

Effects of Galbanum Essential Oil and Mesna on Skeletal Teratogenicity Induced by Cyclophosphamide in Rat Fetuses

Mahmood Khaksary Mahabdy¹,
Hossein Najafzadeh Varzi²,
Mohsen Taghizadeh³,
Mehrsa Nemati⁴

¹ Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

³ Associate Professor, Department of Nutrition, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

⁴ Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

(Received July 21, 2015 Accepted November 14, 2015)

Abstract

Background and purpose: Cyclophosphamide (CP) as a teratogen can lead to congenital abnormalities in animals and humans. Many reports have shown the influence of antioxidant drugs in reducing the adverse effects of CP. Galbanum has antioxidant effects and Mesna (Sodium 2-mercaptoethane sulfonate) is used for decreasing the side effects of CP, especially hemorrhagic cystitis. This study aimed at investigating the effects of galbanum and mesna on cyclophosphamide-induced teratogenicity in rat fetuses.

Materials and methods: This study was performed in 33 pregnant rats that were divided into five groups. A control group received normal saline and test groups received CP (15 mg/kg), CP plus mesna (100 mg/kg), CP plus galbanum (200 mg/kg) and CP plus mesna (100 mg/kg) plus galbanum (200 mg/kg) intraperitoneally on the 13th day of gestation, respectively. Fetuses were extracted on 20th day of gestation. Then, the weight and length of fetuses were measured and staining was done using Alizarin red - Alcian blue method. The teratogenic effects were investigated by stereomicroscope.

Results: The results showed that the incidence of cleft palate, exencephaly, micromelia, and omphalocele were 37.50%, 62.50%, 16.62%, and 9.37% in fetuses that received only CP which decreased to 28.57%, 28.57%, 3.57%, and 7.14% in the group that had received CP plus mesna (75 mg/kg) and to 18.51%, 14.81%, 3.7%, and 0% in the group which received CP plus galbanum (200 mg/kg), respectively. In treatment group that received CP plus mesna and galbanum the incidence of aforementioned abnormalities decreased to 18.64%, 11.86%, 3.38%, and 0%, respectively.

Conclusion: In this study galbanum significantly decreased teratogenicity induced by CP.

Keywords: cyclophosphamide, galbanum, skeletal teratogenicity, rat

اثر اسانس باریجه و مسنا بر ناهنجاری های اسکلتی ناشی از سیکلوفسفامید در جنین موش صحرایی

محمود خاکساری مهابادی^۱
حسین نجف زاده ورزی^۲
محسن تقی زاده^۳
مهرسا نعمتی^۴

چکیده

سابقه و هدف: اثرات تراژونیک سیکلوفسفامید منجر به ناهنجاری های مادرزادی در انسان و حیوانات می شود. گزارشات وجود دارد که اثرات سیکلوفسفامید به وسیله آنتی اکسیدان ها کاهش می یابد. به نظر می رسد که باریجه اثر آنتی اکسیدانی داشته باشد و در مطالعات متعدد اثرات آنتی اکسیدانی باریجه به اثبات رسیده است. هم چنین مسنا (سدیم ۲ مرکاپتو اتان سولفانات) برای کاهش عوارض جانبی سیکلوفسفامید به ویژه التهاب خونریزی دهنده مثانه استفاده می شود. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات باریجه و مسنا روی ناهنجاری های ناشی از سیکلوفسفامید در جنین موش صحرایی بود.

مواد و روش ها: این مطالعه روی ۳۳ سر موش صحرایی آبیستن انجام شد. موش ها به ۵ گروه تقسیم شدند و در روز سیزدهم آبستی به گروه اول (گروه کنترل) نرمال سالین هم حجم سیکلوفسفامید و به گروه های دیگر به ترتیب سیکلوفسفامید به تنهایی با دوز ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، سیکلوفسفامید همراه با مسنا با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، سیکلوفسفامید همراه با باریجه با دوز ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و سیکلوفسفامید همراه با مسنا و باریجه به روش داخل صفاقی تجویز شد. در روز بیستم آبستی، جنین ها از رحم خارج شدند و پس از تعیین طول و وزن جنین ها، مورد رنگ آمیزی آلزارین قرمز آلسین آبی قرار گرفته و ناهنجاری ها به وسیله استریومیکروسکوپ مشخص گردیدند.

یافته ها: نتایج نشان داد، درصد ناهنجاری های شکاف کام، انژنسفالی، میکرومیلیا و امفالوسل در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به تنهایی به ترتیب ۳۷/۵۰، ۶۲/۵۰، ۱۶/۶۲ و ۹/۳۷ درصد بود که درصد این ناهنجاری ها در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه با مسنا با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به ترتیب ۲۸/۵۷، ۲۸/۵۷، ۳/۵۷ و ۷/۱۴ درصد و در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه با باریجه با دوز ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به ترتیب به ۱۸/۵۱، ۱۴/۸۱، ۳/۷۰ و صفر درصد بود. در حالی که این درصدها در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه مسنا و باریجه به ۱۸/۶۴، ۱۱/۸۶، ۳/۳۸ و صفر درصد بود.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باریجه به طور معنی داری وقوع ناهنجاری های ناشی از سیکلوفسفامید را کاهش می دهد.

واژه های کلیدی: سیکلوفسفامید، باریجه، ناهنجاری اسکلتی، موش صحرایی

مقدمه

نقایص تکاملی هنوز یکی از مشکلات مهم بهداشتی محسوب می شود و در آمریکا ۳ تا ۵ درصد نوزادان به

مواجهه جنین با مواد شیمیایی از جمله داروها ممکن است منجر به ناهنجاری های جنینی یا سقط گردد(۱).

