

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 سیکلو فسفامید 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 تراتوژنیک سیکلو فسفامید منجر به ناهنجاری های مادرزادی در انسان و حیوانات می شود. گزارشات وجود دارد که اثرات سیکلو فسفامید 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 سولفات) برای کاهش عوارض جانبی سیکلو فسفامید به ویژه التهاب خونریزی دهنده ممانه استفاده می شود. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات باریجه و مسنا روی ناهنجاری های ناشی از سیکلو فسفامید 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 سیکلو فسفامید و به گروه های دیگر به ترتیب سیکلو فسفامید به تنهایی با دوز ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن، سیکلو فسفامید همراه با مسنا با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن، سیکلو فسفامید همراه با باریجه با دوز ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن و سیکلو فسفامید 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، اگزنسفالی، میکرومیلیا و امفالوسل در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید به تنهایی به ترتیب ۳۷/۵۰، ۶۲/۵۰، ۱۶/۶۲ و ۹/۳۷ درصد بود که درصد این ناهنجاری ها در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید به همراه مسنا با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به ترتیب ۲۸/۵۷، ۲۸/۵۷، ۳/۵۷ و ۷/۱۴ درصد و در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید به همراه باریجه با دوز ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به ترتیب به ۱۸/۵۱، ۱۴/۸۱، ۳/۷۰ و صفر درصد بود. در حالی که این درصدها در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید 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 سیکلو فسفامید را کاهش می دهد.

واژه های کلیدی: سیکلو فسفامید، باریجه، ناهنجاری اسکلتی، موش صحرایی

مقدمه

مواجهه جنین با مواد شیمیایی از جمله داروها ممکن است منجر به ناهنجاری های جنینی یا سقط گردد (۱). نقایص تکاملی هنوز یکی از مشکلات مهم بهداشتی محسوب می شود و در آمریکا ۳ تا ۵ درصد نوزادان به

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 ترانژن 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 ترانژنیک در انسان و حيوانات 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 ارگانوژن مانند روز دهم یا سیزدهم باعث ایجاد ناهنجاری های مختلف اسکلتی از جمله شکاف کام، نقايص اندام ها و اگر نسفالی می شود (۸-۶). یکی از مکانیسم های ترانژن در بدن ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد که نقش مهمی در پاتوژنز 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 ترانژنیک 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 (مسنای) 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 گالابانی 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 ترانژن 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

محیط نگهداری شدند. موش‌های صحرایی از آب لوله‌کشی شهر و غذای فشرده ساخت کارخانه خوراک 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 مجزا 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 میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۸). گروه سوم: سیکلوفسفامید به میزان ۱۵ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه مسنا با دوز ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۱۰). گروه چهارم: سیکلوفسفامید به میزان ۱۵ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه باریجه با دوز ۲۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۱۴). گروه پنجم: سیکلوفسفامید به میزان ۱۵ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه مسنا با دوز ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن و باریجه با دوز ۲۰۰ میلی گرم 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

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 اکزنسفال 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 ناهنجاری زایی سیکلوفسفامید مشخص گردید.

یافته‌ها

- نتایج استحصال جنین‌ها

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

دریافت کننده سیکلوفسفامید به تنهایی، با سایر گروه‌ها به استثنای گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا به صورت معنی‌دار ($p < 0/001$) بیش‌تر بود. درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه اختلاف معنی‌داری ($p = 0/08$) را نشان نداد و هم‌چنین درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه اختلاف معنی‌داری ($p = 0/10$) را نشان نداد (جدول شماره ۱).

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 (۷۱/۰۵) ^c	۱۱ (۲۸/۹۵) ^{dc}
سیکلوفسفامید + مسنا + باریجه	۸	۵۹ (۷۹/۷۳) ^c	۱۵ (۲۰/۲۷) ^d
تعداد کل	۳۳	۱۹۵	۶۸

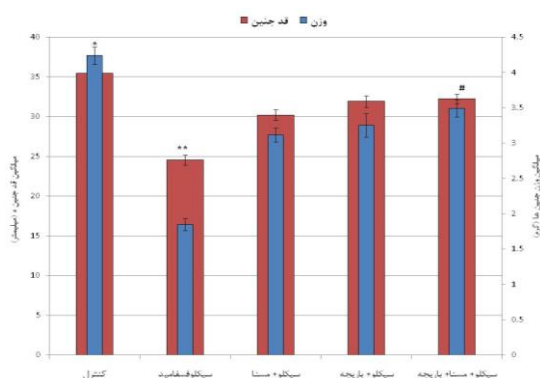
حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) بین گروه‌ها می‌باشد.

