



اثر کوارستین روی نقایص لوله عصبی و ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین‌های موش صحرائی

محمود خاکساری مهابادی^{۱*}، محمدرضا غلامی^۲، حسین نجف‌زاده‌ورزی^۳، ابوالفضل زنده دل^۴، زهرا لطفعلیان^۵

- ۱- دانشگاه شهید چمران اهواز- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم پایه- بخش آناتومی و جنین‌شناسی- دانشیار.
- ۲- دانشگاه علوم پزشکی لرستان- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی- دانشکده پزشکی- گروه آناتومی- استادیار.
- ۳- دانشگاه شهید چمران اهواز- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم پایه- بخش فارماکولوژی و سم‌شناسی- استاد.
- ۴- دانشگاه علوم پزشکی لرستان- دانشکده پزشکی- گروه داخلی- دانشیار.
- ۵- دانشگاه علوم پزشکی لرستان- دانشکده پزشکی- دانش‌آموخته پزشکی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۶

چکیده

مقدمه: والپروات سدیم، نمک سدیمی والپروئیک اسید و یک داروی ضد تشنج می‌باشد که در درمان صرع به کار می‌رود و آثار تراتوژنیک آن در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. گزارش‌های متعددی وجود دارد که آثار تراتوژنیک والپروات سدیم به‌وسیله داروهای آنتی‌اکسیدان یا تحریک سیستم ایمنی مادری کاهش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد کوارستین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی باشد. هدف مطالعه حاضر، بررسی نقش محافظتی کوارستین روی ناهنجاری‌های ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرائی بوده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در ۶ گروه از موش‌های صحرائی آبستن (در هر گروه ۶ سر) انجام شد. به گروه اول (گروه کنترل) نرمال سالیین به‌صورت داخل صفاقی تجویز شد و به گروه دوم والپروات سدیم با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تجویز شد. به گروه سوم و چهارم به‌ترتیب کوارستین با دوز ۷۵ و ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تجویز شد. گروه پنجم والپروات سدیم همراه با کوارستین با دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و گروه ششم، والپروات سدیم همراه با کوارستین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را به روش داخل صفاقی دریافت نمودند. در روز بیستم آبستنی، جنین‌ها از رحم خارج شدند و پس از تعیین طول و وزن جنین‌ها، مورد رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز-آلسین آبی قرار گرفته و ناهنجاری‌ها به‌وسیله استریومیکروسکوپ مشخص گردیدند.

نتایج: درصد وقوع شکاف کام، مهره شکاف‌دار و اگزنسفالی در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به‌تنهایی به‌ترتیب ۱۷/۷٪، ۲۰٪ و ۲۰٪ بود که به‌وسیله کوارستین با دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به ۱۳/۹۵٪، ۱۱/۶۲٪ و ۱۱/۹۵٪ و به‌وسیله کوارستین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به ۱۱/۱۱٪ و ۱۱/۱۱٪ و ۱۱/۱۱٪ رسید.

نتیجه‌گیری: کوارستین می‌تواند وقوع ناهنجاری‌های ناشی از والپروات سدیم را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: والپروات سدیم، کوارستین، ناهنجاری، جنین موش صحرائی.

* نویسنده مسئول: اهواز دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۹۱۳۱۶۱۹۲۵۲، شماره: ۰۶۱-۳۳۳۶۰۸۰۷، Email: mkhaksarymahabady@yahoo.com

ارجاع: خاکساری مهابادی محمود، غلامی محمدرضا، نجف‌زاده‌ورزی حسین، زنده دل ابوالفضل، لطفعلیان زهرا. اثر کوارستین روی نقایص لوله عصبی و ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین‌های موش صحرائی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛ ۱۰(۳): ۳۶-۴۴.

مقدمه

والپروات سدیم یک داروی ضد تشنج از مشتقات اسید کربوکسیلیک می‌باشد و برای درمان انواع مختلف صرع استفاده می‌شود. این دارو در انسان و حیوانات دارای آثار تراوتونیک بر روی سیستم اسکلتی می‌باشد و بافت هدف اصلی آن نوروایی تلیوم لوله عصبی است که نقایص و ناهنجاری در آن مشاهده می‌شود (۳-۱).

تحقیقات نشان داد که استفاده از داروی ضد صرع در حین بارداری شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد را افزایش داده و باعث آسیب در سلول می‌گردد و افزایش در رادیکال‌های آزاد می‌تواند نقش مهمی را در پیشرفت صرع ایفا کند که منجر به انحطاط عصبی طی پراکسیداسیون لیپید و کاهش غلظت گلوکوتائون در کانون صرع می‌گردد. همچنین گزارش شده که فعالیت گلوکوتائون ردوکناز نیز توسط والپروات مهار می‌گردد، لذا درمان با یک آنتی‌اکسیدانی که از سد خونی مغزی عبور می‌کند ممکن است مفید باشد (۴).

این دارو دارای آثار تراوتونیک روی اندام‌های بدن از جمله نقایص اسکلتی و اندام‌ها، نقایص قلبی و ناهنجاری‌های سری صورتی و لوله عصبی می‌باشد که یکی از مکانیسم‌های تراوتونیک آن ایجاد رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌باشد (۵ و ۶).

