزریق	روزهای بررسی
تجربی ۱	۲۵	۶	۱-۱۰ بارداری	۱۹-۱۵ بارداری
تجربی ۲	۲۵	۱۵	۱-۱۰ بارداری	۱۹-۱۵ بارداری
تجربی ۳	۲۵	۱۵	۱-۱۰ بارداری	۱۹-۱۵ بارداری
کنترل	۲۵	-	-	۱۹-۱۵ بارداری

یافته‌ها

اثرهای عصاره اسپند بر میزان سقط یا جذب جنین

این نتایج در جداول ۲ و ۳ جمع‌بندی شده است. با توجه به جداول مشاهده می‌شود که بیشترین میزان جذب مربوط به گروه تجربی ۳ است که بیشترین دوز را دریافت داشته است.

جدول ۲. مقایسه جنینهای جذب شده یا مرده

گروه	تعداد کل جنینها	جنینهای مرده یا جذب شده	درصد جذب
کنترل	۲۵۰	۰	۰
تجربی ۱	۲۳۹	۵۷	۲۳/۸
تجربی ۲	۲۳۷	۵۲	۲۱/۹
تجربی ۳	۲۳۵	۸۱	۳۴/۴

جدول ۳. مقایسه درصد جذب جنین در گروههای تجربی و شاهد (Mean ± st)

گروه	روز	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹
تجربی ۱	۰ ± ۰	۲۰ ± ۲۰	۲۲/۲ ± ۱۹/۵۶	۲۰ ± ۲۰	۲۰ ± ۲۰	۶۲/۵ ± ۲۲/۰۴
تجربی ۲	۲۰ ± ۲۰	۰ ± ۰	۲۰ ± ۲۰	۲۲/۲ ± ۲۲/۶	۲۲/۲ ± ۲۲/۵۸	۳۲/۵ ± ۲۲/۵۸
تجربی ۳	۲۰ ± ۲۰	۰ ± ۰	۲۰ ± ۲۰	۲۰ ± ۲۰	۲۲/۵ ± ۲۲/۵۸	۸۰ ± ۲۰
کنترل	۰	۰	۰	۰	۰	۰

اثر عصاره اسپند بر رشد جنین

در این آزمایش رشد جنینهای تمامی گروهها را با اندازه‌گیری دو کمیت قد و وزن انجام شد. به این صورت که پس از خارج کردن جنینها از کیسه آمینون قد و وزن آنها توسط استریومیکروسکوپ اندازه‌گیری شد. برای به‌دست آوردن میانگین و انحراف استاندارد هر آزمایش از برنامه PCS^۲ استفاده شد. سپس اختلاف میانگین قد و وزن تمامی گروهها از نظر معنی‌دار بودن با Paired t-test بررسی شد. فرض صفر این بود که میانگین وزن در گروههای شاهد، تجربی ۱ و ۲ و ۳ مساوی

ذخیره با اضافه نمودن ۱ میلی‌متر عصاره اسپند به ۱۰ میلی‌متر آب مقطر تهیه و در یخچال نگهداری شد. هر بار برای تزریق با استفاده از سرنگ انسولین مقدار لازم از محلول ذخیره جدا و مصرف شد.

