

اثرات تراتوژنیک فنی توئین بر تکوین لوله عصبی و اسکلتی جنین‌های موش سوری

بی‌بی محبوبه ترابی*^۱، دکتر عبدالحسین شیروی^۱، دکتر غلامحسن واعظی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، ایران.

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سمنان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: فنی توئین یکی از قدیمی‌ترین داروهای ضد تشنج است و مصرف آن در مادران باردار باعث افزایش ناهنجاری‌های جنینی می‌شود. در رابطه با اثرات تراتوژنیک این دارو بر تکامل لوله عصبی و اسکلتی اطلاعات کاملی در دسترس نیست. این تحقیق به منظور بررسی اثرات تراتوژنیک داروی فنی توئین جهت تعیین ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص لوله عصبی در دوره لانه‌گزینی و اندام‌سازی در موش انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش بارداری سفید کوچک آزمایشگاهی نژاد *NMRI* به سه گروه تجربی (*I*، *II*، *III*) و یک گروه شاهد تقسیم شدند. سه گروه تجربی به ترتیب دوزهای ۶۰، ۷۵، ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین محلول در سرم فیزیولوژی و گروه شاهد سرم فیزیولوژی را به صورت داخل صفاقی با حجم تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر در روزهای ۶/۵ تا ۱۴/۵ حاملگی در ساعت ۷ صبح دریافت کردند. موش‌ها در روز ۱۸/۵ حاملگی تشریح شده و جنین‌ها از نظر نقایص سیستم اسکلتی مورد مطالعه قرار گرفتند. سپس جنین موش‌ها به روش الیزارین قرمز / آلیسان آبی رنگ آمیزی شدند و جنین‌ها از نظر میزان بروز نقایص لوله عصبی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری *Spss* و آزمون‌های *Anova*، *T-test* و *Tukey* تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در هر سه گروه تجربی *I*، *II* و *III* اختلالاتی به صورت ناهنجاری‌هایی در سیستم اسکلتی مشاهده شد ناهنجاری‌های اسکلتی عمدتاً به صورت اختلال در شکل و جابه‌جایی در اندام‌ها بود که از نقطه نظر آماری در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد ($p < 0.05$)، همچنین در گروه تجربی *III* نقایص لوله عصبی به صورت اسپینابی‌فدا بروز نمود که در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد استفاده از داروی فنی توئین طی مراحل ارگانوژنز موش می‌تواند ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص لوله عصبی را القاء نماید.

واژگان کلیدی: فنی توئین، تراتوژن، نقایص لوله عصبی، ناهنجاری‌های اسکلتی.

مقدمه

به تراتوژن‌ها، آسیب‌پذیرتر از سایر مراحل هستند. تراتوژن‌زیس شامل نقایص عملکردی و ساختاری است که می‌تواند در برگزیده مرگ یک نوزاد، قبل و یا مدت کوتاهی پس از تولد باشد. هر دو مورد نقایص ساختاری و عملکردی به تغییرات دائمی در کودکی که درون رحم مادر و در معرض یک عامل تراتوژن قرار گرفته منجر می‌شود. عواملی که باعث ایجاد ناهنجاری می‌شوند تراتوژن نامیده می‌شوند. برخی از تراتوژن‌ها از سد جفتی عبور کرده و بر دوره‌های تکوینی تاثیر سوء می‌گذارد و سبب ایجاد ناهنجاری

تراتولوژی شاخه‌ای از علم جنین‌شناسی است که به مطالعه علل، مکانیسم‌ها و الگوی تکوین غیرطبیعی می‌پردازد. موضوع اساسی در تراتولوژی این است که مراحل خاصی از تکوین رویانی نسبت

آدرس نویسنده مسئول: دامغان، گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، بی‌بی محبوبه

ترابی (e-mail: torabi_mahboobeh@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۳/۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۶/۳

