

مطالعه اثرات سیکلوسپورین گالنا بر جنین موش نژاد balb/c در طی زمانهای حساس حاملگی

نویسندگان:

علی شمس*

استاد ارولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مهدی جلالی

دانشیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

امیر علی آریان

دامپزشک و مسوول اطاق میوانات دانشگاه علوم پزشکی مشهد

سید محمد رضا پریزاده

استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

اسد... یغمائی

پزشک عمومی

تاریخ ارائه: ۸۴/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۸۵/۷/۱۰

Teratogenic Effects of Galena Cyclosporine on balb/c Mouse Embryo during Critical Period of Pregnancy

Abstract

Introduction: Fathernity and fertility is a tremendous desire of male and female patients with end stage renal disease (ESRD) after succesfully renal transplantation. Investigations have been shown that one out of fifty female patients, which underwent successful renal transplant, became pregnant. As some drugs are harmful and may have teratogenic effect, In this study the teratogenic effects of new cyclosporine (Galena) on pregnant mouse was investigated.

Methods and Material: In this experimental study 14 pregnant balb/c mice divided into three groups. Experimental group I with 5 pregnant mice received 20 mg/kg cyclosporin on days 7, 8, 9, 10 of gestation. Experimental group II with 5 pregnant mice received 30 mg/kg on the same days, and control group with 4 mice received the same volume of physiologic serum at the same time. On day 18th of gestation all pregnant mice were sacrificed by cervical dislocation and their fetuses were examined under microscope for congenital malformation. The weight and length of fetuses were also investigated.

Results: Our data revealed that there was no anomaly in the fetuses in both groups, but the median weight of fetuses were lower in experimental groups than control group (1.4 gr in group I versus 1.05 gr in group II and 1.6 gr in control group) ($p < 0/05$). In addition the median length of the fetuses was also lower in experimental groups in comparison with control group (2.3 cm in group I & II versus 2.4 cm in control group). Most placentas in experimental groups showed infarcted area on maternal site.

Conclusion: These data indicated that although Galena cyclosporine has no teratogenic effect on mouse balb/c fetus, consumption of cyclosporine during pregnancy results in intrauterine growth retardation.

Keywords: Cyclosporine, Fetus, Teratogenic, Balb/c mouse, Renal transplant

آدرس:

مشهد، بیمارستان قائم، گروه اورولوژی

تلفن: ۸۰۱۲۸۵۷ (۵۱۱) شماره: ۸۴۱۷۴۰۴ (۵۱۱)

پست الکترونیک: Shamsa@mums.ac.ir

مقدمه

امروزه پیوند اعضا به عنوان مناسب ترین روش در درمان بسیاری از اعضا که در معرض نارسائیهای غیر قابل برگشت قرار دارند به حساب می آید. این مهم نتیجه تحولات شگرفی است که در طی دو دهه اخیر در تکنولوژی امکانات آزمایشگاهی و داروئی و نیز جراحی به وقوع پیوسته است به گونه ای که پیوند کلیه یک جراحی معمولی در مراکز پزشکی پیشرفته می باشد. داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی به عنوان عاملی که در بقاء و ادامه عمر عضو پیوندی لازم است ضروری به نظر می رسد از طرف دیگر این داروها باید دارای حداقل اثرات جانبی و کمترین عوارض بر روی اعضاء مختلف فرد باشد و مهم تر این که باروری فرد بعد از گرفتن پیوند و در طی مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی حفظ گردد. مطالعات مختلف نشان داده است که تعداد زیادی از این داروها در طی حاملگی نباید مورد مصرف قرار گیرند و یا در صورت استفاده از آنها فرد نباید حامله شود (۵-۱). نظر به اینکه تعداد نسبتاً زیادی از گیرندگان پیوند را زنانی تشکیل می دهند که در سنین باروری بوده و اغلب آنها پس از دریافت پیوند، متقاضی بچه دار شدن می باشند لذا این موضوع انگیزه ای گردید تا اثرات یکی از مهم ترین داروها یعنی سیکلوسپورین را بر جنین موش سوری در حال تکامل، مورد مطالعه قرارگیرد. مطالعات قبلی نشان داده است که سیکلوسپورین تولیدی شرکت ساندوز فاقد آثار تراتوژنیک^۱ بر روی حیوانات آزمایشگاهی است (۱۱-۶). با توجه به اینکه اخیراً همین دارو بوسیله کارخانه گالنا کشور چک ساخته شده است و این مطالعه با هدف بررسی اثرات این داروی جدید بر جنین های در حال تکامل، موش انجام گرفت. تا به سئوالات زیر جواب داده شود.