پس از توزین، موشها به نسبت ۱ به ۳ با موشهای نر همان نژاد در قفسهای جداگانه جفت شد. روز مشاهده پلاک واژینال به‌عنوان روز صفر بارداری منظور شد. شرایط نور و آب و غذا و حرارت و رطوبت برای تمامی گروههای شاهد و تجربی یکسان بود. از روز اول تا روز دهم بارداری عصاره اسپند به‌صورت تزریق داخل صفاقی و مطابق جدول ۱ به گروههای تجربی تزریق شد. به موشهای گروه کنترل آب مقطر تزریق شد. از آنجایی که در موش، دوره اندام‌زایی تا روز دهم بارداری است، بنابراین ده روز متوالی برای تزریق انتخاب شد. سپس از روز ۱۵ تا ۱۹ بارداری موشهای تمامی گروهها هر روز در ساعت ده صبح به روش نخاعی کردن کشته شدند. علت استفاده از این روش سرعت عمل بالا و عدم استفاده از داروها و بخارات شیمیایی بود. همچنین این روش امکان می‌داد تا حرکات محسوس جنینها در هنگام خارج کردن آنها از شکم مادر مشاهده شود و بتوان آنها را از نظر زنده یا مرده بودن که یک شاخص سم‌شناسی است بررسی کرد. علت استفاده از تزریق ip این بود که اولاً عصاره اسپند تلخ است و موشها از خوردن آن امتناع می‌کنند و ثانیاً سرعت جذب تزریق ip کمتر از تزریق IV است. بررسیهای ریخت‌شناسی شامل اندازه‌گیری سری دمی^۱ بر حسب میلی‌متر (CR) شامل بالاترین سطح جمجمه تا مفصل ساکروایلیاک است) و اندازه‌گیری وزن بر حسب گرم با استفاده از ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۱ گرم انجام گرفت. برای اندازه‌گیری قد نمونه‌ها، یک تکه کاغذ ترانسپارنسی را بر حسب میلی‌متر مدرج نموده و پس از قراردادن نمونه روی آن به‌وسیله، استریو میکروسکوپ مشاهده و اندازه‌گیری انجام شد.

برای بررسی آنومالیهای اسکلتال از رنگ‌آمیزی آلینزاین قرمز استفاده شد. با استفاده از این نوع رنگ‌آمیزی بافت دارای کلسیم قرمز رنگ می‌شود. آنومالیهای مورد نظر شامل کاهش یا افزایش استخوانهای کارپ، متاکارپ و انگشتان، فقدان یا بدشکلی استخوانهای هومروس، اولنا، رادیوس، فمور،

1- Crovn-Rump

2- Pharmacoiogis Calculation System

بررسی آنومالیهای اسکلتال

در روش رنگ آمیزی با آلیزارین قرمز بافت دارای کلسیم به رنگ قرمز در می آید. این نوع رنگ آمیزی برای بررسی ظهور مراکز استخوانسازی و آنومالیهای اسکلتی بسیار مناسب است بر این اساس پس از رنگ آمیزی و بررسی تمام نمونه ها با استریومیکروسکوپ هیچ گونه آنومالی اسکلتی اعم از ناهنجاری دنده، نقص مهره، نقص اندام و... مشاهده نشد و مراحل استخوانسازی تمامی استخوانها به صورت طبیعی بود (شکل ۱).

جدول ۴. مقایسه وزن جنینهای گروههای تجربی با گروه کنترل در روزهای مختلف پس از مصرف دارو

روز بررسی	گروه کنترل	گروه تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
۱۵	۰/۲۶±۸/۹۴۴	۰/۲±۷/۰۷۱	۰/۲۲±۸/۳۶۶	۰/۱۶±۸/۹۴۴
۱۶	۰/۴±۷/۰۷	۰/۳±۰/۱*	۰/۳±۷/۰۷۱*	۰/۳۶±۰/۱۱۴
۱۷	۰/۵۴±۵/۴۷۷	۰/۳۶±۸/۹۴۴	۰/۴۶±۸/۹۴۴	۰/۵۶±۸/۹۴
۱۸	۰/۵۴±۸/۹۴۴	۰/۵±۷/۰۷۱	۰/۴۲±۰/۰۸۳	۰/۴۴±۰/۱۳۴
۱۹	۰/۶۸±۴/۴۷۷	۰/۴±۷/۰۷۱	۰/۴۸±۸/۳۶۶	۰/۴۶±۸/۹۴۴

*: P<0.01

جدول ۵. مقایسه قد جنینهای گروههای تجربی با گروه کنترل در روزهای مختلف پس از مصرف دارو

روز بررسی	کنترل	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
۱۵	۱۲±۱/۸۷	۱۰/۴±۱/۸۱۶*	۹/۳۹±۱/۱	۵/۶±۱/۵۱۶
۱۶	۱۴/۶±۱/۱۴	۱۲/۸±۰/۸۳۶	۱۱/۸±۰/۸۳۶	۱۲/۸±۰/۸۳۶
۱۷	۱۶/۶±۱/۱۴	۱۳/۸±۰/۸۳۶	۱۴/۴±۰/۵۴۷	۱۴±۰/۷۰۷
۱۸	۱۷/۶±۰/۵۴۷	۱۶±۰/۷۰۷	۱۴/۸±۰/۸۳۶	۱۱/۸±۰/۸۳۶
۱۹	۱۹/۶±۰/۸۹۴	۱۶/۸±۱/۳۰	۱۵/۸±۰/۸۳۶	۱۶±۱/۱۴۱