می‌شود. هر چند به عنوان دارو ممکن است باعث بهبود حال عمومی مادر شوند. اما برای جنین سمی بوده و باعث تأثیرات متعددی می‌شوند (۲،۱). نقص‌های تکوینی یک مشکل اساسی است. به طوری که در ایالات متحده ۳-۵٪ جنین‌ها دارای نقص‌های مادرزادی می‌باشند، تقریباً ۳-۲٪ نقص‌های مادرزادی مربوط به عوامل تراتوژن هستند (۳). از جمله عوامل تراتوژن که مورد توجه قرار گرفته‌اند داروهای ضد صرع (AED) می‌باشد (۴). یکی از مؤثرترین داروهای ضد صرع که مورد استفاده فراوان قرار می‌گیرد، داروی فنی توئین است. فنی توئین قدیمی‌ترین داروی ضد صرع غیر آرام بخشی است که در سال ۱۹۳۸ به دنبال بررسی‌های سیستماتیک ترکیباتی مثل فنوباریتال که باعث تغییراتی در حملات تشنجی ناشی از جریان الکتریسیته در حیوانات آزمایشگاهی می‌شوند ساخته شد. این دارو قبلاً با نام دی فنیل هیدانتوئین خوانده می‌شد. از لحاظ ساختمان شیمیایی فنی توئین یک هیدانتوئین با استخلاف دی فنیل می‌باشد. فنی توئین در چندین سیستم فیزیولوژیک اثرات مهمی اعمال می‌کند. این دارو انتقال یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم، پتانسیل غشاء و غلظت اسیدهای آمینه و ناقل‌های عصبی نوراپی نفرین، استیل کولین و GABA را تغییر می‌دهد. جذب فنی توئین سدیم از دستگاه گوارش تقریباً کامل است. مصرف مزمن فنی توئین ممکن است در متابولیسم ویتامین D اختلال ایجاد کرده و سبب استئومالاسی شود (۷-۵). علی‌رغم مطالعات متعدد، مساله تراتوژن بودن داروهای ضد صرع و مواد شیمیایی در دوزها و روزهای خاص هنوز به عنوان یک معضل در جامعه پزشکی زنان و مامایی مطرح می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی عوارض ناهنجاری زایی داروی فنی توئین به صورت آزمایشگاهی و با روش تزریق داخل صفاقی و در روزهای ارگانوژنز بر روی جنین موش انجام شد تا گامی مهم در جهت تعیین ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص لوله عصبی در روزهای ارگانوژنز و دوزهای مشخص این دارو باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، جهت انجام تحقیق تعداد ۴۰ سر موش ماده سفید کوچک آزمایشگاهی از نژاد NMRI با میانگین سنی ۲/۵ ماه و وزن تقریبی 30 ± 2 گرم از انسیتیتو پاستور کرج خریداری شده و به منظور تطابق با محیط جدید به مدت دو هفته در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 24 ± 2 درجه سانتیگراد، رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد و تغذیه