Email: mkhaksarymahabady@yahoo.com

مؤلف مسئول: محمودی خاکساری مهابادی - اهواز: دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

۱. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳. دانشیار، گروه تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

۴. دانش آموز دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۵/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۲۳

دنيا آمده دچار نقايص تکاملی هستند. تخمين زده شده است که ۷ تا ۱۰ درصد ناهنجاری های آناتوميکی در انسان مربوط به داروها، ويروس ها و عوامل محیطی می باشد (۲) که در حدود ۱ درصد آن ها به مصرف دارو در دوره آستنی بر می گردد (۳). اگر چه تقريباً ۴۰ ماده به عنوان تراوتوزن برای جنين انسان معرفی می شوند، اما داروهای بسیار زیادی در حيوانات آزمایشگاهی ناهنجاری های جنینی ایجاد می کنند. داروهای مانند والپروئیک اسید (۱)، متیل نیتروزاوره (۴) و سیکلوفسفامید (۵) از جمله شناخته شده ترین داروهای تراوتوزنیک در انسان و حیوانات می باشند. سیکلوفسفامید دارویی پر مصرف در درمان سرطان می باشد و هم چنین به عنوان یک داروی تضعیف کننده دستگاه ایمنی برای جلوگیری از رد پیوند استفاده می شود. این دارو در جنين موش در یکی از روزهای ارگانوتز مانند روز دهم یا سیزدهم باعث ایجاد ناهنجاری های مختلف اسکلتی از جمله شکاف کام، نقايص اندام ها و آگرنسفالی می شود (۸-۶). یکی از مکانیسم های تراوتوزنی در بدن ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد که نقش مهمی در پاتوتوزن نقايص زمان تولد شامل ناهنجاری های اسکلتی، نقايص اندام ها و لوله عصبی، شکاف لب و شکاف کام دارد. یکی از داروهای مهمی که از این طریق باعث اثرات تراوتوزنیک می شود سیکلوفسفامید می باشد (۹). با توجه به عوارض این دارو به خصوص ناهنجاری زایی آن که در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است، لذا پیشگیری از این عوارض می تواند استفاده از این دارو را در بیماران امکان پذیر نماید. برخی از عوارض سیکلوفسفامید از قبیل سمیت دستگاه ادراری را می توان به وسیله داروهای دارای گروه تیول از جمله ۲- مرکاپتواتان سولفانات (مسنا) بدون تاثیر در اثر بخشی سیکلوفسفامید کاهش داد. Vieira و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر مسنا به همراه دگزامتازون در کاهش سیستمیت هموراژیک ناشی از ایزوفسفامید در موش صحرایی را بررسی کردند و نشان دادند که مسنا در ترکیب فوق اثر مفیدی دارد (۱۰). مسنا دی سولفید در

کلیه احیاء می شود و به مسنا تبدیل می گردد. وزن مولکولی مسنا ۱۶۴/۱۸ دالتون بوده و در گروه B داروهای مصرفی در زمان حاملگی قرار دارد. مسنا به منظور پیشگیری از سیستمیت هموراژیک و سمیت کلیوی در بیماران تحت درمان با ایفوسفامید و سیکلوفسفامید مصرف می شود (۱۱).

باریجه گیاهی از تیره چتریان است و نام علمی آن فریولا گاموزا بویسس و مترادف آن فریولا گالباتنی فلوا بویسس می باشد. باریجه ضد نفخ، ضد تشنج، ترمیم کننده زخم های سطح بدن، تسکین دهنده درد به ویژه دردهای روماتیسمی بوده و جهت بر طرف کردن ضعف معده و درمان بیماری های عصبی توصیه شده است. هم چنین باریجه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی (۱۲) بوده و به عنوان جمع آوری کننده رادیکال های آزاد عمل می کند (۱۳). با توجه به این که یکی از مکانیسم های تراوتوزنی سیکلوفسفامید ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد و از آنجایی که تاکنون مقایسه تأثیر اسانس باریجه و مسنا بر ناهنجاری های اسکلتی ناشی از سیکلوفسفامید در جنين موش صحرایی بررسی نشده بود، لذا در این مطالعه نقش اسانس باریجه و مسنا در کاهش یا پیشگیری از ناهنجاری های اسکلتی ناشی از سیکلوفسفامید در جنين موش صحرایی ارزیابی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش های صحرایی نژاد ویستار تهیه شده از مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز استفاده شد. موش های صحرایی نر و ماده حدود ۲ هفته به منظور تطابق با محیط در مرکز تحقیقات به طور مجزا از یکدیگر نگهداری شدند. مرکز تحقیقات تحت شرایط ۲۲-۲۰ درجه سانتی گراد حرارت، و دوره ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی بود. موش های صحرایی در سن تقریباً ۱۲ هفتگی و هم چنین دارای میانگین وزنی ۲۰۰-۱۸۰ گرم در شرایط یکسان تغذیه و

برای بررسی ناهنجاری‌های ظاهری و اسکلتی ناشی از سیکلوفسفامید و اثرات احتمالی مسنا و باریجه مراحل زیر انجام گرفت:

الف- جنین‌ها از نظر ناهنجاری‌های ظاهری از قبیل آگزوسفالی و امفالوسل، در نواحی مختلف بدن ارزیابی شدند و وزن و طول جنین با ترازو و کولیس اندازه‌گیری شده و تعداد جنین‌های زنده و جذب شده تعیین گردید.