کوارستین یکی از اعضاء خانواده فلاونوئیدها می‌باشد که در سبزیجات، میوه‌ها، چای و در مکمل‌های غذایی یافت می‌شود. همچنین کوارستین دارای خاصیت ضدالتهابی، آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی است و در جلوگیری از سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی به کار می‌رود (۷ و ۸).

این فلاونوئید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و جمع‌آوری‌کننده رادیکال‌های آزاد قوی می‌باشد که از آنتی‌اکسیدان‌های دیگر از جمله ویتامین E و ویتامین C نیز قوی‌تر است و از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند (۹ و ۱۰).

تجویز کوارستین به جیره موش آبستن توانسته است ناهنجاری‌های جنینی ناشی از متیل نیتروز اوره از قبیل ناهنجاری در انگشتان دست و پا را کاهش دهد. لازم به ذکر است که متیل نیتروز اوره از طریق استرس اکسیداتیو و ایجاد رادیکال‌های آزاد موجب ناهنجاری جنینی می‌شود (۱۱).

باتوجه به اینکه یکی از مکانیسم‌های تراوتونیک والپروات سدیم از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد و از آن جایی که تاکنون تأثیر کوارستین روی ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرایی بررسی نشده است، لذا در این مطالعه نقش این داروها در کاهش یا پیشگیری از ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرایی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

برای این مطالعه در سال ۱۳۹۲ موش‌های صحرایی نژاد ویستار تهیه شده از مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز استفاده شد. موش‌های صحرایی نر و ماده با سن حدود

سه و نیم ماهگی و وزن بین ۱۸۰-۲۰۰ گرم حدود ۲ هفته به‌منظور تطابق با محیط در مرکز تحقیقات در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی به‌طور مجزا از یکدیگر نگهداری شدند. بعد از جفت‌گیری موش‌های صحرایی به‌صورت اتفاقی در شش گروه به‌طور مجزا به شرح ذیل نگهداری شدند.

۱- گروه اول: به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و در روزهای هشتم و نهم آبستنی به موش‌های آبستن این گروه هم حجم والپروات سدیم، نرمال سالیین به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

۲- گروه دوم: در روزهای هشتم و نهم آبستنی به موش‌های آبستن این گروه والپروات سدیم با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

۳- گروه سوم: در روزهای هشتم و نهم آبستنی به موش‌های آبستن این گروه کوارستین با دوز ۷۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

۴- گروه چهارم: در روزهای هشتم و نهم آبستنی به موش‌های آبستن این گروه کوارستین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

۵- گروه پنجم: همانند گروه دوم والپروات سدیم (دوز ۳۰۰ میلی‌گرم)، به همراه کوارستین با دوز ۷۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

۶- گروه ششم: همانند گروه دوم والپروات سدیم (دوز ۳۰۰ میلی‌گرم)، به همراه کوارستین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

در روز بیستم آبستنی تمامی موش‌های دریافت‌کننده دارو به‌وسیله 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 آمنیون خارج شدند و برای بررسی ناهنجاری‌های ظاهری و اسکلتی ناشی از والپروات سدیم مراحل زیر انجام گرفت:

الف- جنین‌ها از نظر ناهنجاری‌های ظاهری از قبیل چشم باز، اگزینسفال و امفالوسل، در نواحی مختلف بدن ارزیابی شد و وزن و طول جنین با ترازو و کولیس اندازه‌گیری شده و تعداد جنین‌های زنده و جذب‌شده تعیین گردید.

ب- مطالعه سیستم اسکلتی جنین‌ها با روش رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز- آلیسین آبی انجام پذیرفت. نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی بدین‌صورت است که مناطق غضروفی آبی رنگ و مناطق استخوانی قرمز رنگ می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی کامل، جنین‌ها به کمک دستگاه استریومیکروسکوپ از نظر ناهنجاری‌های زیر مورد مطالعه و بررسی دقیق قرار گرفته و مقایسه شدند.

۱- ناهنجاری کام: از نظر وجود شکاف کام.

وزن جنین‌ها: میانگین (±خطای استاندارد) وزن جنین در گروه دریافت‌کننده نرمال سالیین به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها است ($P < 0.001$). همچنین میانگین وزن جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده نرمال سالیین $4.7 \pm 0.7/73$ گرم بوده است که در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم این میانگین کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.001$) میانگین وزن جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه کوارستین با دوز 200 mg/kg به‌طور معنی‌داری ($P < 0.001$) بیشتر از میانگین وزن جنین‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده والپروات سدیم، و کمتر از میانگین وزن جنین‌ها در سایر گروه‌ها می‌باشد (نمودار ۱).

طول جنین: میانگین طول جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به‌طور معنی‌داری ($P < 0.001$) کمتر از میانگین طول جنین‌های سایر گروه‌ها می‌باشد. میانگین طول جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه کوارستین با دوز 200 mg/kg به‌طور معنی‌داری ($P < 0.001$) بیشتر از میانگین طول جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم ($P < 0.001$) و کمتر از سایر گروه‌ها می‌باشد (نمودار ۲).