با غذای استاندارد نگهداری شده و آب و غذای کافی در دسترس داشتند. سپس جهت جفت‌گیری، ۲ سر موش ماده به همراه یک سر موش نر به مدت یک شب در داخل قفس قرار داده شد و سپس ۱۲ ساعت بعد موش‌ها از نظر ایجاد پلاک واژینال بررسی شده و جهت دقیق بودن زمان حاملگی موش‌ها نر و ماده مجدداً از هم جدا می‌شدند. تاریخ مشاهده پلاک واژینال از نظر زمان حاملگی روز نیم (GD0/5) تلقی گردید. موش‌های ماده با پلاک واژنی در چهار گروه ۱۰ تایی که شامل سه گروه تجربی I، II و III و یک گروه شاهد بودند دسته‌بندی شدند. گروه تجربی I، II و III به ترتیب مقادیر 60 mg/kg/day ، 75 mg/kg/day ، 90 mg/kg/day را از روز شش‌ونیم (GD6/5) لغایت روز چهارده‌ونیم (GD14/5) دوره بارداری به صورت درون صفاقی و با حجم تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر در ساعت ۷ صبح دریافت کردند و گروه کنترل نرمال سالیان را در همین دوران به همان حجم داروهای تزریق شده در دریافت کردند. موش‌ها در روز ۱۸/۵ حاملگی تشریح شده، جنین‌ها پس از پاره کردن کیسه آمیون آزاد و با سرم فیزیولوژی شست و شو داده شده سپس میزان ناهنجاری‌های سیستم اسکلتی توسط میکروسکوپ تحقیقاتی استریو مدل Nikon C-LEDS مورد بررسی قرار گرفتند و نقایص لوله عصبی جنین‌ها را با استفاده از رنگ آمیزی دو بل آلیزارین رداس و آلسیان بلو و بر اساس روش Inouy (۸) و Kimmel-Trammel (۹) با تغییراتی جزئی مورد بررسی قرار دادیم. در این رنگ آمیزی ابتدا جنین‌ها با اتانول ۷۰٪ فیکس شدند و سپس پوست آنها گرفته شد و پس از پوست‌کندن و خارج نمودن احشاء در الکل ۹۵٪ فیکس شدند. جهت زدوده شدن چربی بافتها جنین‌ها را در داخل استن مطلق قرار دادیم. سپس نمونه‌ها در محلول آلیزارین قرمز (تهیه شده از شرکت Merk) و آلسیان بلو (تهیه شده از شرکت Merk) به مدت سه روز و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار داده شد و به منظور شفاف نمودن، نمونه‌ها را در محلول KOH و گلیسرین قرار داده شد (شکل ۱). پس از شفاف سازی میزان بروز نقایص لوله عصبی توسط میکروسکوپ تحقیقاتی استریو مورد مطالعه قرار گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص لوله عصبی در جنین‌های گروه‌های مورد آزمایش از آزمون‌های T-test و ANOVA استفاده شد. پودر خالص فنی توئین از شرکت داروسازی لقمان تهیه شد.

یافته‌ها

از ۱۱۶ جنین مربوط به گروه تجربی I، ۵۹ جنین (۵۰/۸۶ درصد) دارای ناهنجاری‌های مختلف اسکلتی بودند (جدول ۱). ناهنجاری‌های اسکلتی به صورت اختلال در شکل، جابه‌جایی در اندام‌های فوقانی و تحتانی و انحنای غیرطبیعی در ستون مهره‌ها دیده شد (شکل ۲). در گروه تجربی I، نقایص لوله عصبی (NTD) مشاهده نشد.

از تعداد کل ۱۰۷ جنین مربوط به گروه تجربی II، ۳۵ جنین (۳۲/۷۱ درصد) دارای ناهنجاری‌های مختلف اسکلتی بودند. در این گروه میزان ناهنجاری‌های اسکلتی به صورت اختلال در شکل، جابه‌جایی در اندام‌های فوقانی و تحتانی و انحنای غیرطبیعی در ستون مهره‌ها دیده شد. در گروه تجربی II نقایص لوله عصبی (NTD) مشاهده نشد. از تعداد کل ۱۰۰ جنین مربوط به گروه تجربی III، ۵۶ جنین (۵۶/۰ درصد) دارای ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص لوله عصبی بودند.

جدول ۱- بروز ناهنجاری اسکلتی و نقایص لوله عصبی ایجاد شده در جنین موش‌های NMRI تحت تأثیر داروی فنی‌توئین درصد (%) بروز ناهنجاری‌ها در هر گروه آزمایشی

شاهد - تجربی I	تجربی II	تجربی III	نرمال سالین	
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	موش باردار تعداد
۰	۷۵	۶۰	۰	مقدار تزریق فنی‌توئین - mg/kg/day
۱۲۲	۱۰۷	۱۰۰	۱۰۰	جنین‌ها تعداد
۵۹ [‡] (۵۰/۸۶)	۳۵ [‡] (۳۲/۷۱)	۵۶ [‡] (۵۶)	۰	جنین‌های تعداد (درصد) ناهنجار
۵۹ [‡] (۵۰/۸۶)	۳۵ [‡] (۳۲/۷۱)	۵۲ [‡] (۵۲)	۰	ناهنجاری - تعداد (درصد) های اسکلتی
۰	۰	۷ [*] (۷)	۰	نقایص لوله تعداد (درصد) عصبی