ب- مطالعه سیستم اسکلتی جنین‌ها با روش رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلیسین آبی انجام پذیرفت (۱۵). نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی بدین صورت است که مناطق غضروفی آبی‌رنگ و مناطق استخوانی قرمز رنگ می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی کامل، جنین‌ها به کمک دستگاه استریومیکروسکوپ از نظر ناهنجاری‌های ناهنجاری کام (از نظر وجود شکاف کامی)، ناهنجاری ستون مهره (از نظر شکل و مورفولوژی قوس‌های مهره‌ها)، ناهنجاری جناغ (از نظر شکل و استخوانی شدن طبیعی آن‌ها) و ناهنجاری اندام‌ها (از نظر شکل و استخوانی شدن طبیعی آن‌ها) بررسی شدند. نتایج به دست آمده از گروه‌های مختلف آزمایشی با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس آزمون توکی جهت تعیین اختلاف میانگین وزن و طول جنین‌ها مقایسه شدند. به علاوه وجود و عدم وجود ناهنجاری‌های ذکر شده در گروه‌های فوق با آزمون آماری مربع کای مقایسه شدند. تفاوت میانگین‌ها با $p \leq 0.05$ معنی‌دار تلقی شد و اثر مسنا و باریجه در کاهش یا پیشگیری از ناهنجاری‌های سیکلوفسفامید مشخص گردید.

یافته‌ها

- نتایج استحصال جنین‌ها

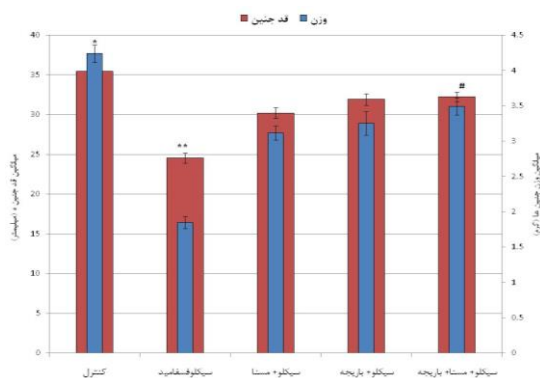
بررسی آماری نتایج نشان داد که درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت‌کننده‌ی نرمال سالی‌ن به صورت معنی‌دار ($p < 0.001$) کم‌تر از سایر گروه‌ها بود. هم‌چنین درصد جنین‌های جذب شده در گروه

محیط نگهداری شدند. موش‌های صحرایی از آب لوله‌کشی شهر و غذای فشرده ساخت کارخانه خوراکی دام پارس تهران استفاده کردند. برای انجام عمل جفت‌گیری موش‌های صحرایی، هر سه سر موش‌های صحرایی ماده با یک سر موش‌های صحرایی نر در ساعت ۲۰ شب در کنار همدیگر قرار داده شدند و روز بعد با مشاهده پلاک واژنی، روز صفر حاملگی محاسبه گردید. موش‌های صحرایی آبستن به صورت اتفاقی در پنج گروه به طور معجزا نگهداری شدند. ویژگی‌های گروه‌ها به شرح زیر می‌باشد:

گروه اول: در روز سیزدهم آبستنی به موش‌های آبستن این گروه هم حجم سیکلوفسفامید، سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی تجویز شد (گروه کنترل). گروه دوم: در روز سیزدهم آبستنی به موش‌های آبستن این گروه سیکلوفسفامید به میزان ۱۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۸). گروه سوم: سیکلوفسفامید به میزان ۱۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه مسنا با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۱۰). گروه چهارم: سیکلوفسفامید به میزان ۱۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه باریجه با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۱۴). گروه پنجم: سیکلوفسفامید به میزان ۱۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه مسنا با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن و باریجه با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد. سیکلوفسفامید و مسنا از شرکت Baxter آلمان و اسانس باریجه با Batch no.P6-92.13 از شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان تهیه شد. در روز بیستم آبستنی تمامی موش‌های دریافت‌کننده دارو به وسیله اتر آسان‌کشی شدند و پس از باز کردن محوطه شکمی و برش شاخ رحم، جنین‌ها از رحم موش مادر خارج شدند. بلافاصله جنین‌ها از کیسه آمیون خارج شدند و

دریافت کننده سیکلوفسفامید به تنهایی، با سایر گروه‌ها به استثنای گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا به صورت معنی دار ($p < 0/001$) بیش تر بود. درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه اختلاف معنی داری ($p = 0/08$) را نشان نداد و هم چنین درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه اختلاف معنی داری ($p = 0/10$) را نشان نداد (جدول شماره ۱).

سایر گروه‌ها بود ($p < 0/001$). هم چنین میانگین وزن جنین‌ها در گروه دریافت کننده نرمال سالین $4/23 \pm 0/12$ گرم بوده است که در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید این میانگین کاهش معنی داری پیدا کرد ($p > 0/001$) و این میانگین به $1/84 \pm 0/08$ گرم رسید. میانگین وزن جنین در گروه‌های دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه مسنا، سیکلوفسفامید همراه باریجه و سیکلوفسفامید همراه مسنا و باریجه به ترتیب $3/11 \pm 0/09$ ، $3/25 \pm 0/16$ و $3/49 \pm 0/11$ گرم محاسبه شد. تجویز سیکلوفسفامید به تنهایی باعث کاهش وزن همه جنین‌ها گردید، به طوری که این کاهش در مقایسه با سایر گروه‌ها از نظر آماری معنی دار بوده است ($p < 0/001$). میانگین وزن جنین در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه ($p = 0/51$) اختلاف معنی داری را نشان نداد (نمودار شماره ۱). هم چنین میانگین وزن جنین در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه ($p = 0/18$) نیز اختلاف معنی داری را نشان نداد (نمودار شماره ۱).



نتایج نشان داد که درصد جنین‌های زنده در گروه دریافت کننده نرمال سالین به صورت معنی دار ($p < 0/001$) بیش تر از سایر گروه‌ها بود. هم چنین درصد جنین‌های زنده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به تنهایی، با سایر گروه‌ها به استثنای گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا به صورت معنی دار ($p < 0/001$) کم تر بود. هم چنین درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه اختلاف معنی داری ($p = 0/10$) را نشان نداد (جدول شماره ۱).