نتایج ارزیابی نقایص اسکلتی جنین‌ها در موش‌های دریافت‌کننده دارو تغییرات ظاهری جنین‌ها به‌دنبال مصرف والپروات سدیم به‌صورت جذب شدن جنین، امفالوسل و اگزنسفال بود ولی در بررسی استریومیکروسکوپی سیستم اسکلتی جنین‌ها دارای ناهنجاری‌های شکاف کام، مهره شکاف‌دار، ناهنجاری‌های جناغ و ستون مهره و دنده ناقص بودند. میزان وقوع این ناهنجاری‌ها در گروه‌های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است.

۲- ناهنجاری دنده: از نظر چسبیدن دنده‌ها به یکدیگر، وجود دنده اضافی به صورت یک طرفه یا دو طرفه و یا به‌صورت ناقص.
۳- ناهنجاری ستون مهره: از نظر شکل بدنه برخی از مهره‌های ستون فقرات، چسبندگی برخی از بدنه مهره‌ها به مهره‌های دیگر.
۴- ناهنجاری‌های جناغ.

۵- ناهنجاری‌های لوله عصبی از جمله اگزنسفال و مهره شکاف‌دار. نتایج به‌دست آمده از گروه‌های مختلف آزمایشی با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون Tukey جهت تعیین اختلاف میانگین وزن و طول جنین‌ها مقایسه شدند. به‌علاوه وجود یا عدم وجود ناهنجاری‌های ذکر شده در گروه‌های فوق با آزمون آماری Chi-square مقایسه شدند که تفاوت میانگین‌ها با ($P < 0.05$) معنی‌دار تلقی شد و اثر کوارستین در کاهش یا پیشگیری از ناهنجاری‌زایی والپروات سدیم مشخص گردید.

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه حاضر به شرح زیر در دو بخش بیان می‌شود:

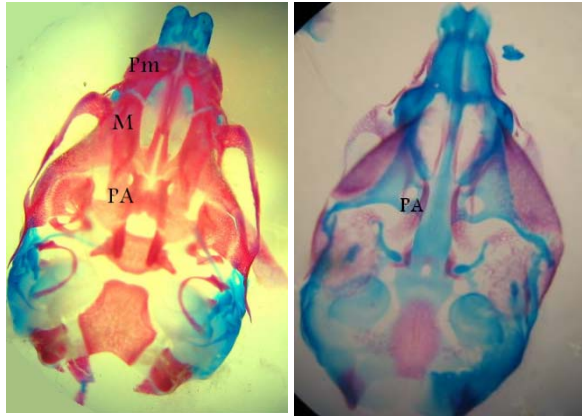
الف- نتایج استحصال جنین‌ها و تعیین وزن و طول آنها.
ب- نتایج ارزیابی نقایص اسکلتی جنین‌ها در موش‌های صحرائی آبیستنی دریافت‌کننده داروها.
در جدول ۱ درصد جنین‌های جذب‌شده و مرده در گروه‌های مختلف نشان داده شده است:

جدول ۱- درصد جنین‌های زنده و جذب‌شده در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	تعداد موش آبیستن	تعداد جنین‌های زنده (%)	تعداد جنین‌های جذب‌شده (%)
کنترل	۶	۴۷ (۹۵/۹۱)	۲ (۴/۰۹)
والپروات سدیم	۶	۴۵ (۸۸/۳۳)	۲ (۱۱/۷۷)
کوارستین ۷۵ mg	۵	۳۷ (۹۷/۳۷)	۱ (۲/۶۳)
کوارستین ۲۰۰ mg	۶	۴۱ (۹۵/۳۵)	۲ (۴/۶۵)
والپروات سدیم + کوارستین ۷۵mg	۶	۴۳ (۹۵/۵۶)	۲ (۴/۴۲)
والپروات سدیم + کوارستین ۲۰۰mg	۶	۳۶ (۹۰)	۳ (۱۰)

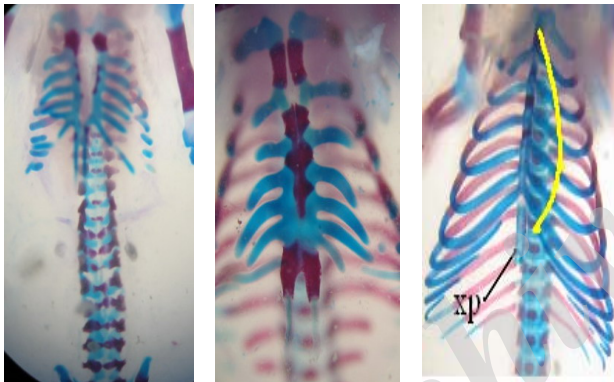
جدول ۲- تعداد و درصد ناهنجاری‌های مشاهده‌شده در جنین‌های گروه‌های مختلف

گروه‌ها	ناهنجاری‌ها تعداد (%)					
	شکاف کام	اسپاینا بیفیدا	اگزنسفال	امفالوسل	جناغ	ستون مهره
کنترل
والپروات سدیم	۸ (۱۷/۷)	۹ (۲۰)	۹ (۲۰)	۵ (۱۱/۱)	۷ (۱۵/۵)	۳ (۶/۶)
کوارستین ۷۵mg
کوارستین ۲۰۰mg
والپروات سدیم + کوارستین ۷۵ mg	۶ (۱۳/۹۵)	۵ (۱۱/۶۲)	۶ (۱۳/۹۵)	۲ (۴/۶۵)	۵ (۱۱/۶۲)	۲ (۴/۶۵)
والپروات سدیم + کوارستین ۲۰۰ mg	۴ (۱۱/۱۱)	۴ (۱۱/۱۱)	۴ (۱۱/۱۱)	۱ (۲/۷۷)	۳ (۸/۳۳)	۲ (۵/۵۵)