- ۱- آیا مصرف این داروی جدید در طی حاملگی قادر به ایجاد ناهنجاری برجنین درحال تکامل میباشد؟
- ۲- در شرایطی که مصرف آن بیشتر از حد مجاز باشد اثرات آن چگونه است؟
- ۳- آیا مصرف آن در زمانهای حساس حاملگی دارای اثرات تراتوژنیک بیشتری است؟

روش کار

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۰ در آزمایشگاه هیستوشیمی و جنین شناسی دانشکده پزشکی مشهد انجام شده است.

این پژوهش در ۱۴ موش حامله نژاد balb/c با وزن تقریبی ۳۰-۲۵ گرم و ۱۳۴ جنین انجام پذیرفت که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی بیمارستان قائم (عج) مشهد تهیه شدند. موشها در درجه حرارت 20°C و سیکل تاریکی و روشنائی دوازده ساعته قرار داشتند. جهت استحصال جنین ها، سه موش ماده بالغ با یک موش بالغ نر در یک قفس قرار داده شدند. در صبح روز بعد موشهای ماده، از نظر پلاک مهبل مورد معاینه قرارگرفتند و با دیدن پلاک واژن، زمان صفر حاملگی برای آن تعیین گردید. سپس موشهای حامله به دو گروه تجربی و یک گروه کنترل یا شاهد تقسیم شدند.

موشهای حامله گروه تجربی که مجموعاً ده سر بودند به دو گروه تقسیم شدند در گروه اول تجربی داروی سیکلوسپورین به روش گاواژ به میزان 20 mg/kg در طی روزهای هفتم، هشتم، نهم و دهم حاملگی تجویز گردید. به موشهای تجربی گروه دوم نیز که تعداد آنها پنج سر بود، سیکلوسپورین با دوز یک و نیم برابر یعنی معادل 30 mg/kg در طی روزهای فوق تجویز گردید. سیکلوسپورین گالنا ساخت کشور چک بود که از طریق هلال احمر تهیه و در دسترس قرار گرفت. به موشهای حامله گروه شاهد که تعداد آنها ۴ سر بود در طی روزهای فوق با همان مقدار سرم فیزیولوژی به صورت خوراکی تجویز شد میزان تجویز دارو در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

1- Tratogenic

جدول ۱: توزیع فراوانی تجویز سیکلوسپورین در موشهای حامله مورد مطالعه ۱۳۸۰

نام گروه	تعداد کل جنین	تعداد موشهای حامله	میزان تجویز سیکلوسپورین	روزهای تجویز سیکلوسپورین
گروه تجربی یک	۴۷	۵	۲۰ mg/kg	۷، ۸، ۹، ۱۰
گروه تجربی دو	۴۹	۵	۳۰ mg/kg	۷، ۸، ۹، ۱۰
گروه شاهد	۳۸	۴	سرم فیزیولوژی	۷، ۸، ۹، ۱۰

نتایج

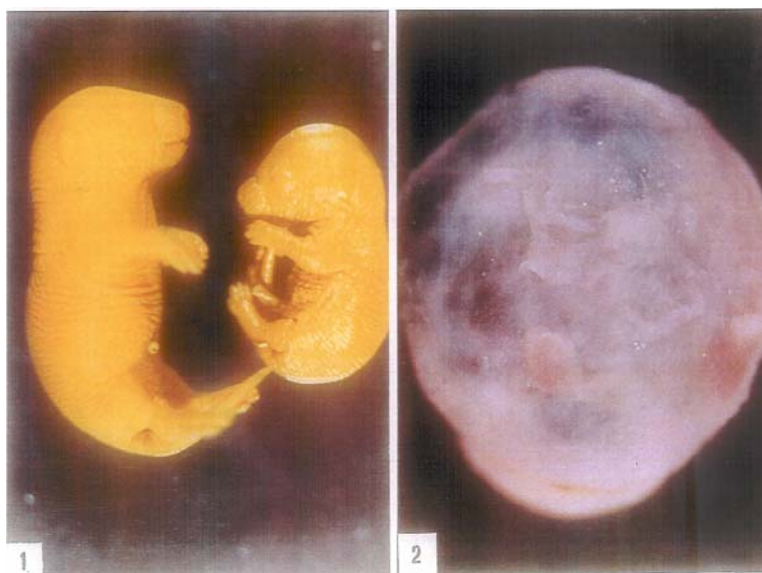
بدنبال بررسیهای میکروسکوپی که بر روی نمونه های گروههای تجربی و شاهد انجام گرفت هیچگونه ناهنجاری ظاهری در اندام ها، ناحیه سر و صورت و اسکلت جنین ها مشاهده نشد، آنچه در گروههای تجربی یک و دو بطور واضح و مشخص دیده شد تاخیر رشد جنینی^۴ (IUGR) در مقایسه با گروه شاهد بود (تصویر شماره ۱).