نتایج وزن جنین‌ها میانگین (\pm خطای استاندارد) وزن جنین در گروه دریافت کننده نرمال سالین به طور معنی داری بیش تر از

نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین \pm خطای استاندارد وزن (گرم) و طول (میلی متر) در جنین‌های مختلف تحت مطالعه

* - نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) بین وزن و قد جنین گروه کنترل با سایر گروه‌ها می‌باشد.

** - نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) بین قد جنین گروه سیکلوفسفامید با سایر گروه‌ها می‌باشد.

- نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) بین وزن جنین گروه سیکلوفسفامید + مسنا با سیکلوفسفامید + مسنا + باریجه می‌باشد.

جدول شماره ۱: درصد جنین‌های زنده و جذب شده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه‌ها	موش صحرایی آیستن	جنین زنده (درصد)	جنین جذب شده (درصد)
کنترل	۷	۴۹ (۹۶/۰۸) ^a	۲ (۳/۹۲) ^a
سیکلوفسفامید	۷	۳۲ (۵۹/۲۶) ^b	۲۲ (۴۰/۷۴) ^b
سیکلوفسفامید + مسنا	۶	۲۸ (۶۰/۸۷) ^b	۱۸ (۳۰/۱۳) ^{bc}
سیکلوفسفامید + باریجه	۵	۲۷ (۶۱/۰۵) ^c	۱۱ (۲۸/۹۵) ^{dc}
سیکلوفسفامید + مسنا + باریجه	۸	۵۹ (۷۹/۳۳) ^c	۱۵ (۲۰/۶۷) ^d
تعداد کل	۳۳	۱۹۵	۶۸

حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) بین گروه‌ها می‌باشد.

نتایج نشان داد که درصد جنین‌های زنده در گروه دریافت کننده نرمال سالین به صورت معنی دار ($p < 0/001$) بیش تر از سایر گروه‌ها بود. هم چنین درصد جنین‌های زنده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به تنهایی، با سایر گروه‌ها به استثنای گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا به صورت معنی دار ($p < 0/001$) کم تر بود. هم چنین درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه اختلاف معنی داری ($p = 0/10$) را نشان نداد (جدول شماره ۱).

نتایج وزن جنین‌ها میانگین (\pm خطای استاندارد) وزن جنین در گروه دریافت کننده نرمال سالین به طور معنی داری بیش تر از

حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) بین گروه‌ها می‌باشد.

نتایج وزن جنین‌ها میانگین (\pm خطای استاندارد) وزن جنین در گروه دریافت کننده نرمال سالین به طور معنی داری بیش تر از

نتایج وزن جنین‌ها

میانگین (\pm خطای استاندارد) وزن جنین در گروه دریافت کننده نرمال سالین به طور معنی داری بیش تر از

نتایج طول جنین ها

میانگین طول جنین در گروه دریافت کننده‌ی نرمال سالیین $35/43 \pm 0/51$ میلی‌متر بوده است که با همه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < 0/001$). طبق نمودار شماره ۱، میانگین طول جنین در گروه‌های دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامید به تنهایی، سیکلوفسفامید همراه مسنا، سیکلوفسفامید همراه باریجه و سیکلوفسفامید همراه مسنا و باریجه به ترتیب $24/58 \pm 0/63$ ، $30/19 \pm 0/66$ و $31/92 \pm 0/73$ میلی‌متر محاسبه شد. تجویز سیکلوفسفامید به تنهایی باعث کاهش طول همه جنین‌ها گردید، به طوری که این کاهش در مقایسه با سایر گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار بوده است ($p < 0/001$) میانگین طول جنین در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه $p = 0/10$ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. هم‌چنین میانگین وزن جنین در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه ($p = 0/70$) نیز اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار شماره ۱).



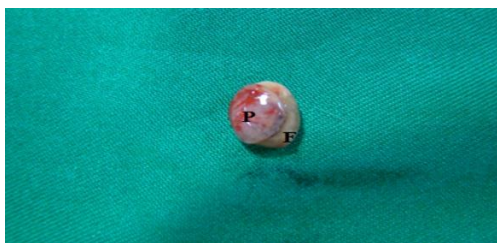
تصویر شماره ۱: جنین بیست روزه موش صحرائی. در سمت چپ جنین سالم موش صحرائی (گروه کنترل) و در وسط و سمت راست، سه جنین گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید با ناهنجاری‌های ادم زیر جلدی و میکروملیا مشاهده میشوند.

- نتایج ارزیابی نقایص اسکلتی جنین‌ها در موش‌های دریافت کننده‌ی دارو

ب- ۱- نتایج ظاهری و استریومیکروسکوپی ناهنجاری‌ها تغییرات ظاهری جنین‌ها به دنبال مصرف

سیکلوفسفامید به صورت جذب شدن جنین، امفالوسل، ادم زیر جلدی، میکروملیا، مروملیا، شکاف کام و آگزنسفال‌ی بود ولی در بررسی استریومیکروسکوپی، سیستم اسکلتی جنین‌ها دارای ناهنجاری‌های شکاف کام، استخوانی نشدن مهره‌های جناغ، به هم چسبیدن مرکز بدنه مهره‌ها بودند. میزان وقوع این ناهنجاری‌ها در گروه‌های مختلف در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

وقوع ناهنجاری‌ها بین گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید با سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) را نشان داد، ضمن آن که وقوع و درصد ناهنجاری‌ها در گروه‌های دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا، سیکلوفسفامید به همراه باریجه و سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به طور معنی‌داری کاهش یافته بود و این کاهش در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه مسنا و باریجه بیش‌تر بوده است. البته کاهش ناهنجاری‌ها به استثنای ناهنجاری بدنه مهره‌ها، بین گروه‌های دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و سیکلوفسفامید به همراه باریجه و سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه معنی‌دار ($p > 0/05$) نبوده است. در تصاویر شماره ۱ الی ۹ ناهنجاری‌های مشاهده شده در جنین‌ها به دنبال مصرف سیکلوفسفامید نشان داده شده است.

