



ارزیابی آثار عصاره هیدروالکلی کلپوره (*Teucrium polium*) بر جنین و مایع کوریوآلانتوییک با استفاده از مدل جنینی ماکیان

امین درخشان فر^۱، هادی توکلی^{۳*}، جواد مویدی^۱، علی پوست فروش فرد^۴

- ۱- مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
- ۲- مرکز پزشکی مقایسه‌ای و تجربی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
- ۳- بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
- ۴- معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

مقاله پژوهشی اصیل

مقدمه

عوارض جانبی داروها همواره به عنوان یکی از موارد بحث برانگیز در علوم پزشکی مطرح بوده است. تاکنون تحقیقات کافی درباره آثار جانبی و پاتولوژیک گیاه کلپوره به عنوان یک گیاه دارویی بر جنین صورت نگرفته است. لذا مطالعه‌ی پیش‌رو در نظر دارد اثرات پاتولوژیک عصاره هیدروالکلی گیاه کلپوره بر ترکیبات شیمیایی مایع کوریوآلانتوییک و پارامترهای وزن، رشد و بافت‌های خارجی و داخلی جنین را با استفاده از مدل جنینی ماکیان مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۸ تخم‌مرغ نطفه‌دار از نژاد راس ۳۰۸ بطور تصادفی به ۳ گروه مساوی تقسیم گردید. در گروه اول (کنترل) مقدار ۰/۵ سی‌سی فسفات بافر سالین و در گروه‌های دوم و سوم ۰/۵ سی‌سی عصاره هیدروالکلی کلپوره به ترتیب با دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ به داخل زرده تخم‌مرغ‌ها تلقیح گردید. به جنین‌ها تا روز ۱۸ اجازه رشد داده شد و سپس از نظر ضایعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

تزریق عصاره هیدروالکلی موجب ایجاد اختلال در وزن، رشد و فاکتورهای بیوشیمیایی مایع کوریوآلانتوییک در طول دوران رشد گردید و بیشترین آثار پاتولوژیک در بافت‌های پوششی، مغز، ریه، قلب، کبد و کلیه جنین‌های دریافت‌کننده عصاره کلپوره با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری

عصاره هیدروالکلی کلپوره می‌تواند آثار پاتولوژیک مختلفی در اندام‌های خارجی، داخلی و مایع کوریوآلانتوییک ایجاد نماید. با توجه به مصرف این گیاه در مناطق مختلف ایران، توصیه می‌شود استفاده از آن بخصوص در دوران بارداری با احتیاط صورت پذیرد.

کلیدواژه‌ها

هیستوپاتولوژی، گیاهان دارویی، کلپوره، جنین، ماکیان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۵

*نویسنده مسئول: هادی توکلی، بخش

علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تلفن: ۰۴۷-۳۳۲۲۲۰۳۴-۹۸۳۴

پست الکترونیک:

tavakkoli@uk.ac.ir



مقدمه

گیاه کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* یکی از گیاهان مطرح در طب سنتی ایران است که از آن جهت رفع سردرد، بیماری‌های دستگاه تناسلی-ادراری و رفع ناراحتی هاضمه و دل‌درد استفاده می‌شود. علاوه بر این، گیاه کلپوره دارای اثرات ضد تشنج، ضد سرماخوردگی، ضد راشیتیس، کاهنده قند خون و آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد و مصرف آن بین مردم مناطقی از ایران متداول است (۱-۵). این گیاه در مناطق معتدل و کوهستانی، سواحل سنگلاخی و ماسه‌زارهای نواحی مختلف اروپا، منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا می‌روید و پراکندگی وسیعی در نواحی نیمه بایر و کوهستان‌های نیمه‌خشک، مناطق شمال، مغرب، جنوب و مرکز ایران بویژه منطقه البرز و اطراف تهران دارد. این گیاه بوته‌ای دارای گل‌های سفید و خوشبو بوده که طعم تلخی دارد. مهمترین بخش قابل استفاده گیاه کلپوره سرشاخه‌های گلدار آن می‌باشد که در سبذ غذایی انسان مصرف می‌گردد. طریقه مصرف این دارو بیشتر به شکل جوشانده و عرقیات گیاهی می‌باشد. کلپوره حاوی ترکیبات مختلف شیمیایی از جمله بتا-سیتوسترول، کامپسترول، کلسترول، گلوکز، فروکتوز، رافینوز، رامنوز، لیمونن، لینالول، سدرول و آلفا-فلاندرن می‌باشد. مصرف این گیاه تنها برای مدت کوتاه مجاز است و تجویز طولانی مدت آن با احتمال بروز سمیت کبدی و کلیوی، افزایش آنزیم‌های کبدی، اوره و کلسترول همراه است (۶-۹).

عوارض جانبی و سمیت داروها همواره به عنوان یکی از مباحث بحث برانگیز در علوم پزشکی مطرح بوده است و برخلاف تصور عموم که اثرات جانبی دارو را فقط مختص مصرف خودسرانه دارو می‌دانند، اثرات جانبی توسط همه انواع داروهای سنتزی، داروهای طبیعی و غیر سنتزی ایجاد می‌شوند. بنابراین، گیاهان دارویی نیز ممکن است با داشتن

اثرات جانبی ناخواسته، سبب ایجاد آسیب‌های بافتی غیر قابل جبران گردند. مطالعات قبلی روی گیاه کلپوره خواص آنتی‌اکسیدانی و اثرات محافظتی آن را در برابر هیپاتوتوکسیته ناشی از استامینوفن به اثبات رسانده‌اند (۱۰). عصاره‌های آبی و الکلی این گیاه نیز دارای خواص ضد التهابی چشمگیر بوده‌اند که آن را به افزایش عملکرد نوتروفیل‌ها نسبت داده‌اند (۱۱، ۱۲). علاوه بر این، خواص ضد سرطانی این گیاه و توانایی آن در کنترل قند خون بدلیل خواص هیپوگلیسمیک نیز مورد توجه جدی محققان قرار گرفته است (۱۳). خواص ضد اسپاسمی و آرامبخشی روغن گیاه کلپوره پس از جداسازی ایلئوم در رت نیز استفاده از آن را جهت درمان بیماری کولیک ممکن ساخته است (۱۴).