نتایج نشان داد که درصد جنین‌های زنده در گروه دریافت کننده نرمال سالین به صورت معنی‌دار ($p < 0/001$) بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود. هم‌چنین درصد جنین‌های زنده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به تنهایی، با سایر گروه‌ها به استثنای گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا به صورت معنی‌دار ($p < 0/001$) کم‌تر بود. هم‌چنین درصد جنین‌های جذب شده در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه اختلاف معنی‌داری ($p = 0/10$) را نشان نداد (جدول شماره ۱).

نتایج وزن جنین‌ها

میانگین ($\pm$ خطای استاندارد) وزن جنین در گروه دریافت کننده نرمال سالین به طور معنی‌داری بیش‌تر از

سایر گروه‌ها بود ($p < 0/001$). هم‌چنین 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 معنی‌داری 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 معنی‌دار 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 معنی‌داری را نشان نداد (نمودار شماره ۱). هم‌چنین میانگین وزن جنین در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه ($p = 0/18$) نیز اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار شماره ۱).



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

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

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

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

نتایج طول جنین ها

میانگین طول جنین در گروه دریافت کننده ی نرمال سالین ۵۱/۴۳±۳۵ میلی متر بوده است که با همه گروه ها اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($p < 0/001$). طبق نمودار شماره ۱، میانگین طول جنین در گروه های دریافت کننده ی سیکلوفسفامید به تنهایی، سیکلوفسفامید همراه مسنا، سیکلوفسفامید همراه باریجه و سیکلوفسفامید همراه مسنا و باریجه به ترتیب $63 \pm 24/58$ ، $66 \pm 30/19$ ، $73 \pm 31/92$ و $58 \pm 32/27$ میلی متر محاسبه شد. تجویز سیکلوفسفامید به تنهایی باعث کاهش طول همه جنین ها گردید، به طوری که این کاهش در مقایسه با سایر گروه ها از نظر آماری معنی دار 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 معنی داری را نشان نداد. هم چنین میانگین وزن جنین در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه ($p = 0/70$) نیز اختلاف معنی داری را نشان نداد (نمودار شماره ۱).



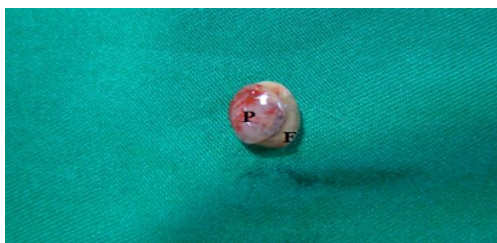
تصویر شماره ۱: جنین بیست روزه موش صحرایی. در سمت چپ جنین سالم موش صحرایی (گروه کنترل) و در وسط و سمت راست، سه جنین گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید با ناهنجاری های ادم زیر جلدی و میکرومیلیا مشاهده میشوند.

- نتایج ارزیابی تفاضلی اسکلتی جنین ها در موش های دریافت کننده ی دارو

ب- ۱- نتایج ظاهری و استریومیکروسکوپی ناهنجاری ها تغییرات ظاهری جنین ها به دنبال مصرف

سیکلوفسفامید به صورت جذب شدن جنین، امفالوسل، ادم زیر جلدی، میکرومیلیا، مرومیلیا، شکاف کام و اگزینسفالی بود ولی در بررسی استریومیکروسکوپی، سیستم اسکلتی جنین ها دارای ناهنجاری های شکاف کام، استخوانی نشدن مهره های جناغ، به هم چسبیدن مرکز بدنه مهره ها بودند. میزان وقوع این ناهنجاری ها در گروه های مختلف در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

وقوع ناهنجاری ها بین گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید با سایر گروه ها افزایش معنی داری ($p < 0/05$) را نشان داد، ضمن آن که وقوع و درصد ناهنجاری ها در گروه های 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 معنی داری کاهش یافته بود و این کاهش در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه مسنا و باریجه بیش تر بوده است. البته کاهش ناهنجاری ها به استثنای ناهنجاری بدنه مهره ها، بین گروه های دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و سیکلوفسفامید به همراه باریجه و سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه معنی دار ($p > 0/05$) نبوده است. در تصاویر شماره ۱ الی ۹ ناهنجاری های مشاهده شده در جنین ها به دنبال مصرف سیکلوفسفامید نشان داده شده است.

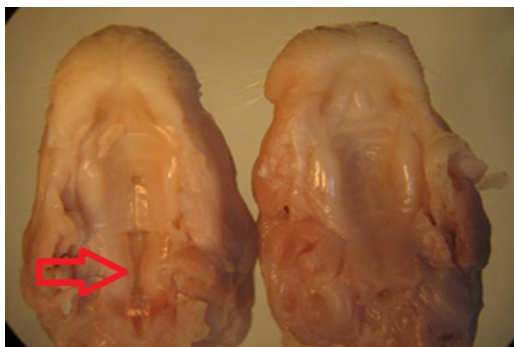


تصویر شماره ۲: جنین جذب شده موش صحرایی. جنین جذب شده (F) به همراه جفت (P) در گروه دریافت کنند سیکلوفسفامید مشاهده می شود..