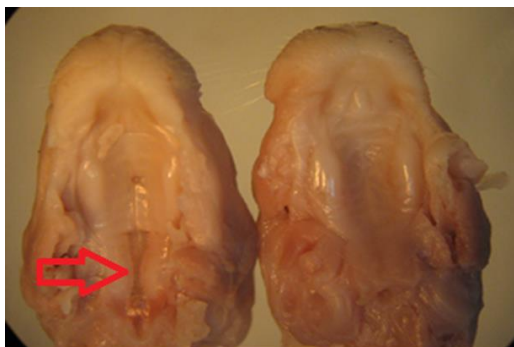


تصویر شماره ۲: جنین جذب شده موش صحرائی. جنین جذب شده (F) به همراه جفت (P) در گروه دریافت کنند سیکلوفسفامید مشاهده می‌شود..

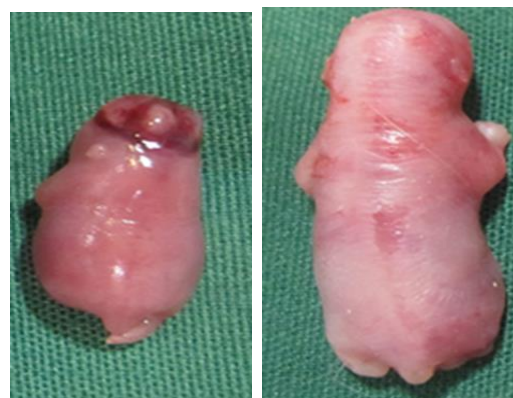
جدول شماره ۲: تعداد و درصد ناهنجاری های مشاهده شده در جنین های گروه های مختلف

گروه ها	درصد ناهنجاری ها						
	شکاف کام	اگزنسفالی	میکرومیلیا	مرومیلیا	ادم زیر جلدی	ناهنجاری بدنه مهره	ناهنجاری جناغ
کنترل	۰a	۰a	۰a	۰a	۰a	۰a	۰a
سیکلو فسفامید	۱۲(۳۷/۵)b	۲۰(۶۲/۵)b	۵(۱۶/۶۲)b	۵(۱۶/۶۲)b	۵(۱۶/۶۲)b	۲۱(۶۲/۶۲)b	۱۲(۳۷/۵)b
سیکلو فسفامید + منسا	۸(۲۸/۵۷) b c	۸(۲۸/۵۷) c	۱۳(۳۷) c	۰a	۰a	۱۰(۳۵/۷۱) c	۱۰(۳۵/۷۱) c
سیکلو فسفامید + پارچه	۵(۱۸/۵۱) c	۴(۱۴/۸۱) c	۱(۳/۷) c	۰a	۰a	۳(۱۱/۱۱) d	۳(۱۱/۱۱) c
سیکلو فسفامید + منسا + پارچه	۱۱(۱۸/۶۴) c	۷(۱۱/۸۶) c	۲(۳/۳۸) c	۰a	۴(۶/۷۷) c	۹(۱۵/۲۵) d	۹(۱۵/۲۵) c

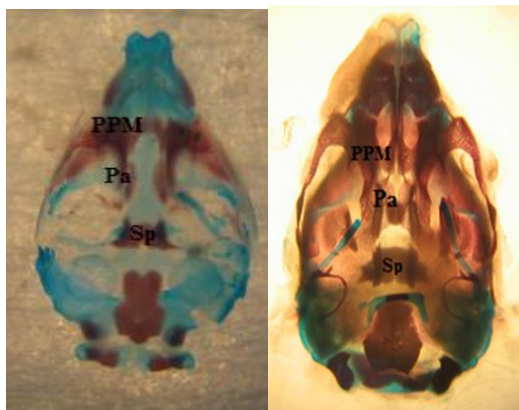
حروف مختلف بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها در هر ستون می باشد ($P < 0/05$).



تصویر شماره ۶: تصویر استریو میکروسکوپی سطح شکمی جمجمه جنین بیست روزه موش صحرائی. پس از برداشتن فک پایین در سمت راست، نمای شکمی جمجمه جنین سالم موش صحرائی و در سمت چپ جنین دارای ناهنجاری شکاف کام (پیکان قرمز رنگ) مشاهده می شود.



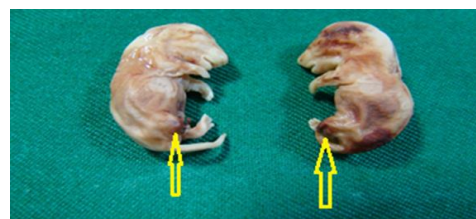
تصویر شماره ۳: جنین های بیست روزه ناهنجر و سالم موش صحرائی. در سمت راست جنین سالم موش صحرائی و در سمت چپ جنین با ناهنجاری اگزنسفالی (پیکان زرد رنگ) مربوط به گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید مشاهده می شود.



تصویر شماره ۷: تصویر استریو میکروسکوپی سطح شکمی جمجمه جنین بیست روزه موش صحرائی پس از برداشتن فک پایین (رنگ آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). در سمت راست، نمای شکمی جمجمه جنین سالم موش صحرائی (استخوان کام Pa، زائنده کامی استخوان آرواره بالا PPM و پروانه Sp) و در سمت چپ، نمای شکمی جمجمه جنین دارای ناهنجاری شکاف کام (پیکان سفید رنگ) مربوط به گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید مشاهده می شود.



تصویر شماره ۴: جنین ناهنجر بیست روزه موش صحرائی. جنین بیست روزه موش صحرائی با ناهنجاری امفالوسل (پیکان) و ادم زیر جلدی در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید مشاهده می شود.