با این وجود، کلپوره به عنوان یک گیاه دارویی می‌تواند آثار جانبی مختلفی نیز داشته باشد در حالی که تحقیقات علمی و تجربی کمی در خصوص آثار جانبی و پاتولوژیک این گیاه بر جنین صورت گرفته است. از این رو انجام مطالعات بیشتر در خصوص آثار گیاه کلپوره بر میزان رشد جنین، وزن و همچنین آثار تراتوژنیک و پاتولوژیک این گیاه بر اندام‌های خارجی و داخلی جنین ضروری می‌باشد. جنین ماکیان می‌تواند به عنوان یک مدل پیش‌درمانگاهی مناسب جهت ارزیابی آثار پاتولوژیک داروها مطرح باشد و محققین زیادی نیز از این مدل جهت ارزیابی آثار داروها و ترکیبات مختلف بر جنین استفاده کرده‌اند. با توجه به اینکه در هنگام تلقیح عصاره گیاه به تخم مرغ، این ترکیب در جنین به صورت سیستمیک پخش می‌شود، مدل جنین جوجه می‌تواند مدل مناسبی جهت ارزیابی آثار دارو بر جنین انسان باشد (۱۵-۱۸). لذا مطالعه پیش‌رو در نظر دارد با استفاده از مدل جنین ماکیان، اثرات عصاره گیاه کلپوره بر پارامترهای وزن و رشد جنین، آثار پاتولوژیک عصاره بر بافت‌های خارجی و

داخلی جنین، و اثرات این عصاره بر ترکیبات شیمیایی مایع آلانتوییک را مورد ارزیابی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروالکلی

گیاه کلپوره در فصل تابستان از منطقه لاله‌زار کرمان تهیه شد و در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت. عصاره هیدروالکلی این گیاه با استفاده از روش پركولاسیون تحت فشار در بخش شیمی دانشگاه شهید باهنر کرمان تهیه شد. بدین منظور مقدار ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده گیاه درون پركولاتور (فارما تجهیز، کرمان، ایران) ریخته شد و سطح آن با ۱ لیتر اتانول ۷۰٪ پوشانیده شد. پس از سپری شدن ۷۲ ساعت، عصاره از دستگاه خارج گردید و با کاغذ واتمن شماره ۴۰ فیلتر شد. در ادامه عصاره‌ها در دستگاه روتاری تغلیظ شد و در نهایت توسط دسیکاتور و پمپ خلاء خشک گردید.

گروه‌های آزمایش

در این تحقیق از ۴۸ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار از نژاد راس ۳۰۸ با میانگین وزن مشابه که تحت شرایط کاملاً استاندارد در کارخانه جوجه‌کشی مرغ مادر ماهان کرمان تولید شده بود، استفاده گردید. تخم‌مرغ‌ها بطور تصادفی به ۳ گروه مساوی ($n=16$) تقسیم گردید: در گروه اول (گروه کنترل) مقدار ۰/۵ سی‌سی فسفات بافر سالین توسط سوزن با گیج ۲۲ به داخل زرده تخم‌مرغ‌ها تلقیح شد. در گروه‌های دوم و سوم ۰/۵ سی‌سی عصاره گیاه کلپوره به ترتیب با دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ (56 ± 3 گرم) توسط سوزن با گیج ۲۲ به داخل زرده تخم‌مرغ‌ها تلقیح گردید. دوزهای مورد نظر بر اساس مطالعات اولیه روی جنین‌ها انجام گرفت به نحوی که دوزهای بیشتر از ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ باعث مرگ تعداد زیادی از جنین‌ها گردید و دوزهای کمتر از ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ نیز بر

روی جنین‌ها بی‌اثر بود. جهت حل کردن عصاره از فسفات بافر سالین و به منظور استریل کردن محلول تولید شده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استفاده شد. تزریق دارو در روز چهارم دوره اینکوباسیون انجام شد، زیرا این زمان مرحله بسیار حساسی در اندام‌زایی جنین است و داروها در این زمان بیشترین آثار پاتولوژیک را ایجاد خواهند کرد (۱۸-۲۱). سپس تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار درون دستگاه هجری (بلدرچین دماوند dq100sh، تهران، ایران) با دمای ۳۷/۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰٪ اینکوبه گردیدند. پروتکل انجام این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز تایید شده است و تمامی ملاحظات اخلاقی در هنگام انجام آزمایش مد نظر قرار گرفت (IR.SUMS.REC.1394.S683).

ارزیابی آثار عصاره هیدروالکلی کلپوره بر مایع آلانتوییک و جنین

نیمی از جنین‌های هر یک از گروه‌های آزمایش (۸ جنین) در روز چهاردهم دوره اینکوباسیون از دستگاه هجری خارج گردیدند. پوسته تخم‌مرغ‌ها از انتهای پهن آنها باز شد و مایع آلانتوییک با دقت خارج گردید. آزمایشات بیوشیمیایی جهت اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، کراتینین و اوره انجام پذیرفت. یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر استفاده از کیت‌های انسانی جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی مایع آلانتوییک به علت در دسترس نبودن کیت‌های اختصاصی جنین ماکیان بود. جنین‌های باقی مانده در هر یک از گروه‌های آزمایش (۸ جنین) در روز هجدهم دوره اینکوباسیون از دستگاه هجری خارج گردید و جنین آنها پس از باز کردن پوسته تخم‌مرغ از انتهای پهن با دقت خارج شد. جنین‌های خارج شده ابتدا از لحاظ اندازه از محدوده استخوان فرونتال (Frontal Bone) تا انتهای