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

گروه ها								(درصد) ناهنجاری ها	
کنترل	شکاف کام	اگزوفتالمی	میکرومیلیا	مرومیلیا	ادم زیر جلدی	ناهنجاری بدنه مهره	ناهنجاری جناغ	امفالوسل	
۰a	۰a	۰a	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	۳(۹/۳۷)b	۰a
سیکلو فسفامید + مسنا	۸(۲۸/۵۷) b c	۸(۲۸/۵۷) c	۱(۳/۵۷) c	۰a	۰a	۱۰(۳۵/۷۱) c	۱۰(۳۵/۷۱) c	۲(۷/۱۴) b	۰a
سیکلو فسفامید + پارچه	۵(۱۸/۵۱) c	۴(۱۴/۸۱) c	۱(۳/۷) c	۱(۳/۷) c	۰a	۳(۱۱/۱۱) d	۳(۱۱/۱۱) d	۰a	۰a
سیکلو فسفامید + مسنا + 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) d	۰a	۰a

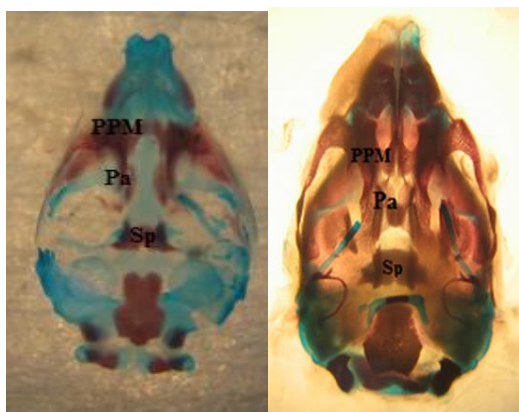
حروف مختلف بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها در هر ستون می باشد ($p < 0.05$).



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



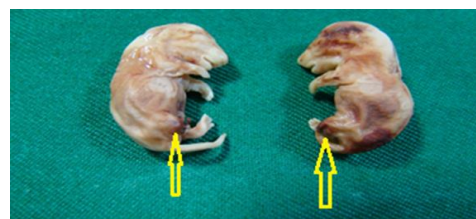
تصویر شماره ۳: جنین های بیست روزه ناهنجار و سالم موش صحرایی. در سمت راست جنین سالم موش صحرایی و در سمت چپ جنین با ناهنجاری اگزوفتالمی (پیکان زرد رنگ) مربوط به گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید مشاهده می شود.



تصویر شماره ۷: تصویر استریو میکروسکوپی سطح شکمی جمجمه جنین بیست روزه موش صحرایی پس از برداشتن فک پایین (رنگ آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). در سمت راست، نمای شکمی جمجمه جنین سالم موش صحرایی (استخوان کام Pa، زائده 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 ناهنجار بیست روزه موش صحرایی. جنین بیست روزه موش صحرایی با ناهنجاری امفالوسل (پیکان) و ادم زیر جلدی در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید مشاهده می شود.

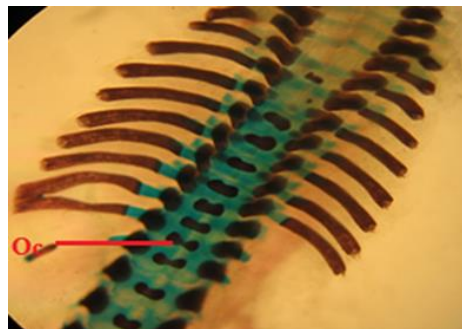
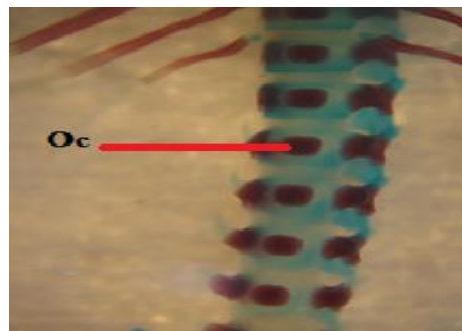


تصویر شماره ۵: جنین ناهنجار بیست روزه فیکس شده در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید موش صحرایی. جنین بیست روزه موش صحرایی در گروه دریافت کننده سیکلو فسفامید با ناهنجاری مرومیلیا در اندام خلفی (پیکان زرد) مشاهده می شود.