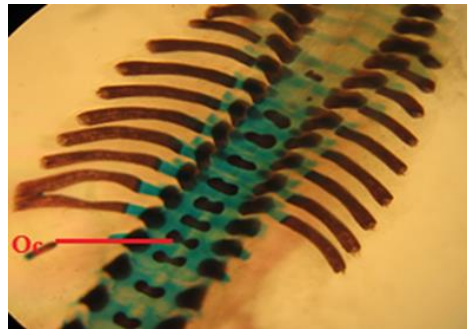
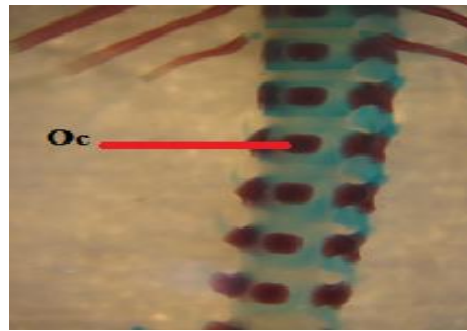


تصویر شماره ۵: جنین ناهنجر بیست روزه فیکس شده در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید موش صحرائی. جنین بیست روزه موش صحرائی در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید با ناهنجاری مرومیلیا در اندام خلفی (پیکان زرد) مشاهده می شود.

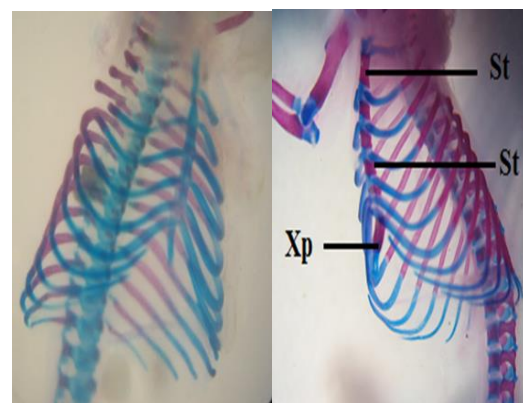
بحث

در مطالعه حاضر درصد وقوع ناهنجاری شکاف کام، اگزوسفالی، فوکولیا، امفالوسل و ادم زیرجلدی ناشی از سیکلوفسفامید به ترتیب ۳۷/۵۰، ۶۲/۵۰، ۱۶/۶۲ و ۹/۳۷ و ۱۶/۶۲ بود که درصد این ناهنجاری‌ها توسط مسنا به ۲۸/۵۷، ۲۸/۵۷، ۳/۵۷، ۷/۱۴ و صفر و توسط باریجه به ۱۸/۵۱، ۱۴/۸۱، ۳/۷ و صفر کاهش یافت. در حالی که این درصدها در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه مسنا و باریجه به ۱۸/۶۴، ۱۱/۸۶، ۳/۳۸ و صفر و ۶/۷۷ کاهش یافت. در مطالعه سایر محققین نتایج مشابهی گزارش شده است. به عنوان مثال Jeyaseelan و همکاران (۱۹۸۴) با تزریق سیکلوفسفامید با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز دوازدهم آبستنی به موش‌های صحرایی آبستن ناهنجاری‌های اندام قدامی، اگزوسفالی و کاهش رشد را مشاهده کردند (۱۶) که نتایج آن‌ها تقریباً با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هماهنگی دارد.

Slott و همکاران در سال ۱۹۸۶ اثر مرکاپتواتان سولفانات را در کاهش اثرات تراتوژنیک سیکلوفسفامید در جنین موش صحرایی ارزیابی کردند و نشان دادند که تجویز سیکلوفسفامید با دوزهای ۱۰ یا ۱۵ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن در روز سیزدهم آبستنی می‌تواند به ترتیب در ۱۰۰ و ۵۰ درصد جنین‌ها ناهنجاری ایجاد کند. ناهنجاری‌های مشاهده شده شامل هیدروسفالی، نقایص اندام‌های قدامی و خلفی، باز بودن چشم، شکاف کام، کوتاهی فک پایین و نقایص اسکلتی مختلفی بوده است. مسنا به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل ناهنجاری ایجاد نکرده بود. مسنا در دوز ۵ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن موش‌ها نتوانست از ناهنجاری‌های خارجی جنینی ناشی از سیکلوفسفامید (در هر دو دوز فوق) جلوگیری نماید. اما مسنا در دوز ۳۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن موش‌ها نتوانست ناهنجاری‌های خارجی جنینی ناشی از سیکلوفسفامید به طور معنی‌داری کاهش دهد، ولی روی نقایص اسکلتی



تصویر شماره ۸: تصویر استریومیکروسکوپی سطح شکمی ستون مهره جنین بیست روزه موش صحرایی (رنگ آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). در تصویر بالا، بدنه مهره‌های ستون مهره جنین سالم موش صحرایی دارای یک مرکز استخوان سازی (Oc) می‌باشد، در حالی که در تصویر پایین، بدنه مهره‌های جنین‌های ناهنجار مربوط به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید دارای حداقل دو مرکز استخوان سازی بوده و به یکدیگر جوش خورده و دمبلی شکل شده اند.



تصویر شماره ۹: تصویر استریومیکروسکوپی جناغ جنین بیست روزه موش صحرایی (رنگ آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). در سمت راست، مهره‌های جناغی (St) و و زائده خنجری (XP) در جنین سالم موش صحرایی و در سمت چپ عدم استخوانی شدن مهره‌های جناغی در جنین‌های مربوط به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به خوبی قابل مشاهده می‌باشند.

تاثیری نداشت (۸). در مطالعه حاضر نتایج تاثیر مسنا در برخی از عوارض مشابه مطالعه فوق و در برخی از موارد دیگر متفاوت بود.