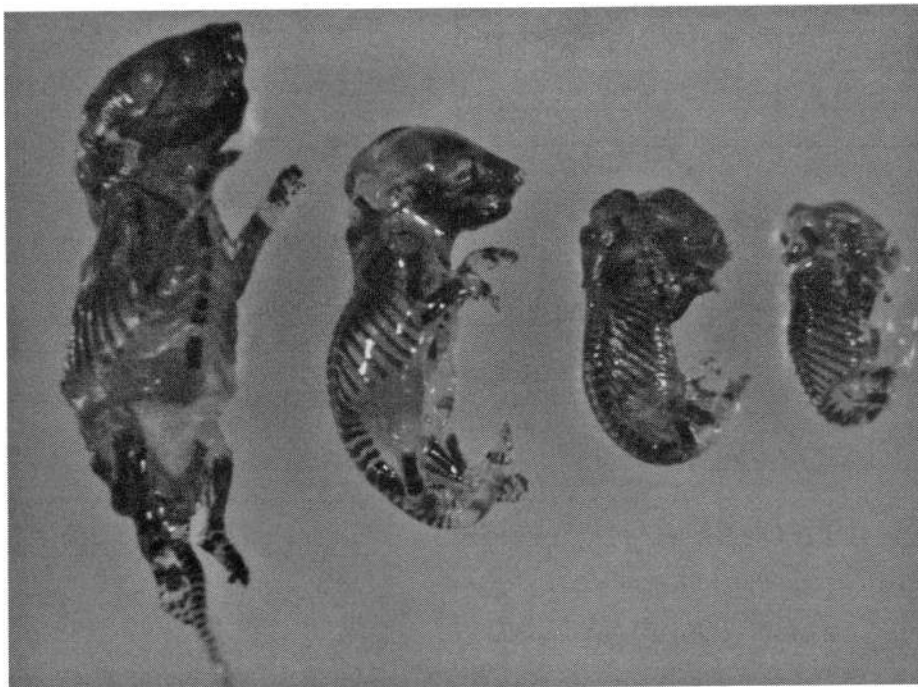
*: P<0.01

بمٹ

با توجه به نتایج به دست آمده و یافته های آماری حاصل به نظر می رسد که تزریق داخل صفاقی عصاره اسپند با سه دوز روزانه ۳۰ mg/kg و ۱۵ و ۶ در ده روز اول بارداری به موش سوری موجب تأخیر رشد جنین می شود. به طوری که در هر سه گروه تجربی کاهش قد و وزن جنینها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می شود که این اختلاف قد و وزن در گروه تجربی ۳ آشکارتر است. این نتایج با نتیجه مطالعات قبلی که در سال ۱۹۸۹ توسط Shapira صورت گرفته است مطابقت دارد [۹].

همچنین تزریق عصاره با دوزهای ذکر شده موجب جذب یا سقط جنین شد که در گروه تجربی ۳ بیشترین درصد جذب یعنی ۳۴/۴ درصد مشاهده می شود. با توجه به اینکه میزان جذب جنین در روزهای آخر بارداری یعنی روزهای ۱۸ و ۱۹ بیشتر بوده و با علم به اینکه در جوندگان سقط جنین مشاهده نمی شود بلکه جذب جنین وجود دارد بنابراین می توان نتیجه گرفت که در آزمایشهای ذکر شده با تزریق عصاره اسپند، ابتدا

است. اگر احتمال بیش از ۰/۰۱ می شد فرض صفر مورد قبول قرار می گرفت. بررسی این نتایج در روزهای مختلف و با توجه به جداول ۴ و ۵ و منحنی های مربوط نشان می دهد که قد و وزن جنینهای هر سه گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری دارد و این اختلاف بین گروههای تجربی ۱ و ۲ با گروه تجربی ۳ دوز اسپند بیشتری را دریافت نموده است، نیز مشاهده می شود.