شکل ۲- شکل استریومیکروسکوپی سطح شکمی جمجمه جنین بیست روزه موش صحرایی پس از برداشتن فک پایین (رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی)

در شکل سمت راست، نمای شکمی جمجمه جنین سالم موش صحرایی (استخوان کام Pa و پیش آراره Pm و فک بالا M) و در سمت چپ نمای شکمی جمجمه جنین دارای ناهنجاری شکاف کام (شکاف بین دو قسمت Pa) در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم مشاهده می‌شود.



شکل ۴- تصویر استریومیکروسکوپی جناغ جنین بیست روزه موش صحرایی (رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی)

در این شکل در سمت راست مهره‌های جناغی (کمان زردرنگ) و زائده خنجری (XP) در جنین سالم بیست روزه موش صحرایی قابل مشاهده است. در سمت چپ ناهنجاری جناغ در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به شکل دو نیمه جناغ از هم جدا و زائده خنجری دو شاخه مشاهده می‌شود و در شکل وسط جوش خوردن مهره‌های جناغی به خوبی قابل مشاهده می‌باشد.

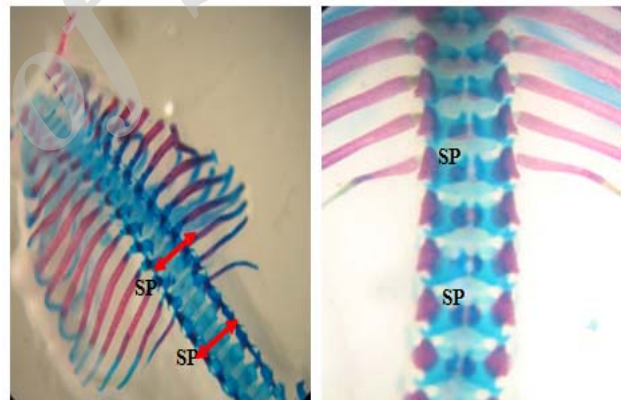
کیلوگرم وزن بدن به ۱۳/۹۵، ۱۱/۶۲، ۱۳/۹۵، ۴/۶۵، ۱۱/۶۲، ۴/۶۵ و ۴/۶۵ و توسط کوارستین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به ۱۱/۱۱، ۱۱/۱۱، ۱۱/۱۱، ۲/۷۷، ۸/۳۳، ۵/۵۵ و ۵/۵۵ کاهش یافت.

محققین نشان دادند که تجویز والپروات سدیم در زمان حاملگی دارای آثار تراژونیک بر روی سیستم اسکلتی از جمله اگزوسفالی، شکاف کام و ناهنجاری‌هایی در جناغ، مهره‌ها و دنده می‌باشد و همچنین باعث کاهش وزن در موش‌های سفید کوچک می‌شود (۱۲-۱۴) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد.



شکل ۱- جنین‌های بیست روزه ناهنجر موش صحرایی

در این شکل ناهنجاری‌های اگزوسفالی (پیکان آبی) و امفالوسل (پیکان زرد) در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم مشاهده می‌شوند.

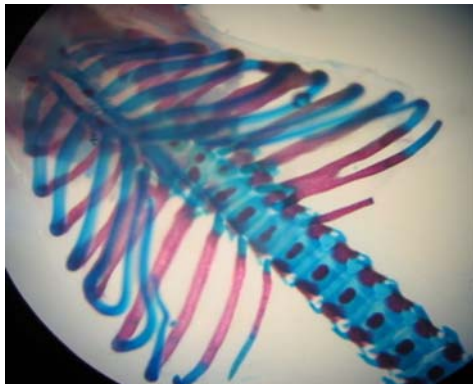


شکل ۳- شکل استریومیکروسکوپی نمای پشتی ستون مهره جنین بیست روزه موش صحرایی (رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی)

در شکل سمت راست نمای پشتی ستون مهره جنین سالم موش صحرایی (زائده شوکی SP) و در سمت چپ ناهنجاری مهره شکاف‌دار (اسپاینایفیدا) در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم با پیکان قرمز به خوبی قابل مشاهده می‌شود.

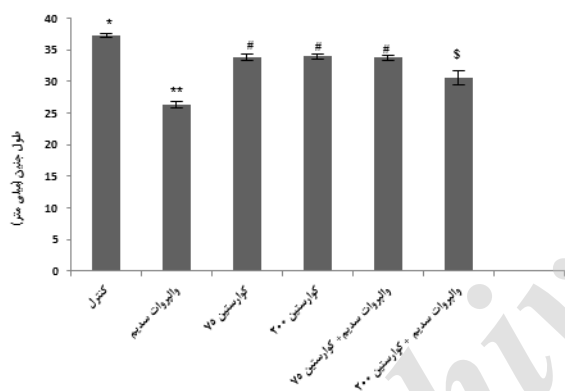
بحث

والپروات سدیم یک داروی ضد تشنج می‌باشد و برای درمان انواع مختلف صرع استفاده می‌شود. این دارو در انسان و حیوانات دارای آثار تراژونیک روی لوله عصبی و سیستم اسکلتی به خصوص اسکلت محوری می‌باشد که در مطالعه حاضر درصد وقوع شکاف کام، اسپاینایفیدا، اگزوسفالی، امفالوسل، ناهنجاری‌های جناغ، ناهنجاری‌های ستون مهره و دنده ناقص به دنبال مصرف والپروات سدیم به ترتیب ۱۷/۷٪، ۲۰٪، ۲۰٪، ۱۱/۱، ۱۵/۵، ۶/۶ و ۸/۸ بود که این درصد توسط کوارستین با دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر



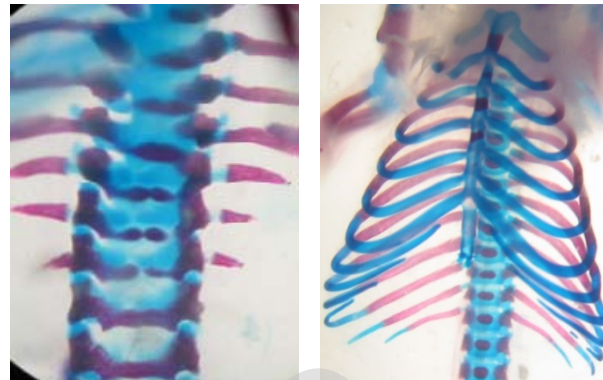
شکل ۶- تصویر استریومیکروسکوپی نمای شکمی ستون مهره و دنده‌های شناور جنین بیست روزه موش صحرایی (رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز-آلسین آبی)

در این شکل دنده سیزدهم در جنین گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به صورت ناقص (غضروف دنده‌ای تشکیل نشده است) و چسبیدن دنده‌ها مشخص می‌باشد.



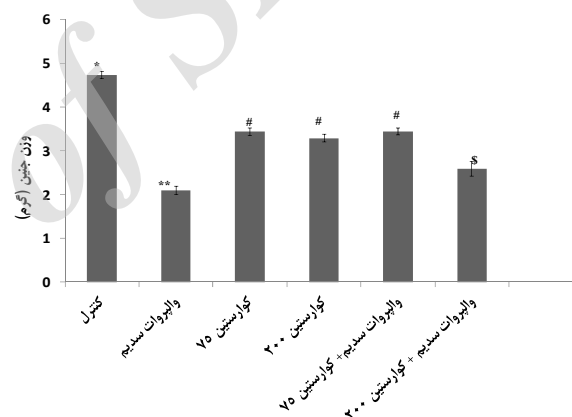
نمودار ۲- مقایسه میانگین \pm خطای استاندارد طول (میلی‌متر) جنین‌ها در گروه‌های تحت مطالعه

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها
 **: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه دریافت‌کننده گروه والپروات سدیم با سایر گروه‌ها
 #: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه دریافت‌کننده کوارستین ۷۵ با سایر گروه‌ها به استثنای کوارستین ۲۰۰ و والپروات سدیم به همراه کوارستین ۷۵
 \$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه کوارستین ۲۰۰ با سایر گروه‌ها



شکل ۵- تصویر استریومیکروسکوپی نمای شکمی ستون مهره جنین بیست روزه موش صحرایی (رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز-آلسین آبی)

در شکل سمت راست بدنه مهره‌های ستون مهره جنین سالم موش صحرایی دارای یک مرکز استخوان‌سازی می‌باشد. در حالی که در شکل سمت چپ بدنه مهره‌های جنین‌های ناهنجار در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم دارای حداقل دو مرکز استخوان‌سازی بوده که به یکدیگر جوش خورده‌اند.



نمودار ۱- میانگین \pm خطای استاندارد وزن (گرم) در جنین گروه‌های تحت مطالعه

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها
 **: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه دریافت‌کننده گروه والپروات سدیم با سایر گروه‌ها
 #: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه دریافت‌کننده کوارستین ۷۵ با سایر گروه‌ها به استثنای کوارستین ۲۰۰ و والپروات سدیم به همراه کوارستین ۷۵
 \$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بین گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه کوارستین ۲۰۰ با سایر گروه‌ها

ناهنجاری‌های سیستم اسکلتی و جذب جنین‌ها مشاهده و با آن مطابقت دارد.

پادمن هابان و همکاران (۲۰۰۳) گزارش نمودند که تجویز دوز ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از والپروات سدیم به موش در روز ۷ یا ۸ آبستنی باعث نقایص لوله عصبی (شکاف مهره) و اگزوسفالی می‌شود که با مطالعه حاضر هماهنگی دارد (۱۶).

کایلان و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی آثار والپروات سدیم در موش‌های صحرایی آبستن گزارش نمودند تجویز دارو در روز نهم

ورس در سال ۱۹۸۷ بیان نمود که تجویز والپروات سدیم با دوز ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روزهای ۱۸-۷ آبستنی در موش صحرایی باعث جذب شدن همه جنین‌ها می‌شود (۱۵) که در مطالعه ما نیز والپروات سدیم باعث جذب در ۱۱/۷۷ درصد از جنین‌ها گردید.