معناداری کمتر یا مساوی ۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیز متغیرهای بیوشیمیایی مایع آلانتویک گروه‌های آزمایش در جدول شماره ۱ آورده شده است. بررسی جنین‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره کلپوره نشان داد که تزریق عصاره به داخل تخم‌مرغ باعث تغییر در میزان آنزیم‌های ALP، ALT و AST شده است و میزان کراتینین و اوره تغییر معنی‌داری نداشته است. نتایج این مطالعه حاکی از افزایش معنی‌دار آنزیم ALP در جنین‌های دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه کنترل و نسبت به گروه جنین‌های دریافت‌کننده عصاره با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بود ($p < 0.05$). افزایش معنی‌دار آنزیم‌های ALT و AST نیز در هر دو گروه جنین‌های دریافت‌کننده عصاره با دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$) اما بین گروه‌های دریافت‌کننده عصاره کلپوره اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

استخوان پیوبیک (Pubic Bone) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس وزن جنین اندازه‌گیری شد و ایندکس وزن جنین به وزن تخم‌مرغ محاسبه و بین گروه‌های مختلف مقایسه گردید. سپس هر یک از جنین‌ها در زیر میکروسکوپ لوپ جهت بررسی آثار عصاره گیاه دارویی کلپوره بر اندام‌های خارجی، بافت پوششی و پوست جنین مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور بررسی ضایعات میکروسکوپی، از اندام‌های داخلی شامل مغز، قلب، کبد، کلیه و ریه نمونه‌برداری انجام شد و پس از فیکس شدن در فرمالین ۱۰٪، در دستگاه آماده‌سازی بافت قرار گرفت. پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌هایی به قطر ۵ میکرون تهیه گردید و توسط هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد و ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک گروه‌های مختلف به صورت کیفی مورد مقایسه قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد. از تست آنالیز واریانس یک طرفه جهت ارزیابی اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه کلپوره بر ترکیبات شیمیایی مایع آلانتویک در گروه‌های مختلف استفاده گردید و سطح

جدول ۱- آنالیز ترکیبات بیوشیمیایی مایع آلانتویک جنین جوجه

متغیرها	عصاره کلپوره (میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم مرغ)		فسفات بافر سالین
	۵۰	۲۵	
آلکالین فسفاتاز	۳۵۹/۲۵±۶/۶۵ ^b	۲۱۵/۸۵±۹/۲۱ ^a	۲۰۲/۵۶±۵/۶۵ ^a
آلانین آمینو ترانسفراز	۵۹/۴۱±۴/۴۰ ^b	۵۶/۸۵±۷/۲۰ ^b	۲۱/۲۳±۴/۲۱ ^a
آسپارات آمینو ترانسفراز	۲۰۰/۲۸±۵/۲۴ ^b	۱۷۰/۱۶±۷/۴۲ ^b	۴۸/۶۹±۵/۲۱ ^a
کراتینین	۰/۴۲±۰/۰۴ ^a	۰/۴۵±۰/۰۳ ^a	۰/۳۵±۰/۰۵ ^a
اوره	۱۱/۸۴±۲/۰۲ ^a	۹/۷۶±۱/۰۷ ^a	۶/۲۴±۱/۰۲ ^a

اعداد به صورت میانگین خطای استاندارد±میانگین گزارش شده است و اعداد با اندیس متفاوت در یک ردیف دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند.

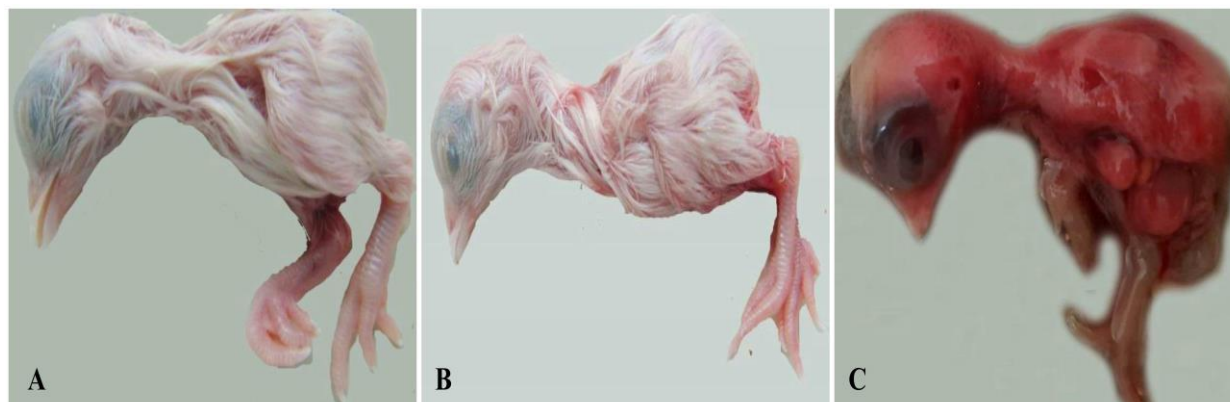
پارامترهای فوق مشاهده نشد (جدول ۲). بررسی جنین‌ها در گروه‌های دریافت کننده عصاره کلپوره نشان داد که تزریق عصاره با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ به داخل تخم‌مرغ می‌تواند آثار مخربی بر پوشش خارجی جنین در طول دوران رشد داشته باشد و موجب اختلال در رشد طبیعی پوشش خارجی و پرخونی گردد (شکل ۱).