در روز هیجدهم حاملگی، موشهای حامله گروههای شاهد و تجربی به روش جدا کردن سر^۲ کشته شدند. پس از باز کردن جدار شکم و رحم، جنینها در هر طرف شمارش شده و جهت بررسی از نظر ناهنجاری ظاهری به داخل پتری محتوی سرم فیزیولوژی منتقل شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ استرنو مورد بررسی دقیق قرار گرفتند. بررسی میکروسکوپی که در آزمایشگاه جنین شناسی دانشکده پزشکی مشهد صورت گرفت شامل مشاهده دقیق اندام ها از نظر طول، تعداد انگشتان و قرینه بودن آنها بود. ضمنا سر و صورت خصوصا لب ها و دهان و کام، دم جنین ها و تنه از نظر وجود ناهنجاری یا عدم آن مورد بررسی دقیق قرار گرفتند. همزمان جنین ها اعم از جنین های گروه های تجربی و شاهد از نظر وزن و طول از ناحیه فرق سر تا دنبالچه (CRL)^۳ مورد بررسی قرار گرفتند. سپس نمونه ها با فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند. مشخصات موشها، نتایج مشاهده میکروسکوپی و آزمایشات جنین در پرسشنامه و فرم مشاهده ثبت گردید.

نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی و آزمون (توکی) جهت تعیین اختلاف بین وزن و قد جنینها در گروههای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

4- Intrauterin growth retardation

2- Cervical dislocation
3- Crown to rump length



شکل ۱: نمای طرفی یک جنین گروه تجربی (سمت راست) در مقایسه با جنین گروه شاهد (سمت چپ) تاخیر رشد در گروه تجربی کاملاً مشهود است.

شکل ۲: نمای سطح مادری یک جفت مربوط به گروه تجربی، نقاط سفید رنگ انفارکتوس جفتی را نشان میدهد.

میانگین وزن در گروه تجربی شماره یک در حدود ۱/۴ گرم بود در حالیکه میانگین آن در گروه تجربی دو حدود ۱/۰۵ گرم و در گروه شاهد ۱/۶ گرم بود. از طرف دیگر میانگین طول جنین در گروه تجربی یک و دو حدود ۲/۱۳ سانتی متر بود در حالیکه میانگین طول در گروه شاهد حدود ۲/۴ سانتی متر بود (جدول شماره).

جدول ۲: توزیع فراوانی وزن، طول جنین موشهای حامله مورد مطالعه

نام گروه	تعداد کل جنین	درصد ناهنجاری	وزن جنین ها بر حسب گرم میانگین ± انحراف معیار	طول جنین C.R. (سانتی متر) میانگین ± انحراف معیار
گروه تجربی یک	۴۷	-	۱/۴ ± ۰/۱۲ *	۲/۱۳ ± ۰/۰۹ *
گروه تجربی دو	۴۹	-	۱/۰۵ ± ۰/۱۶ *	۲/۱۳ ± ۰/۱۳ *
گروه تجربی شاهد	۳۸	-	۱/۶ ± ۰/۱۷	۲/۴ ± ۰/۱۷

* p < ۰/۰۵

بحث

یکی از داروهای مهم سرکوب کننده ایمنی، سیکلوسپورین می باشد که معمولاً بعد از هر پیوند کلیه بکار می رود سیکلوسپورین یک آنتی بیوتیک پپتیدی قابل حل در چربی می باشد که از قارچی به نام

در بیشتر جفت های مربوط به گروه های تجربی در سطح مادری جفت ها، انفارکتوس هایی ناشی از رسوب مواد فیبرینوئید به صورت نقاط سفید رنگ بر روی عروق به چشم می خورد در حالیکه این ویژگی در گروه شاهد دیده نشد (تصویر شماره ۲). همچنین در هیچ یک از گروه های تجربی و شاهد، جنین های جذب شده مشاهده نشد.

راحتی از سد جفت عبور نموده و با تاثیر مستقیم بر روی ارگانهای در حال تکامل جنین از جمله غدد درون ریز موجبات تاخیر رشد را فراهم نمایند (۱۵،۱۳،۱).