همچنین محقق فوق گزارش نمود که تجویز دوز ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از این دارو باعث ناهنجاری‌های سیستم اسکلتی و جذب ۵۲ درصدی جنین می‌شود که در نتایج این مطالعه نیز

عدم تعادل در تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اختلال در بروز شاخص‌های تنظیم‌کننده مانند عامل رشد تغییردهنده بتا ($TGF\beta$) و در نتیجه اختلال در بروز ژن‌های سیکل سلولی به‌عنوان دلایل احتمالی اثر عوامل ایمنولوژیک بر روی کاهش آثار ترانژنیک داروهای ترانژن معرف می‌گردند (۲۳-۲۵). رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی در واسطه‌گری سیستم ایمنی ذاتی ایفاء می‌نمایند. همواره یک تعادل فیزیولوژیک بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط بیولوژیک وجود دارد که به هم خوردن این تعادل منجر به ایجاد آسیب‌های سلولی می‌شود (۲۴). آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز که نقش همگی آن‌ها در واکنش انفجار تنفسی سلول‌های ایمنی ذاتی مشخص شده است، نقش مهمی را در ایجاد تعادل یادشده در فوق ایفاء می‌کنند (۴). این تئوری وجود دارد که نارسایی و کمبود مقادیر آنزیم‌های ذکرشده منجر به اختلال در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. لذا مطالعات متعددی نشان داده است که افزایش کاتالاز و سوپر اکسید دسموتاز به محیط کشت رویان یا در شرایط محیط زنده (In vivo) منجر به کاهش آثار عوامل ترانژن می‌گردد (۲۴). به‌نظر می‌رسد به‌وسیله داروهای آنتی‌اکسیدان بتوان وقوع ناهنجاری‌های مادرزادی را کاهش داد. از آنجایی که در مطالعات متعددی ثابت‌شده که کوارستین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است، در ادامه به برخی از مطالعات انجام‌شده در مورد خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظتی ناشی از کوارستین اشاره می‌شود.

محققین ثابت کردند که تجویز کوارستین با دوز پایین ۶۶ میلی‌گرم و دوز بالای ۳۳۳ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره موش‌های سفید کوچک آستن، ناهنجاری‌های جنینی ناشی از متیل نیتروز اوره را کاهش می‌دهد (۱۱). نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. این ممکن است به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی کوارستین در کاهش آسیب باشد.

در مطالعه‌ای که توسط لیانگ و همکاران صورت گرفته است بیان شده که اضافه نمودن کوارستین با دوز ۶۶ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره غذایی موش‌های سفید کوچک، ناهنجاری‌های اسکلتی جنینی ناشی از جیره با دوز بالای چربی‌های اشباع‌شده را کاهش می‌دهد (۲۶).

در مطالعه گوهری بهبهانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان شده است که تجویز کوارستین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی در روزهای هشتم تا دهم آستن ناهنجاری‌های ناشی از رتیونیک اسید را در جنین موش‌های صحرایی کاهش می‌یابد که نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۷).

آبستنی با دوز ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باعث ناهنجاری‌های اگزوسفالی و اسپاینایفیدا می‌شود (۲) که در این مطالعه نیز ناهنجاری‌های ذکر شده مشاهده گردید.

مینی گولا و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که تجویز والپروات سدیم با دوز ۱۵۰-۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در یکی از روزهای ۹ تا ۱۱ آستی در موش سفید کوچک و موش صحرایی باعث ناهنجاری‌هایی در جناغ، مهره‌ها و دنده می‌شود (۱۷) که نتایج آنها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

هروبوک و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که تجویز والپروات سدیم با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز هشتم آبستنی به موش سوری ایجاد ناهنجاری‌هایی نظیر اگزوسفالی، شکاف کام و کاهش وزن در جنین‌های ۱۷ روزه موش می‌شود (۱۸) که با نتایج مطالعه حاضر هماهنگی دارد.

در مطالعه خاکساری مهابادی و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان شده است که تجویز والپروات سدیم با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز هشتم و نهم آبستنی به موش صحرایی ایجاد ناهنجاری‌هایی نظیر اگزوسفالی، شکاف کام و کاهش وزن در جنین‌های ۲۰ روزه موش می‌شود (۱۹) که با نتایج مطالعه حاضر هماهنگی دارد.

ایهلرز و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند که تجویز والپروات سدیم با دوزهای ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و دوزهای بیشتر از آن به‌صورت داخل صفاقی در روز نهم آبستنی در موش باعث ایجاد اسپاینایفیدا می‌شود (۱۹) که این ناهنجاری در این مطالعه نیز مشاهده شد.

فایلیلا و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که تجویز دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش والپروات سدیم در روزهای هشتم و نهم آبستنی باعث کاهش وزن و ایجاد ناهنجاری‌های اسکلتی از قبیل شکاف کام، ناهنجاری در اندام مانند اسپاینایفیدا و ناهنجاری در دنده می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۰).