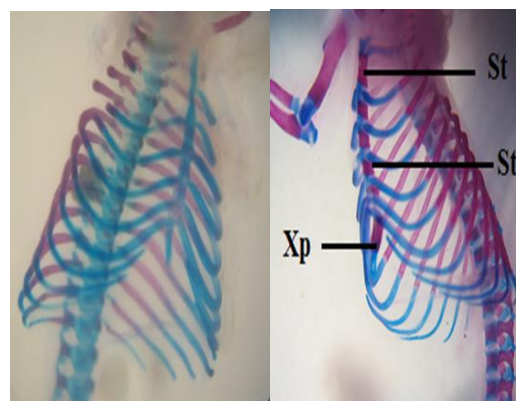
بحث

در مطالعه حاضر درصد وقوع ناهنجاری شکاف کام، اگزوسفالی، فوکوملیا، امفالوسل و ادم زیرجلدی ناشی از سیکلوفسفامید به ترتیب ۳۷/۵۰، ۶۲/۵۰، ۱۶/۶۲ و ۹/۳۷ 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، صفر 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، 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 مرکاپتوتان 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 خنجر (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 کیلو گرم 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 اگزرنسفالی، شکاف کام، امفالوسل و نقایص اندام ها و جناغ می شود. مسنا در دوز ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلو گرم وزن موش ها 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 کیلو گرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی، التهاب مثانه ناشی از تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم 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 کیلو گرم 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 کیلو گرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی در موش سفید کوچک دارای اثرات تراتوژنیک روی سیستم اسکلتی از جمله شکاف کام، اگزرنسفالی و نقایص اندام ها 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 کیلو گرم 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 کیلو گرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی در موش سفید کوچک علاوه بر کاهش وزن جنین ها دارای اثرات تراتوژنیک از جمله نقایص اندام ها، نقایص سری، وجود دو مرکز استخوان سازی در بدنه مهره ها یا به هم جوش خوردن آن ها 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 کیلو گرم وزن بدن در موش سفید کوچک در روز دهم آبستنی باعث ایجاد ناهنجاری های مختلف اسکلتی و ظاهری از جمله اگزرنسفالی، 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 اگزرنسفالی 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، اگزرنسفالی، باز بودن چشم و ناهنجاری هایی در اندام ها می شود (۲۳). علاوه بر شکاف کام و ناهنجاری های اندام حرکتی،

ناهنجاری‌های دیگر سیکلوفسفامید در موش سفید کوچک به صورت نقایص اسکلتی، جمجمه‌ای-صورتی، ادراری تناسلی، قلبی و نقایص بافت‌های نرم مانند مغز و کلیه‌ها، کاهش وزن و تأخیر در رشد جنین اتفاق می‌افتد (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 می‌باشد (۲۴). عدم تعادل در تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌تواند باعث اثرات تراژونیک سیکلوفسفامید (۲۵۸). بنابراین تجویز همزمان یا پیشگیرانه داروهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی از جمله باریجه می‌تواند 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 آنتی‌اکسیدانی خود شکاف کام ناشی از کافتین را در جنین‌های موش صحرایی کاهش می‌دهد (۱۴) که در مطالعه حاضر نیز باریجه با این دوز توانست ناهنجاری‌های ناشی از سیکلوفسفامید را کاهش دهد. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر نقش باریجه در حذف اثرات ناهنجاری‌زایی 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 ناهنجاری‌ها از جمله شکاف کام، اگزنسفالی، مرومیلیا و میکرومیلیا در جنین موش صحرایی می‌شود و میانگین وزن و طول جنین‌ها

را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. باریجه و مسنا ناهنجاری اسکلتی ناشی از سیکلوفسفامید را هم کاهش دادند. درصد وقوع ناهنجاری‌های جنینی در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه‌های دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا بیش‌تر کاهش یافت ولی معنی‌دار نبوده است. افزایش درصد ادم زیر جلدی در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه باریجه و مسنا نسبت به گروه‌های دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا یا باریجه، احتمالاً تداخل اثر همزمان آن‌ها در عملکرد کلیه و افزایش مایعات بدن و در نتیجه ادم زیر جلدی در این گروه می‌باشد. در مورد میانگین طول و وزن جنین‌ها در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید به همراه مسنا و باریجه نسبت به گروه‌های دیگر به استثنای گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه با مسنا به طور معنی‌داری افزایش یافته است. بنابراین باریجه احتمالاً با اثر آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند 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 پایان‌نامه خانم مهرسا نعمتی با کد ۹۲۵۸۸۷۸ و با هزینه پژوهانه انجام شده است اعلام می‌دارند.

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

- 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.