نتیجه گیری

مصرف سیکلوسپورین گالنا در طی حاملگی ناهنجاریهای جنینی ایجاد نمی کند، ولی توصیه می شود که تجویز دارو در طی حاملگی با احتیاط انجام شود و حتی الامکان دوز مصرفی در طی این دوران کمتر از دوز مصرفی آن در دوران غیر بارداری باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در غالب یک پایان نامه تحقیقاتی انجام پذیرفت و هزینه های مربوط به آن را معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تامین نموده است که بدینوسیله تشکر و سپاسگزاری می شود. همچنین از آقای محمدرضا موحدیان فر و سرکار خانم متجدد تکنسین آزمایشگاه جنین شناسی که در امور تکنیکی فعالیت صمیمانه ای داشته و خانم حسینی و خانم یاقوتی به منظور تایپ مقاله تشکر می شود.

پلی اسپروم تریکودرما^۵ بدست می آید. این دارو بر روی

لنفوسیت های T اثر کرده و باعث مهار تولید IL2 و کلسی نورین می گردد (۱۸-۱۵، ۸، ۴، ۲، ۱). این دارو که ساخت کارخانه ساندوز می باشد اولین بار بوسیله کالن^۶ در سال ۱۹۷۸ مورد استفاده قرار گرفت و نتایج موفقیت آمیزی داشت.

نتیجه تحقیق حاضر نشان داد که مصرف سیکلوسپورین تولیدی کارخانه گالنا حتی در زمانهای حساس حاملگی دارای پتانسیل ایجاد ناهنجاری نمی باشد و برای حصول اطمینان در این زمینه حتی دارو با دوز یک و نیم برابر معمول یعنی ۳۰ mg/kg تجویز گردید و مشخص شد که حتی با این مقدار نیز ناهنجاری دیده نشد. این نتیجه با نتایج بدست آمده توسط دیگر محققین مطابقت دارد (۱۴-۹). بعد دیگری که در این پژوهش مورد توجه قرار داشت اثرات این دارو بر رشد طبیعی جنین بود. نتایج نشان داد که بدنبال تجویز سیکلوسپورین به موشهای حامله، تاخیر رشد تقریباً در تمام جنین ها بروز کرد. و این تاخیر شامل کاهش وزن و طول جنین ها بود که در جدول شماره ۲ به آن اشاره شده است و در هر دو گروه تجربی به شکل معنی داری در مقایسه با گروه شاهد به چشم می خورد ($p < 0/05$). در ارتباط با علت این تاخیر رشد توجیحات مختلفی وجود دارد که از جمله می توان به مشکلات خونسازی به جنین بدنبال مصرف سیکلوسپورین توسط مادر اشاره نمود به علاوه در بررسیهای جفت گروههای تجربی، انفارکتوسهای جفتی متعددی به چشم می خورد که این ویژگی احتمالاً در اختلال نقل و انتقال مواد غذایی و متابولیت ها تاثیر داشته و می تواند موجب تاخیر رشد شود (۱۴،۱۲،۱۰). از طرف دیگر ممکن است خود سیکلوسپورین و یا متابولیت های حاصل از آن به

5- Trichoderma Polysporum

6- Sir Roy Calne

خلاصه

مقدمه: بیماران مبتلا به بیماری پیشرفته کلیه بعد از پیوند موفق کلیه، تمایل شدید به داشتن فرزند و باروری دارند. مطالعات نشان داده است که از هر ۵۰ بیمار زن که پیوند موفق کلیه دارند یک نفر حامله می شود. چون برخی از داروها (در حین حاملگی) مضر می باشند و ممکن است اثرات تراتوژنیک داشته باشند لذا در این مطالعه، اثرات تراتوژنیک سیکلوسپورین جدید «گالنا» روی موش حامله بررسی شده است.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۱۴ موش حامله balb/c به سه گروه تقسیم شدند. گروه تجربی یک شامل ۵ موش حامله بود که در روزهای ۷، ۸، ۹ و ۱۰ حاملگی ۲۰ میلی گرم به ازاء هر کیلو گرم وزن، سیکلوسپورین دریافت کردند. گروه تجربی دو، شامل ۵ موش حامله بود که در روزهای فوق ۳۰ میلی گرم سیکلوسپورین به ازاء هر کیلوگرم، دریافت کردند.