تزریق عصاره هیدروآلکلی کلپوره با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ در طول دوران رشد موجب بروز آثار مخربی روی جنین گردید و بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) پارامترهای وزن و رشد را کاهش داد، اما اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه دریافت کننده عصاره کلپوره با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ و گروه کنترل از نظر

جدول ۲- آثار عصاره کلپوره بر وزن و رشد جنین

عصاره کلپوره (میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ)		فسفات بافر سالین	پارامترها
۵۰	۲۵		
$43/30 \pm 8^b$	$73/42 \pm 6^a$	$74/23 \pm 5^a$	طول جنین (میلی‌متر)
$0/49 \pm 0/18^b$	$0/68 \pm 0/14^a$	$0/69 \pm 0/11^a$	وزن جنین به وزن تخم‌مرغ (گرم)

اعداد به صورت انحراف معیار \pm میانگین گزارش شده است و اعداد با اندیس متفاوت در یک ردیف دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند.



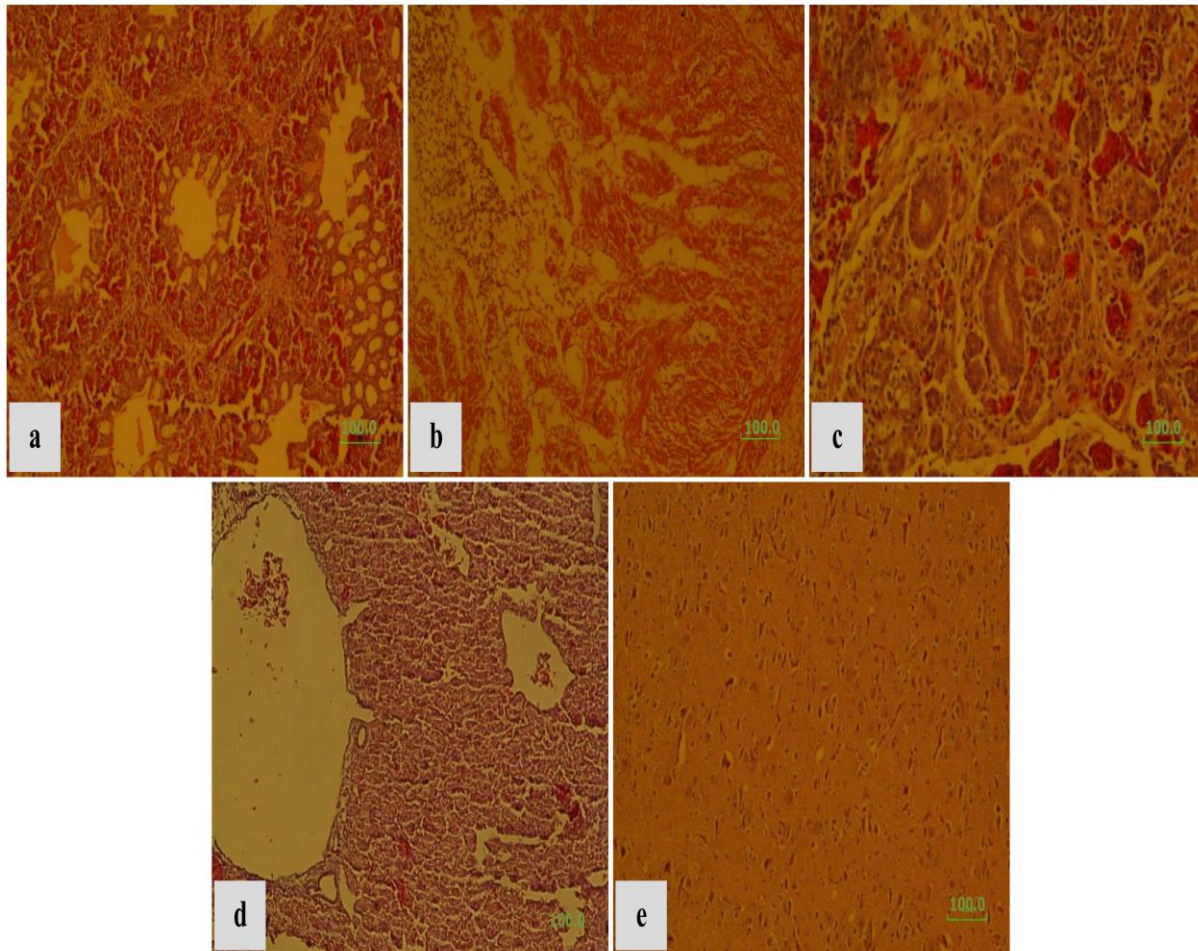
شکل ۱- آثار عصاره گیاه دارویی کلپوره بر اندام‌های خارجی، بافت پوششی و پوست جنین. (A) جنین گروه کنترل دریافت کننده فسفات بافر سالین با رشد طبیعی، (B) جنین دریافت کننده عصاره کلپوره با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم با رشد طبیعی، (C) جنین دریافت کننده عصاره کلپوره با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم همراه با کاهش رشد در مقایسه با گروه کنترل.

میلی‌گرم/کیلوگرم، ادم بینابینی در ریه و پرخونی در قلب تشخیص داده شد در حالی که کلیه، کبد و مغز دارای ساختار نرمال بودند (شکل ۳). در جنین‌های دریافت کننده