در برخی مطالعات، مشخص گردیده که تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از مکانیسم‌های بالقوه نقایص لوله عصبی ایجاد شده توسط والپروئیک اسید می‌باشد (۳ و ۲۱). کاوایی و آریزی در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که یکی از مکانیسم‌های ترانژن والپروئیک اسید تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد (۱۹). همچنین در مطالعه دیگری بیان شده است که یکی از علل کاهش وزن و رشد جنین‌ها، آثار تخریبی والپروات سدیم بر غشاءهای جفتی است که با نکروز سیتوتروفوبلاست، توقف تکثیر عروق خونی، کاهش قطر و انسداد عروق بند نافی همراه است (۲۲).

2. Cylan AN, Duru S, Ceylon, S. Valproic acid sodium-induced spina bifida occulta in the rat. *Neurosurg Rev* 2001;24:31-4.
3. Defoort EN, Kim PM, Winn LM. Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol* 2006;69:1304-10.
4. Gupta M, Gupta YG, Agarwal S, Aneja S, Kohli k. A randomized, double-blind, placebo controlled trial of melatonin add-on therapy in epileptic children on valproate monotherapy: effect on glutathione peroxidase and glutathione reductase enzymes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2004;58:542-7.
5. Tung EW, Winn LM. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol* 2011;80:979-87.
6. Etemad L, Moshiri M, Moallem SA. Epilepsy drugs and effects on fetal development: Potential mechanisms. *J Res Med Sci* 2012;17:876-81.
7. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: The rotterdam study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002;75:880-6.
8. Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 2004;25:647-59.
9. Decharneux T, Dubois F, Beauloye C, Wattiaux-DeConinck S, Waniaux R. Effect of various flavonoids on lysosomes subjected to an oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* 1992;44:1243-8.
10. Rice-Evans A, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived Polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995;22:375-83.
11. Prater MR, Zimmerman KL, Lee Ward D, Holladay SD. Reduced birth defects caused by maternal immune stimulation in methylnitrosourea-exposed mice: Association with placental improvement. *Birth Defects Research* 2004;70:862-9.
12. Menegola E, Broccia ML, Drenzo F, Giavini E. Comparative study of sodium valproate-induced skeletal malformations using single or double staining methods. *Reproduction Toxicology* 2002;16:815-23.
13. Paulson RB, Sucheston ME, Hayes TG, Paulson GW. Teratogenic effect of valproate in the CD-1 mouse fetus. *Arch Neurol* 1985;42:980-3.
14. Hrubec T, Yan Salafia C.M, Holladay S.D. Valproic acid-induced fetal malformations are reduced by maternal immune stimulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interferon-gamma. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006;288:1303-9.
15. Vorhees CV. Teratogenicity and developmental toxicological toxicity of alproic acid in rats. *Teratology* 1987;35:195-202.
16. Padmanabhan R, Shafiqullah M. Amelioration of sodium valproate-induced neural tube defects in mouse fetuses by maternal folic acid supplementation during gestation. *Congenit Anom (Kyoto)* 2003;43:29-40.
17. Menegola E, Broccia ML, Prati M, Giavini E. Stage-dependent skeletal malformations induce by valproic acid in rat. *Int J Biology* 1998;42:99-102.
18. Khaksary Mahabady M, Najafzadeh Varzi H, Ranjbar R, Rahgozar O. Prophylactic effects of melatonin on sodium valproate-induced neural tube defects and skeletal malformations in rat embryos. *American Journal of Applied Sciences* 2011;8:413-9.
19. Ehlers K, Stürje H, Merker HJ, Nau H. Valproic acid-induced spina bifida: A mouse model. *Teratology* 1992;45:145-54.

در مطالعه دیوایودی و همکاران بیان شده که تجویز کوآرستین با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی استرس اکسیداتیو ناشی از آرسنیک را در موش صحرایی کاهش می دهد (۲۸).

در مطالعه لیو و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان شده است که کوآرستین استرس اکسیداتیو ناشی از الکل در سلول های کبدی موش های صحرایی را کاهش می دهد (۲۹).

در مطالعه سیستانی کرم پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان شده که تجویز کوآرستین با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی در روزهای هشتم و نهم آستنی آثار مفیدی روی آنومالی های ناشی از تئوفیلین در جنین موش صحرایی دارد (۳۰) که در این مطالعه نیز کوآرستین با آثار مفید خود ناهنجاری های ناشی از والپروات سدیم را کاهش داد.

نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه اخیر همخوانی داشته و نشان دهنده توانایی کوآرستین در کاهش آسیب ناشی از عوامل اکسیداتیو باشد. براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر نقش کوآرستین در حذف آثار ناهنجاری زایی والپروات سدیم برای نخستین بار مشخص شد. نتایج این مطالعه نشان داد که والپروات سدیم با دوز ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز نهم آستنی باعث ایجاد انواع ناهنجاری ها از جمله شکاف کام، اگزسفال، باز بودن چشم و مهره شکاف دار در جنین موش صحرایی می شود و میانگین وزن و طول جنین ها را به طور معنی داری کاهش می دهد. کوآرستین نه تنها ناهنجاری اسکلتی ایجاد نکرده است بلکه درصد ناهنجاری های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم را هم کاهش داده است. درصد وقوع ناهنجاری های جنینی توسط کوآرستین با دوز ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نسبت به کوآرستین با دوز ۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیشتر کاهش یافته است ولی در مورد میانگین وزن جنین ها کوآرستین با دوز ۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مناسب تر از کوآرستین با دوز ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن است. بنابراین کوآرستین احتمالاً با اثر آنتی اکسیدانی خود می تواند جنین را در برابر آسیب ناشی از والپروات سدیم تا حدودی محافظت نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان به خاطر تأمین مالی این پژوهش اعلام می دارند.