Najafzadeh در سال ۲۰۰۹ بیان نمودند که تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در موش صحرایی در روز سیزدهم آبستنی علاوه بر کاهش طول و وزن باعث ایجاد ناهنجاری های مختلف اسکلتی و ظاهری از جمله آگزنسفالی، شکاف کام، امفالوسل و نقایص اندامها و جناغ می شود. مسنا در دوز ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن موشها توانست ناهنجاری های جنینی ناشی از سیکلوفسفامید به طور معنی داری کاهش دهد و به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل ناهنجاری ایجاد نکرده بود (۱۷) که با نتایج مطالعه حاضر کمابیش مطابقت دارد.

Menetrey و همکاران در سال ۱۹۹۹ بیان کردند که مسنا در دوزهای ۴۰ تا ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی، التهاب مثانه ناشی از تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را در موش صحرایی کاهش می دهد (۱۸). Vieira و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر مسنا به همراه دگزامتازون در کاهش التهاب خونریزی دهنده مثانه ناشی از ایزوفسفامید در موش صحرایی را بررسی کردند و نشان دادند که مسنا در ترکیب فوق اثر مفیدی دارد (۱۰).

Song و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان نمودند که سیکلوفسفامید با دوز ۱۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باعث التهاب خونریزی دهنده مثانه می شود که تولید رادیکال های آزاد اکسیژن نقش مهمی در ایجاد این التهاب دارند. محققین فوق بیان نمودند که ویتامین C و مسنا اثر محافظتی و درمانی قوی علیه التهاب خونریزی دهنده مثانه ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید را دارند (۱۹).

Francis و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند که سیکلوفسفامید در روز دهم آبستنی با دوز ۲۰ میلی گرم

به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی در موش سفید کوچک دارای اثرات تراتوژنیک روی سیستم اسکلتی از جمله شکاف کام، آگزنسفالی و نقایص اندامها می باشد (۶). در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۶ توسط Nomura و همکاران انجام گرفته است، بیان شد که تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز یازدهم آبستنی در موش سفید کوچک سبب ایجاد ناهنجاری اسکلتی می شود (۲۰). Logsdon و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که سیکلوفسفامید در روز دهم آبستنی با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی در موش سفید کوچک علاوه بر کاهش وزن جنین ها دارای اثرات تراتوژنیک از جمله نقایص اندامها، نقایص سری، وجود دو مرکز استخوانسازی در بدنه مهره ها یا به هم جوش خوردن آنها و ادم زیر جلدی می باشد (۲۱). Khaksary Mahabady و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان نمودند که تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در موش سفید کوچک در روز دهم آبستنی باعث ایجاد ناهنجاری های مختلف اسکلتی و ظاهری از جمله آگزنسفالی، شکاف کام، امفالوسل و چشم باز می شود (۷). در مطالعه ای که Hao و همکاران (۲۰۰۲) انجام دادند، مشاهده کردند موش های صحرایی در معرض این دارو ناهنجاری های متعددی را در ناحیه سر و صورت نشان دادند. از جمله ۹۹ درصد جنین ها دچار آگزنسفالی بودند. در ایجاد این عوارض واکنش های ماکروفاژی و پاسخ های التهابی در پاتوفیزیولوژی نقایص عصبی اسکلتی دخالت داشتند. کاربرد سیکلوفسفامید ترکیبی از ناهنجاری های کوچک و ناهنجاری های بزرگ را ایجاد می کند (۲۲). هم چنین سیکلوفسفامید در موش سفید کوچک در روزهای نهم تا چهاردهم آبستنی باعث ایجاد ناهنجاری های شکاف کام، آگزنسفالی، باز بودن چشم و ناهنجاری هایی در اندامها می شود (۲۳). علاوه بر شکاف کام و ناهنجاری های اندام حرکتی،

را به طور معنی داری کاهش می دهد. باریجه و مسنا ناهنجاری اسکلتی ناشی از سیکلوفسفامید را هم کاهش دادند. درصد وقوع ناهنجاری های جنینی در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه های دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا بیشتر کاهش یافت ولی معنی دار نبوده است. افزایش درصد ادم زیر جلدی در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه و مسنا نسبت به گروه های دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا یا باریجه، احتمالاً تداخل اثر همزمان آن ها در عملکرد کلیه و افزایش مایعات بدن و در نتیجه ادم زیر جلدی در این گروه می باشد. در مورد میانگین طول و وزن جنین ها در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه های دیگر به استثنای گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه با مسنا به طور معنی داری افزایش یافته است. بنابراین باریجه احتمالاً با اثر آنتی اکسیدانی خود می تواند جنین را در برابر آسیب ناشی از سیکلوفسفامید تا حدودی محافظت نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی در انجام این مقاله که بخشی از پایان نامه خانم مهرسا نعمتی با کد ۹۲۵۸۸۷۸ و با هزینه پژوهانه انجام شده است اعلام می دارند.