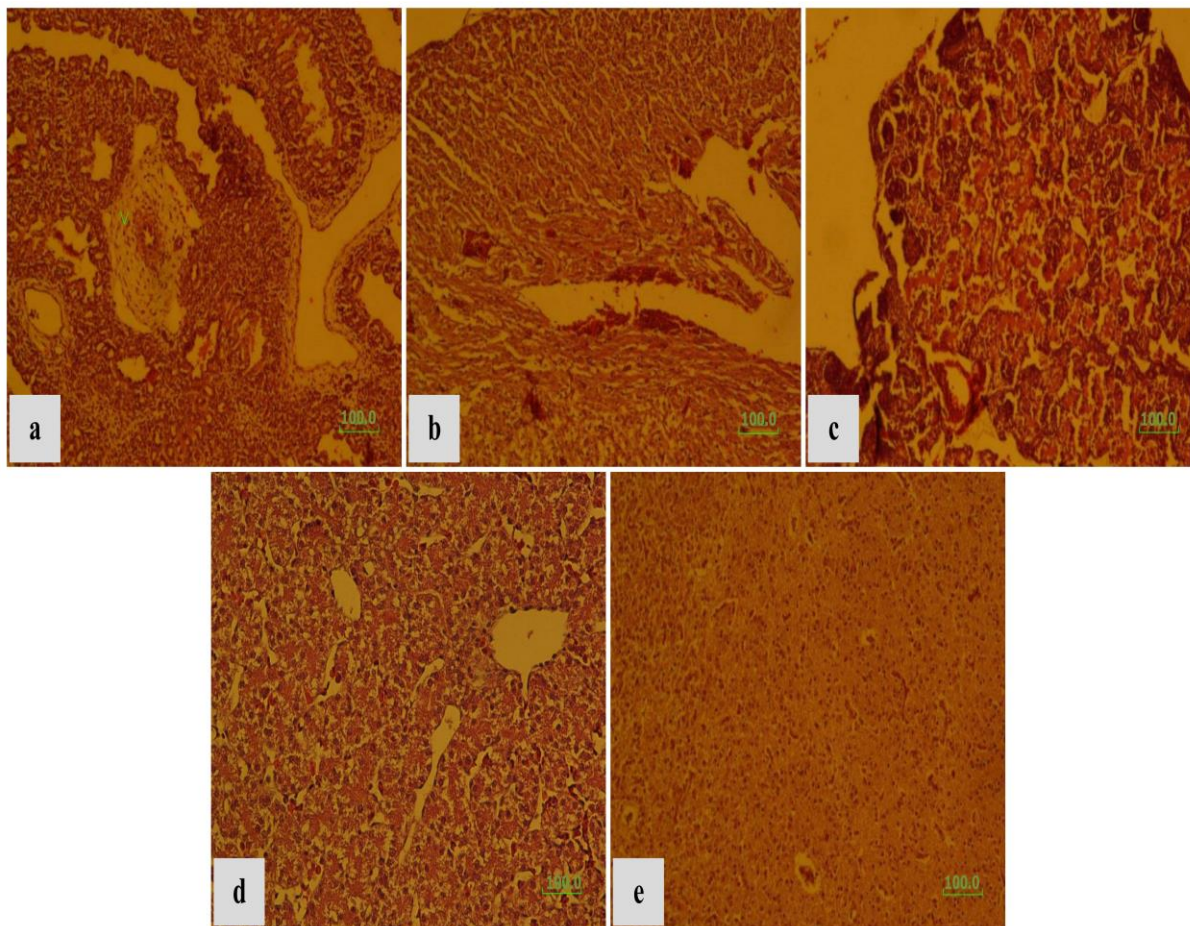
عدم وجود آثار پاتولوژیک عصاره کلپوره در اندام‌های داخلی جنین گروه کنترل در شکل ۲ نشان داده شده است. در جنین‌های دریافت‌کننده عصاره کلپوره با دوز ۲۵

شد. علاوه بر این، دژنراسیون هیپاتوسیت‌ها به همراه اتساع سینوزوئیدهای کبدی و تجمع گلبول‌های قرمز در سینوزوئیدها نیز در این گروه مشاهده شد (شکل ۴).

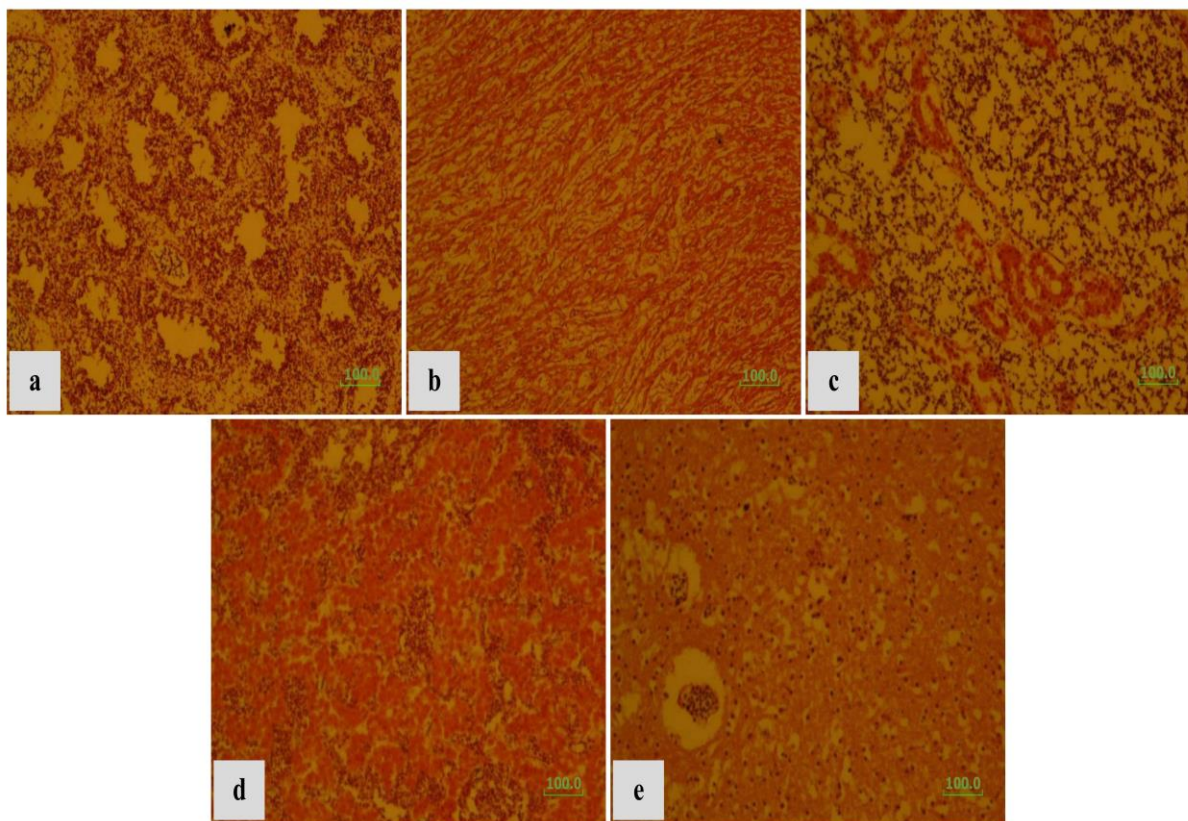
عصاره کلیپوره با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، دژنراسیون و تغییر مورفولوژیک ساختار ریه، ادم بافت مغز، ادم بین میوسیت‌های قلب و دژنراسیون شدید کلیه تشخیص داده