References

1. Wu Gang, Nan C, Rollo JC, Huang X, Tian J. Sodium valproate-induced congenital cardiac abnormalities in mice are associated with the inhibition of histone deacetylase. *Journal of Biomedical Science* 2010;17:16

20. Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostic U, Hofmann C, Hustert E, et al. A mouse model for valproate teratogenicity: Parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Human Molecular Genetic* 2000;9:227-36.
21. Kawai Y, Arinze A. Valproic acid-induced gene expression through production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2006;66:6563-9.
22. Saxen L. Mechanisms of teratogenesis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1976;36:1-12.
23. Holladay SD, Sharova LV, Smith BJ, Gogal Jr RM, Ward DL, Blaylock BL. Nonspecific stimulation of the maternal immune system. Effects on teratogen-induced fetal malformations. *Teratology* 2000;62:413-9.
24. Winn LM, Wells PG. Maternal administration of superoxide dismutase and catalase in phenytoin teratogenicity. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26:266-74.
25. Abbott BD, Probst MR, Perdew GH, Buckalew AR. AH receptor, ARNT, glucocorticoid receptor, EGF receptor, EGF, TGF alpha, TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 expression in human embryonic palate, and effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Teratology* 1998;58:30-43.
26. Liang C, Oest ME, Jones JC, Prater MR. Gestational high saturated fat diet alters C57BL/6 mouse perinatal skeletal formation. *Birth Defects Research (Part B)* 2009;86:362-9.
27. Gohari Behbahani N, KhaksaryMahabady M, Ranjbar R, Najafzadehvarzi H, Mohammadian B. The effects of quercetin and retinoic acid on skeletal system of rat embryos in prenatal period. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2014; 16:29-34.[Persian].
28. Dwivedi N, Flora SJS. Dose dependent efficacy of quercetin in preventing arsenic induced oxidative stress in rat blood and liver. *Journal of Cell and Tissue Research* 2011;11:2506-611.
29. Liu S, Hou W, Yao P, Zhang B, Sun S, Nussler AK, et al. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 2010;24:516-22.
30. Sistani Karampour N, Arzi A, Najafzadeh Varzi H, Mohammadian B, Rezaei M. Quercetin preventive effects on theophylline-induced anomalies in rat embryo. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2014;9:e17834.[Persian].



Effect of Quercetin on Sodium Valproate Induced Neural Tube Defects and Skeletal Teratogenicity in Rat Embryos

Mahmood Khaksary Mahabady (Ph.D.)^{1*}, Mohammad Reza Gholami (Ph.D.)², Hossein Najafzadeh Varzi (Ph.D.)³, Abolfazl Zendehdel (Ph.D.)⁴, Zahra Lotfalian (D.M.)⁵

1- Dept. of Anatomy and Embryology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

2- Dept. of Anatomy, School of Medicine, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

3- Dept. of Pharmacology and Toxicology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

4- Dept. of Internal Medicine, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

5- School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

Received: 26 October 2014, Accepted: 27 December 2014

Abstract:

Introduction: Sodium valproate is the sodium salt of valproic acid and is an anticonvulsant used in the treatment of epilepsy. Teratogenic effects of sodium valproate were seen in some studies. There are many reports that the teratogenic effects of sodium valproate can be decreased by application of antioxidant drugs and stimulation of maternal immune system. It seems that quercetin has an antioxidant effect. The aim of this study was to determine protective effects of sodium valproate induced teratogenicity in fetuses of rat by quercetin.

Methods: This study was performed on 36 pregnant rats randomly assigned to 6 groups (6 rats in each group). The first group (control group) received normal saline intraperitoneally and the other groups (test groups) received sodium valproate (300 mg/kg), quercetin (75 mg/kg), quercetin (200 mg/kg), sodium valproate plus quercetin (75 mg/kg) and sodium valproate plus quercetin (200 mg/kg) intraperitoneally, respectively. Fetuses were carried out in 20th day of gestation, then weight and length of fetuses was determined; they were stained by Alizarin red- Alcian blue method and investigated by stereomicroscope for teratogenic effects.

Results: Percentage of cleft palate, spina bifida and exencephaly was 17.70%, 20% and 20%, respectively, in group which received only sodium valproate, while it was decreased to 13.95%, 11.62% and 13.95% by quercetin (75 mg/kg) and so to 11.11%, 11.11% and 11.11%, respectively, in the group which received quercetin (200 mg/kg).

Conclusion: quercetin can decrease incidence of teratogenicity induced by sodium valproate.

Keywords: Sodium valproate, Quercetin, Teratogenicity, Rats' Embryo.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Khaksary Mahabady, Email: mkhaksarymahabady@yahoo.com

Citation: Khaksary Mahabady M, Gholami MR, Najafzadeh Varzi H, Zendehdel A, Lotfalian Z. Effect of quercetin on sodium valproate induced neural tube defects and skeletal teratogenicity in rat embryos. Journal of Knowledge & Health 2015;10(3):36-44.