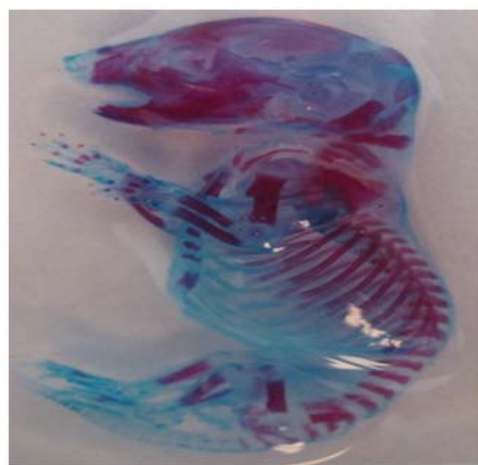
*نمایانگر $p < 0.05$ ، †نمایانگر $p < 0.01$ ، ‡نمایانگر $p < 0.001$



شکل ۲- جنین تجربی I دارای اختلال در شکل اندام‌های فوقانی (فلش) می‌باشد (مقدار ۶۰ mg/kg/day فنی‌توئین).

در این گروه میزان ناهنجاری‌های اسکلتی به صورت اختلال در شکل، جابه‌جایی در اندام‌های فوقانی و تحتانی و انحنای غیرطبیعی در ستون مهره‌ها (۵۲/۰ درصد) از میزان نقایص لوله عصبی (۷/۰ درصد) بیشتر بود (شکل ۳). نقایص لوله عصبی در این گروه به صورت اسپینابیفیدار ناحیه سینه‌ای ستون مهره‌ها دیده شد.

در ۱۲۰ جنین مربوط به گروه کنترل هیچ‌گونه ناهنجاری‌های فوق مشاهده نشد. اختلاف موجود در بین ناهنجاری‌های اسکلتی ایجاد شده در بین سه گروه تجربی I، II و III با گروه شاهد از نظر آماری افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). نقایص لوله عصبی ایجاد شده در بین گروه تجربی III و شاهد از نقطه نظر آماری معنی‌دار بود.



شکل ۱- جنین رنگ آمیزی شده با آلیزارین رداس و آلسیان بلو در گروه کنترل. بخش‌هایی از استخوان که قرمز رنگ گرفته‌اند نشانگر بخش استخوانی شده و دارای املاح کلسیم است و بخش‌هایی که آبی رنگ گرفته‌اند نشانگر بخش غضروفی است.

سطح سرمی آمینواسید متیونین در موش‌های تحت درمان با لاموتریزین پی بردند (۱۵). این آمینواسید یکی از آمینواسیدهای ضروری بوده و کاهش سطح سرمی آن منجر به بروز ناهنجاری از جمله نقص لوله عصبی در جنین می‌گردد. حتی در تحقیقی که بر روی انسان انجام گرفت مشاهده شد در مادرانی که جنینی با ضایعه NTD دارند سطح سرمی این ماده در پلاسمای خون و مایع آمنیوتیک کاهش محسوسی داشته است (۱۶). بنابر تحقیقات انجام شده شاید بتوان ناهنجاری‌هایی از جمله NTD که در اثر مصرف داروی فنی توئین ایجاد شده توسط مکانیسم‌های بالا توجیه نمود، ولی این موضوع نیاز به بررسی بیشتر و دقیق‌تری دارد.