شکل ۲- جنین گروه کنترل دریافت کننده فسفات بافر سالین. بافت‌های ریه (a)، قلب (b)، کلیه (c)، کبد (d)، و مغز (e) با ساختار طبیعی، (هماتوکسیلین و ائوزین، $\times 100$).



شکل ۳- جنین دریافت کننده عصاره کلیپوره با دوز ۲۵ میلی گرم/کیلوگرم ادم بینابینی در ریه (a)، پرخونی در قلب (b)، ساختار نرمال کلیه (c)، کبد (d)، و مغز (e)، (هماتوکسیلین و اتوزین، $\times 100$).



شکل ۴- جنین دریافت کننده عصاره کلیپوره با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم. دژنراسیون و تغییر مورفولوژیک ساختار ریه (a)، ادم بین میوسیت‌های قلب (b)، دژنراسیون شدید در کلیه (c)، دژنراسیون هیپاتوسیت‌ها به همراه اتساع سینوزوئیدهای کبدی و تجمع گلبول‌های قرمز در سینوزوئیدها (d)، ادم در بافت مغز (e)، (هماتوکسیلین و ائوزین، $\times 100$).

بحث

هیستوپاتولوژیک آن بر اندام‌های داخلی از یک الگوی وابسته به دوز تبعیت می‌کند و با افزایش دوز عصاره، آثار منفی آن نیز بیشتر آشکار می‌گردد.

بطور کلی، مشخص شده است که گیاه کلیپوره دارای ترکیباتی با خواص سیتولوژیکی متضاد می‌باشد. مطالعات فیتوشیمیایی از یکسو منجر به شناسایی ترکیباتی سلامت بخشی مانند پلی‌فنل‌ها، ترپنوئیدها و فلاونوئیدها در این گیاه شده و از طرف دیگر ترکیبی به نام neo- diterpenes clerodane موجود در این گیاه دارای اثرات هیپاتوتوکسیک قوی می‌باشد (۲۲، ۲۳). علاوه بر این، در یک مطالعه انجام شده روی موش‌های مبتلا به دیابت، مصرف کلیپوره باعث

در تحقیق حاضر مشخص گردید که تلقیح عصاره هیدروالکلی گیاه کلیپوره با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن تخم‌مرغ می‌تواند آثار مخربی بر پارامترهای وزن و رشد جنین داشته باشد. علاوه بر این، آثار پاتولوژیک عصاره هیدروالکلی گیاه کلیپوره در اندام‌های مهم و حیاتی جنین از جمله قلب، کبد و کلیه نیز مشاهده شد. تغییرات ایجاد شده در برخی پارامترهای بیوشیمیایی مایع آلتوویک از جمله آنزیم‌های ALP، ALT و AST و افزایش آنها نیز تایید کننده آسیب‌های بافتی می‌باشد. آثار مخرب عصاره هیدروالکلی گیاه کلیپوره بر پارامترهای وزن و رشد جنین و آثار

رت‌ها متعاقب مصرف کلپوره مشاهده شده است (۱۰). در انسان به دنبال مصرف زیاد کلپوره عوارضی مانند هپاتیت، هایپرگلاسمی و هیپرکلسترولمی دیده شده است (۷، ۸). آسیب حاد کلیوی متعاقب مصرف گیاه کلپوره جهت درمان دیابت در انسان نیز گزارش شده است (۲۷).

یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر استفاده از کیت‌های انسانی جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی مایع آلتوییک به علت در دسترس نبودن کیت‌های اختصاصی جنین ماکیان بود که در آینده با ساخت و توسعه کیت‌های تجاری مخصوص ارزیابی مایع آلتوییک جنین ماکیان می‌توان بر این محدودیت فائق آمد.

علاوه بر این، اثرات عصاره آبی گیاه کلپوره نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است. همچنین اثرات احتمالی عصاره هیدروالکلی گیاه کلپوره بر سایر بافت‌های جنین نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر داشته و تحقیقات آینده را در این خصوص طلب می‌نماید. از آنجا که جنین ماکیان مدل مناسبی برای ارزیابی خصوصیات توکسیک داروها می‌باشد (۲۸، ۲۹)، می‌توان پیش‌بینی نمود که مصرف گیاه کلپوره در طی دوران بارداری ممکن است آثار نامناسبی بر رشد و نمو جنین و پارامترهای بیوشیمیایی مایع آلتوییک داشته باشد.