شکل ۱. مقایسه قد جنینهای گروههای کنترل و تجربی. از چپ به راست: گروه کنترل، تجربی ۱، تجربی ۲، تجربی ۳. روز ۱۹ بارداری. بزرگنمایی ۴×

ایران بوده و در طب سنتی مصارف زیادی دارد و از آنجایی که یکی از مهمترین آکالوئیدهای اسپند یعنی هارماین مهارکننده سیستم (Mono amine inhibitor oxidase) بوده و اثرهای مختلفی روی سیستم عصبی مرکزی دارد بنابراین پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری در مورد عوارض جانبی یا تراتوژن آن روی سیستم عصبی انجام شود. بافت‌برداری از ویلوزیته‌های جفت و آزمایشهای بیوشیمیایی پروستاگلاندین نیز پیشنهاد می‌شود. همچنین لازم است مادران باردار را از خطرات مضر اسپند روی جنین آگاه کرد تا از مصرف نابجای آن در طی دوران بارداری خودداری کنند.

تقدیر و تشکر

انجام این پروژه بدون همکاری آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران، جناب آقای دکتر پریور و جناب آقای دکتر محمودیان مقدور نبود که لازم است از زحمات این عزیزان سپاسگزاری شود.

References

1. حاجی آخوندی عباس. استخراج آکالوئیدهای و بررسی Peganum Harmala اثرات ضدتیلریا. پایان‌نامه ۵۲۲، ۲۰۰۵، دانشکده داروسازی دانشگاه تهران. سال ۶۷-۱۳۶۶
2. Bahri LE. Peganum Harmala L.: a poisonous plant of north Africa. Vet Hum Toxicol. 1991; 33(3): 276-277
3. Ahmad A, Pamdita L, Thappa RK, Agarwa SG. Study of the in vitro antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives. J Ethnopharm. 1991; 35: 289-294
4. Kanwal P. Seasonal variation of alkaloids of Adhatoda Vasica and detection of glycosides and N-oxidas of vasicine and vasicinone. Planta Medica. 1983; 48: 81-82
5. Zutshi U, Rao PG, Gupta OP, Sony A. Absorption and

توقفی در تمایز و رشد جنین به وجود می‌آید که در نهایت موجب مرگ جنین می‌شود. این نتیجه‌گیری برخلاف نتیجه حاصل از مطالعات Gupta در سال ۱۹۷۷ است که سقط حاصل از تزریق عصاره اسپند را به دلیل ایجاد انقباضات رحمی می‌دانست [۶]. اگر علت افزایش سقط جنین به دنبال مصرف اسپند تنها در اثر انقباضات رحمی باشد، نباید اختلاف واضحی بین گروههای تجربی ۱ که کمترین دوز را دریافت کرده با گروه تجربی ۳ که بیشترین دوز را دریافت کرده است وجود داشته باشد. در حالی که در این مطالعه ما با افزایش واضح سقط (جذب جنین) در گروه تجربی ۳ مواجه بودیم که چون شیوع جذب جنین در روزهای آخر بارداری افزایش داشته، به نظر می‌رسد عصاره اسپند با توقف رشد و تمایز اندامها موجب مرگ جنین می‌شود و به عنوان نمونه در این مطالعه سیستم اسکلتال بررسی شد که هیچ‌گونه آنومالی و تراتوژن در این سیستم به دنبال مصرف عصاره اسپند مشاهده نشد. لازم است طی مطالعات بعدی سایر ارگانها نیز از نظر تراتوژن اسپند بررسی شوند. حال با توجه به اینکه گیاه اسپند بومی کشور

distribution of Vasicine a novel uterotonic. Planta medica. 1980; 40: 373-377

6. Gupta OP. Potent uterine activity of alkaloid vasicine. Indian J Med Res. 1977; 66(5): 865-87
7. Gupya OP. Pharmacological investigations of vasicine and vasicinone. Indian J Med Res. 1977; 6(4): 680-691
8. Gupta OP. Vasicine, alkaloid of Adhatoda Vasica, A promising uterotonic abortifacient. Indian J Expl Biol. 1978; 16: 1075-1077
9. Shapria Z, Terkel J, Egozi Y, Nyska A. Abortifacient portential for the epigeal parts of Peganum Harmala. J Ethnopharm. 1989; 27: 319-325