طیف دیگری از ناهنجاری‌ها که در جنین‌های گروه تجربی III مشاهده شده عمدتاً شامل عدم چرخش صحیح اندام‌ها و کوتاهی اندام‌های فوقانی و تحتانی بود. مشابه همین ناهنجاری‌ها در گروه تجربی I و II دیده شد. این مسأله نشان می‌دهد که داروی فنی توئین اگر در زمان لانه‌گزینی و اوایل اندام‌سازی مصرف گردد، می‌تواند سبب اختلالات بسیار شدیدی در استخوان‌سازی گردد. Ahn و Chang در سال ۱۹۹۴ با بررسی تأثیر داروهای فنی توئین و فنوباربیتال دریافتند که مدت تجویز دارو در تأثیر آن بر روی چگالی مواد معدنی اهمیت دارد. به طوری که در کودکانی که به مدت طولانی دارو دریافت نموده بودند چگالی مواد معدنی در استخوان به طور معنی داری تغییر نموده بود (۱۷). همچنین تحقیقات نشان می‌دهد اختلالات اسکلتی در جنین‌هایی که مادران شان در دوران بارداری برخی از داروهای ضدصرع از جمله فنی توئین را دریافت نموده‌اند را می‌توان به نقش این دارو در متابولیسم کلسیم، ویتامین D و فسفاتاز قلیایی نسبت داد، ویتامین D در جذب Ca و دفع فسفات نقش دارد و کمبود آن منجر به کاهش رسوب املاح کلسیم در حین استخوان‌سازی خواهد شد (۲۰-۱۸).

در نهایت آنچه از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت این است که مصرف داروی فنی توئین در دوران بارداری و هم‌زمان با دوران ارگانوژنز می‌تواند دارای پتانسیل ناهنجاری‌زایی بر روی ستون مهره‌های جنین باشد و باعث اختلال در رشد و تکامل اسکلت جنین شود. همچنین می‌تواند منجر به القاء نقایص لوله عصبی گردد.

جهت بررسی بیشتر اثرات دارو و یافتن مکانیسم اثر آن لازم است تحقیقات بیشتری انجام شود و از آنجایی که مطالعات قبلی به کاهش فولات و متیونین، تغییر در متابولیسم Ca و ویتامین D به دنبال مصرف این دارو اشاره دارد پیشنهاد



شکل ۳- جنین تجربی III با انحنای غیرطبیعی در ستون مهره‌ها (موش سمت چپ) در مقایسه با گروه کنترل (موش سمت راست) (مقدار ۹۰ mg/kg/day فنی توئین).

بحث

با توجه به تحقیق انجام شده، مصرف فنی توئین در دوران بارداری را می‌توان به عنوان یک فاکتور خطر برای تکامل و رشد جنین دانست که مصرف آن در دوران ارگانوژنز می‌تواند باعث بروز ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص لوله عصبی در جنین موش سوری شود. به طوری که ناهنجاری‌های اسکلتی در هر سه گروه تجربی دریافت کننده فنی توئین مشاهده شد ولی نقایص لوله عصبی تنها در گروه تجربی III مشهود بود.

مطالعات نشان می‌دهند وزن مولکولی کم این دارو وعدم توانایی اتصال آن با پروتئین‌های پلاسما، احتمال عبور این دارو را از سد جنینی قوت می‌بخشد (۱۱،۱۰) و بدین صورت می‌تواند باعث تأثیر بر جنین و بروز ناهنجاری شود. اما مکانیسم اثر این دارو در بروز ناهنجاری‌ها دقیقاً مشخص نیست. در تحقیق حاضر، از جمله ناهنجاری‌های مشاهده شده NTD بود که در گروه تجربی III به صورت اسپینابیفدا در ناحیه‌ی مهره‌های سینه‌ای بروز نمود. تحقیقات نشان می‌دهند یکی از دلایل مهم نقص لوله عصبی می‌تواند کاهش غلظت اسید فولیک سرم خون باشد (۱۲). اسید فولیک یا فولات یک کوآنزیم مهم است که برای تکامل گلبول‌های قرمز و سفید و بهبود عملکرد سیستم عصبی لازم می‌باشد. کاهش غلظت فولات به هر دلیلی می‌تواند باعث بروز ناهنجاری از جمله NTD گردد (۱۴،۱۳). بر طبق تحقیقات قبلی و اطلاعات موجود، فنی توئین باعث کاهش فولات سرم خون جنینی می‌شود (۱۵). Bastaki, Padmanabhan و همکارانش در تحقیقات خود به کاهش