نتیجه‌گیری

در حال حاضر گیاه دارویی کلپوره در بسیاری از مناطق شهری و روستایی ایران مصرف می‌گردد و افراد زیادی مشغول فعالیت در بخش تولید و عرضه گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنها می‌باشند. با توجه به مشاهده ضایعات مختلف پاتولوژیک به دنبال تلقیح عصاره گیاه کلپوره در مدل جنین ماکیان، پیشنهاد می‌گردد که مصرف این گیاه توسط مادران باردار حداقل تا زمانی که دلایل کافی بر مضر نبودن

افزایش کلسترول، تری‌گلیسرید، ALT و AST شده است (۶) در حالی که در مطالعات دیگری کاهش سطح تری‌گلیسرید، کلسترول و LDL و افزایش HDL سرم متعاقب مصرف این گیاه در حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید قرار گرفته است (۱۱، ۲۳، ۲۴). لذا بروز نتایج متناقض در مطالعات قبلی، که می‌تواند ناشی از تفاوت‌ها در روش استخراج عصاره‌های گیاه کلپوره، دوز عصاره و مدت زمان مصرف آن باشد، دلیلی بر لزوم محدودیت استفاده از این گیاه است.

در تحقیق حاضر اثرات پاتولوژیک عصاره کلپوره بر جنین جوجه برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که عصاره گیاه کلپوره می‌تواند باعث تغییر در برخی از پارامترهای بیوشیمیایی مایع آلتوییک جنین‌های مورد مطالعه به دنبال آسیب به بافت‌های مهم و حیاتی بدن گردد. ادم در بافت مغز، دژنراسیون و تغییر مورفولوژیک ساختار ریه، ادم بین میوسیت‌های قلب، دژنراسیون شدید در کلیه و هپاتوسیت‌ها به همراه اتساع سینوزوئیدهای کبدی و تجمع گلبول‌های قرمز در آنها از مهمترین ضایعات پاتولوژیک مشاهده شده متعاقب مصرف عصاره هیدروالکلی گیاه کلپوره می‌باشد، که با مطالعات قبلی همخوانی دارد. با توجه به گزارش‌های قبلی و نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد ترکیباتی در گیاه کلپوره وجود دارد که می‌تواند موجب القای آسیب‌های کبدی و افزایش سطح آنزیم‌های ALP، ALT و AST شود. علاوه بر آسیب‌های کبدی، سایر عوارض جانبی گیاه دارویی کلپوره نیز در این مطالعه مورد تایید قرار گرفته است.

دژنراسیون شدید بافت کلیه یکی دیگر از آسیب‌های بافتی مطالعه تجربی حاضر بود که با یافته‌های پیشین پیرامون اثرات نفروتوکسیسیته این گیاه در رت‌های نر مطابقت دارد (۲۵، ۲۶). علاوه بر این، ضایعات لوله‌ای نیز در بافت کلیه



این مقاله برگرفته شده از طرح مصوب مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز با شماره ۹۴۳۰ می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تعارض منافی ندارند.

آن برای انسان یافت گردد، با احتیاط بیشتری صورت پذیرد. گیاه کلیپوره حاوی ترکیبات مختلف شیمیایی می‌باشد و بررسی نقش هر یک از آنها در ایجاد ضایعات پاتولوژیکی جنین نیاز به تحقیقات بیشتری دارد که باید در مطالعات آتی مورد توجه و ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

References

1. De Marino S, Festa C, Zollo F, Incollongo F, Raimo G, Evangelista G, et al. Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chem.* 2012;133(1):21-8.
2. Goulas V, Gomez-Caravaca AM, Exarchou V, Gerathanassis IP, Segura-Carretero A, Gutiérrez AF. Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *LWT-Food Sci Technol.* 2012;46(1):104-9.
3. Khodadadi S, Zabihi NA, Niazmand S, Abbasnezhad A, Mahmoudabady M, Rezaee SA. *Teucrium polium* improves endothelial dysfunction by regulating eNOS and VCAM-1 genes expression and vasoreactivity in diabetic rat aorta. *Biomed Pharmacother.* 2018;103(1):1526-30.
4. Salimnejad R, Sazegar G, Borujeni MJS, Mousavi SM, Salehi F, Ghorbani F. Protective effect of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* on diabetes-induced testicular damage and serum testosterone concentration. *Int J Reprod Biomed.* 2017;15(4):195-202.
5. Tabatabaie PS, Yazdanparast R. *Teucrium polium* extract reverses symptoms of streptozotocin-induced diabetes in rats via rebalancing the Pdx1 and FoxO1 expressions. *Biomed Pharmacother.* 2017;93(1):1033-9.
6. Shahraki MR, Arab MR, Mirimokaddam E, Palan MJ. The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats. *Iran Biomed J.* 2007;11(1):65-8.
7. Savvidou S, Goulis J, Giavazis I, Patsiaoura K, Hytiroglou P, Arvanitakis C. Herb-induced hepatitis by *Teucrium polium* L.: report of two cases and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19(6):507-11.
8. Dourakis SP, Papanikolaou IS, Tzemanakis EN, Hadziyannis SJ. Acute hepatitis associated with herb (*Teucrium capitatum* L.) administration. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002;14(6):693-5.
9. Bahramikia S, Yazdanparast R. Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytother Res.* 2012;26(11):1581-93.
10. Rafieian-Kopaei M, Nasri H, Baradaran A. *Teucrium polium*: Liver and kidney effects. *J Res Med Sci.* 2014;19(5):478-9.
11. Amraei M, Ghorbani A, Seifinejad Y, Mousavi SF, Mohamadpour M, Shirzadpour E. The effect of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* L. on the inflammatory markers and lipid profile in hypercholesterolemic rats. *J Inflamm Res.* 2018;11(1):265-72.
12. Sharifian Z, Vodgani M, Kamalinejad M. Immunological effects of *Teucrium polium* on neutrophils. *Iran J Pharm Res.* 2010;3(2):61-.
13. Khazaei M, Nematollahi-Mahani SN, Mokhtari T, Sheikhbahaei F. Review on *Teucrium polium* biological activities and medical characteristics against different pathologic situations. *J Contemp Med Sci.* 2018;4(1):1-6.
14. Sadraeisadraei H, Hajhashemi V, Ghannadi A, Mohseni M. Antispasmodic effect of aerial part of *Teucrium polium* L. essential oil on rat isolated ileum in vitro. *Med J Islam Repub Iran.* 2001;14(4):355-8.
15. Singroha R, Srivastava S, Chhikara P. Effect of Gentamicin on kidney in developing chicks. *Eur J Anat.* 2012;16(2):119-26.

16. DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu H-C, Harrington DA, Yu W, et al. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res.* 2018;8(8):1642-60.
17. Kain KH, Miller JW, Jones-Paris CR, Thomason RT, Lewis JD, Bader DM, et al. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev Dyn.* 2014;243(2):216-28.
18. Tavakkoli H, Derakhshanfar A, Moayedi J, Fard AP, Behrouz S, Piltan MA, et al. Evaluation of the toxicopathological lesions of Calotropis procera using a chick embryonic model. *Comp Clin Path.* 2019;28(1):195-202.
19. Tavakkoli H, Derakhshanfar A, Noori Gooshki S. Toxicopathological lesions of fosfomycin in embryonic model. *Eur J Exp Biol.* 2014;4(2):63-71.
20. Tavakkoli H, Derakhshanfar A, Noori Gooshki S. The effect of florfenicol egg-injection on embryonated chicken egg. *Int J Adv Biol Biomed Res.* 2014;2(2):496-503.
21. Tavakkoli H, Derakhshanfar A, Noori Gooshki S. A short preliminary experimental study on teratogenic effect of methenamine in embryonic model. *Int J Adv Biol Biomed Res.* 2013;1(12):1523-8.
22. Venditti A, Frezza C, Trancanella E, Zadeh SMM, Foddai S, Sciubba F, et al. A new natural neo-clerodane from *Teucrium polium* L. collected in Northern Iran. *Ind Crops Prod.* 2017;97(1):632-8.
23. Safaeian L, Ghanadian M, Shafiee-Moghadam Z. Antihyperlipidemic effect of different fractions obtained from *Teucrium polium* hydroalcoholic extract in rats. *Int J Prev Med.* 2018;9(1):30-5.
24. Amraei M, Ghorbani A, Seifinejad Y, Mousavi SF, Mohamadpour M, Shirzadpour E. The effect of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* L. on the inflammatory markers and lipid profile in hypercholesterolemic rats. *J Inflamm Res.* 2018;11(2018):265—72.
25. Baradaran A, Madihi Y, Merrikhi A, Rafieian-Kopaei M, Nematbakhsh M, Asgari A, et al. Nephrotoxicity of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* in Wistar rats. *Pak J Med Sci.* 2013;29(1):329-33.
26. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Nephrotoxicity of hydroalcoholic extract of *teucrium polium* in wistar rats. *J Isfahan Med School.* 2014;32(290):938-46.
27. Esen SA, Kahvecioğlu S, Gül CB, Aktaş N, Esen İ. Toxic effects of herbal medicines: *Teucrium polium* and acute kidney injury. *Eur Respir J.* 2019;5(6):1028-30.
28. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(11):1162-76.
29. Smith SM, Flentke GR. The Avian Embryo as a Model for Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Biochem Cell Biol.* 2018;96(2):98-106.



Evaluation the effects of *Teucrium polium* hydroalcoholic extract on the fetus and chorioallantoic fluid using a chick embryo model

Amin Derakhshanfar^{1,2}, Hadi Tavakkoli^{3*}, Javad Moayedi¹, Ali Poostforoosh Fard⁴

1- Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

2- Center of Comparative and Experimental Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

3- Department of Clinical Science, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

4- D.V.M., Vice Chancellery for Research Affairs, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Original Article

Received: 26 Oct 2019

Accepted: 4 Jun 2020

***Corresponding Author:**

Hadi Tavakkoli, Department of Clinical Science, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

TEL: +98 34 33222047

Email:

tavakkoli@uk.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Side effects of drugs have always been controversial issues in medical science. To date, sufficient researches were not performed on the side and pathological effects of *Teucrium polium* as an herb in the fetus. Therefore, the present study aimed to investigate the pathological effects of *Teucrium polium* hydroalcoholic extract on chorioallantoic fluid composition, weight, growth, external and internal tissues of the fetus using a chick embryo model.

Materials and Methods

A total of 48 Ross 308 embryonated eggs were randomly divided into 3 equal groups. In the first group (control), 0.5 CC of phosphate buffer saline and the second and third groups, *Teucrium polium* hydroalcoholic extract with doses of 25 and 50 mg/kg egg-weight were inoculated into the eggs. Embryos were allowed to develop until day 18 and then examined for macroscopic and microscopic lesions.

Results

Injection of e hydroalcoholic extract caused a disturbance in the weight, growth, and biochemical factors of the chorioallantoic fluid during the growth period. The most pathological effects were observed in the brain, lung, heart, liver, and kidney of the embryos which received the *Teucrium polium* hydroalcoholic extract at a dose of 50 mg/kg.

Conclusion

Teucrium polium hydroalcoholic extract can produce various pathological effects in the external organ, internal organ, and the chorioallantoic fluid. Considering the consumption of this herb in different regions of Iran, it is recommended that its usage be taken with caution, especially during pregnancy.

Keywords

Histopathology; Herbal; *Teucrium polium*; Fetus; Chick

► **Please cite this article as:** Derakhshanfar A, Tavakkoli H, Moayedi J, Poostforoosh Fard A. Evaluation the effects of *Teucrium polium* hydroalcoholic extract on the fetus and chorioallantoic fluid using a chick embryo model. J Neyshabur Univ Med Sci. 2020;8(4):136-147.