References

1. Giavini E, Menegola E. Gene-teratogen chemically induced interactions in congenital malformations. *Biol Neonate* 2004; 85(2): 73-81.
2. Moore KL, Persuad TVN, Torchia MG. The developing human: clinically oriented embryology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
3. De santis M, Straface G, Carducci B, Cavaliere AF, De santis L, Lu echese A, et al. Risk of drug-induced congenital defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117(1): 10-19.
4. Prater MR, Zimmerman KL, Lee Ward DL, Holladay SD. Reduced birth defects caused by maternal immune stimulation in ناهنجاری های دیگر سیکلوفسفامید در موش سفید کوچک به صورت نقایص اسکلتی، جمجمه ای - صورتی، ادراری تناسلی، قلبی و نقایص بافت های نرم مانند مغز و کلیه ها، کاهش وزن و تأخیر در رشد جنین اتفاق می افتد (۲۴). این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هماهنگی دارد. در بسیاری از مطالعات بیان شده است که بخشی از اثرات تراژونیک سیکلوفسفامید به دلیل استرس اکسیداتیو می باشد (۲۴). عدم تعادل در تولید و حذف رادیکال های آزاد اکسیژن می تواند باعث اثرات تراژونیک سیکلوفسفامید (۲۵۸). بنابراین تجویز همزمان یا پیشگیرانه داروهایی با خواص آنتی اکسیدانی از جمله باریجه می تواند عوارض تراژونیک سیکلوفسفامید را کاهش دهد. Rashidi و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان نمودند که اسانس باریجه با دوز ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن احتمالاً با اثر آنتی اکسیدانی خود شکاف کام ناشی از کافتین را در جنین های موش صحرائی کاهش می دهد (۱۴) که در مطالعه حاضر نیز باریجه با این دوز توانست ناهنجاری های ناشی از سیکلوفسفامید را کاهش دهد. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر نقش باریجه در حذف اثرات ناهنجاری زایی سیکلوفسفامید برای نخستین بار مشخص شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سیکلوفسفامید با دوز ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز سیزدهم آبستنی باعث ایجاد انواع ناهنجاری ها از جمله شکاف کام، اگزنسفالی، مروملیا و میکروملیا در جنین موش صحرائی می شود و میانگین وزن و طول جنین ها

- methylnitrosourea-exposed mice: Association with placental improvement. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70(11): 862-869.
5. Park D, Jeon JH, Shin S, Joo SS, Kang DH, Moon SH et al. Green tea extract increases cyclophosphamide-induced teratogenesis by modulating the expression of cytochrome P-450 mRNA. *Reprod Toxicol* 2009; 27(1): 79-84.
 6. Francis BM, Rogers JM, Sulik KK, Alles AJ, Elstein KH, Zucker RM et al. Cyclophosphamide teratogenesis: evidence for compensatory responses to induced cellular toxicity. *Teratology* 1990; 42(5): 473-482.
 7. Khaksary Mahabady M, Najafzadeh Varzi H, Bakhtiari E. The Teratogenicity of Cyclophosphamide on Skeletal System and Neural Tube of Fetal Mice. *World Applied Sciences Journal* 2012; 16(6): 831-834.
 8. Slott VL, Hales BF. Sodium 2-mercaptoethane sulfonate protection against cyclophosphamide-induced teratogenicity in rats. *Toxicol App Pharmacol* 1986; 82(1): 80-86.
 9. Navarová J, Ujházy E, Dubovický M. Protective effect of the antioxidant stobadine against cyclophosphamide and irradiation induced oxidative stress. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18: 112-119.
 10. Vieira MM, Brito GA, Belarmino-Filho JN, Macedo FY, Nery EA, Cunha QF, et al. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. *Int J Urol* 2003; 10(11): 595-602.
 11. Donald C. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 6th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2008.
 12. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Eslami B. Antioxidant activity flower, stem and leaf extracts of *Ferula gummosa Boiss.* *Grasas y Aceites* 2010; 61(3): 244-250.
 13. Mercier B, Prost J, Prost M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *Int J Occup Med Environ Health* 2009; 22(4): 331-342.
 14. Rashidi F, Khaksary-Mahabady M, Ranjbar R, Najafzadeh-Varzi H. The Effects of Essential Oil of Galbanum on Caffeine Induced-Cleft palate in Rat Embryos. *ZJRMS* 2014; 16(2): 37-41 (Persian).
 15. Yolanda P. *Laboratory Exercises in Developmental Biology*. 1thed. Academic press limited; 1993.
 16. Jeyaseelan N, Singh SH. Forelimb malformation in rats caused by cyclophosphamide. *Acta Orthop Scand* 1984; 55(6): 643-646.
 17. Najafzadeh Varzi H, Khaksari Mahabadi M. A Comparison Study of the Effects of Echinacea purpurea Ethanolic Extract and Mesna on Cyclophosphamide-Induced Macroscopic Fetal Defects in Rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2009; 12(1): 61-66 (Persian).
 18. Menetreya D, Bona K, Michielsb JF, Lantkri-Minet M. The uroprotection of mesna on cyclophosphamide cystitis in rats. Its consequences on behavior and brain activities. *C R Acad Sci III* 1999; 322(6): 505-515.
 19. Song J, Liu L, Li L, Liu J, Song E, Yang S. Protective effects of lipoic acid and mesna on cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. *Cell Biochem Funct* 2014; 32(2): 125-132.
 20. Nomura M, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Tamura J, Koike, M, et al. Cyclophosphamide-induced apoptosis induces phocomelia in the mouse. *Arch Toxicol* 1996; 70(10): 672-677.
 21. Logsdon AL, Herring BJ, Lockard JE, Miller BM, Kim H, Hood RD et al. Exposure to Green Tea Extract Alters the Incidence

- of Specific Cyclophosphamide-Induced Malformations. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2012; 95(3): 231-237.
22. Hao AJ, Dheen ST, Ling EA. Expression of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in microglia activation is linked to teratogen-induced neuronal damage. *Neuroscience* 2002; 112(4): 889-900.
23. Gibson JE, Becker BA. The teratogenicity of Cyclophosphamide in mice. *Cancer Res* 1968; 28(3): 475-480.
24. Sharova LV, Sharo AA, Sura P, Gogal RM, Smith BJ, Holladay SD. Maternal immune stimulation reduces both placental morphologic damage and down-regulated placental growth-factor and cell cycle gene expression caused by urethane: are these events related to reduced teratogenesis? *Int Immunopharmacol* 2003; 3(7): 945-955.
25. Winn LM, Wells PG. Maternal administration of superoxide dismutase and catalase in phenytoin teratogenicity. *Free Radic Biol Med* 1990; 26(3): 266-274.