می‌گردد در مورد تاثیرات پروفلاکتیک اسیدفولیک، متیونین، ویتامین D، ویتامین E و دوزهای مختلف آنها مطالعات گسترده‌ای صورت گیرد.

از مسئولین محترم شرکت داروسازی لقمان به ویژه جناب آقای مهندس علینقی و آقای دکتر عبدالله نژاد و سرکار خانم مهندس فلورا دوستی که با دراختیار گذاشتن ماده فنی توئین در انجام این طرح ما را یاری کردند، نیز قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

REFERENCES

1. O'rahilly R, Müller F, Editors. Human embryology and teratology. New York: Wiley-liss; 1996.
2. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, Editors. The developing human: clinically oriented embryology. Philadelphia: Saunders; 1998.
3. Mahabady MK, Varzi HN. A Comparison study of effects of vitamin E and silymarin on phenytoin- induced cleft palate in rats. J Biol Sci 2009; 9: 381-84.
4. Abdulrazzaq YM, Bastaki SM, Padmanabhan R. Teratogenic effects of vigabatrin in TO mouse fetuses. Teratology 1997; 55: 165-76.
5. Adams HR, Editor. Veterinary pharmacology and therapeutics. New York: Wiley-Blackwell; 2001.
6. Berkowitz B, Katzung B, Editors. Basic and clinical pharmacology. New York: McGraw-Hill; 2004.
7. Roberts RJ, Editor. Fish pathology. UK: Elsevier Health Sciences; 2001.
8. McLeod MJ. Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. Teratology 1980; 22: 299-301.
9. Kimmel CA, Trammell C. A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. Stain Techno 1981; 56: 271-73.
10. Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. Drugs in pregnancy and lactation. Am J Maternal/Child Nursing 1987; 12: 440.
11. McLean MJ, Gidal BE. Gabapentin dosing in the treatment of epilepsy. Clin Ther 2003; 25:1382-406.
12. Yerby MS, Kaplan P, Tran T. Risks and management of pregnancy in women with epilepsy. Cleve Clin J Med 2004; 71: S25-37.
13. Lindhout D. Pharmacogenetics and drug interactions: role in antiepileptic-drug-induced teratogenesis. Neurology 1992; 42: 43-47.
14. Richens A. Safety of lamotrigine. Epilepsia 1994; 35: S37-40.
15. Padmanabhan R, Abdulrazzaq YM, Bastaki SM, Shafiullah M, Chandranath SI. Experimental studies on reproductive toxicologic effects of lamotrigine in mice. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2003 ;68:428-38.
16. Minns RA. Folic acid and neural tube defects. Spinal Cord 1996; 34:460-5.
17. Chung S, Ahn C. Effects of anti-epileptic drug therapy on bone mineral density in ambulatory epileptic children. Brain Dev 1994; 16:382-85.
18. Farhat G, Yamout B, Mikati M, Demirjian S, Sawaya R, Fuleihan GEH. Effect of antiepileptic drugs on bone density in ambulatory patients. Neurology 2002; 58:1348-53.
19. Schmitt B, Nordlund D, Rodgers L. Prevalence of hypocalcemia and elevated serum alkaline phosphatase in patients receiving chronic anticonvulsant therapy. J Fam Pract 1984; 18:873.
20. Voudris K, Moustaki M, Zeis PM, Dimou S, Vagiakou E, Tsagris B, et al. Alkaline phosphatase and its isoenzyme activity for the evaluation of bone metabolism in children receiving anticonvulsant monotherapy. Seizure 2002;11:377-80.