گروه شاهد شامل ۴ موش حامله بود که در روزهای فوق حجم مساوی از سرم فیزیولوژی دریافت نمودند. در روز هجدهم حاملگی موشهای حامله را با روش جدا کردن سر نابود کردیم و جنین های آن ها را از نظر ناهنجاری های مادرزادی با میکروسکوپ مطالعه کردیم. وزن و طول جنس ها را نیز بررسی کردیم. **نتایج:** مدارک ما نشان می دهد که در هیچ یک از دو گروه ناهنجاری مشاهده نشد ولی میانگین وزن جنین ها در گروه تجربی کمتر از گروه شاهد بود (۱/۴ گرم در گروه یک، ۱/۰۵ گرم در گروه دو و ۱/۶ گرم در گروه شاهد) ($p < 0/05$). علاوه بر این، میانگین طول جنین ها در گروه های تجربی در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود (۲/۱۳ سانتی متر در گروه ۱ و ۲ و ۲/۴ سانتی متر در گروه شاهد). بیشتر جفتهای دو گروه تجربی دارای مناطق انفارکتوس در سمت مادر بودند. **نتیجه گیری:** این یافته ها نشان می دهد که اگر چه سیکلوسپورین (گالنا) اثر تراتوژنیک بر جنین موش balb/c ندارد ولی مصرف آن در حاملگی، منجر به تاخیر رشد داخل رحمی می گردد.

کلمات کلیدی: سیکلوسپورین، جنین، تراتوژنیک، موش balb/c، پیوند کلیه

References:

1. Jurgen Bommer. Transplantation. In: Stewart Cemeran, et al. Oxford textbook of clinical nephrology. 1st ed. Oxford: Oxford medical publication; 1992, pp 1560-66.
2. Manikkam Suthanthiran, Terry storm, Randall Morris. Transplantation immunobiology. In: Walsh P, Retik, Vaughan D, Wein A. CAMPBLL 's Urology. 7st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997, pp 505-530.
3. Rezzani R, Rodella L, Bianchi R. Cyclosporine and pregnancy in rat. Transplantation 1997; 15: 63 (1) 164(7).

4. Thoma AG, Burrows L, Knight R. Effect of Cyclosporin on pregnancy in renal allograft patients. *Obstet Gynecol* 1997; pp,916-919.
5. Little BB. Immonosuppressive therapy during gestation. *Semin perinatol*; 1997. pp 143-148.
6. Ramsey, Goldman R, Schilling E. Immonosuppressive drugs use during pregnancy. *Rheum Dis Clin North – Am* 1997; pp 146-167.
7. Gughan WJ, Moritz MJ, Randomski JS, Burk JF. Armenti National transplantation pregnancy Registry on outcomes in cyclosporin treated female kidney transplant recipients with an internal from transplant to pregnancy of greater than five years. *American Journal Kidney Disease* 1996; pp 266-269.
8. Armenti VT, Ahiswede KM, Cater JR, Jarvell BB. Variable detecting brith weight and graft survival in 197 pregnancies in cyclosporine treated female kidney transplant recipient. *Transplantation* 1995; pp 476-9.
9. Batiuk TD, Urmsom J, Vincent D, Yatscoff RW, Halloran. Quantitating immunosuppression estimating the 50% inhibitory concentratin for in vivo cyclosporin in mice. *Transplantation*. 1996; 15: 61 (11), 1618-24.
10. McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Cambell E, Ryan MP. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2005, 20(10):2215-25.
11. Brown PAJ, Gray ES, Whiting PH, Simpson JG, Thomson AW. Effect of cyclosporin a on fetal development in the rat. *Bioneonate* 1985, pp 142.
12. European Multicentre Trial Group. Cyclosporin in Cadaveric renal transplantation: one year follow up of a multicentre trial. *Lancet* 1986; pp 1993.
13. Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 2005, 167(2): 395-407.
14. Pickrell MD, Sawers R, Michael J. Pregnancy after transplantation. *BMJ* 1988; pp 825.
15. Ross WB, Richards T, Williams GL, Salaman JM. Cyclosporine and pregnancy. *Transplantation* 1988; 1142.
16. Barry JM. Renal transplantation. In: walsh P, Campbel's urology, 8th ed, Philadelphia: W.B. Saunders; 2002. PP.345-376.
17. Xu J, Zheng SS, Liang TB, Xie HY, Shen KZ, Feng XW, et al. Effect of ciclosporin A on the organogenesis and function of embryonic metanephroi allografted into adult rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 18;85(18):1238-42.

18. Leventhal L, Sortwell CE, Hanbury R, Collier TJ, Kordower JH, Palfi S. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(10):2215-25.

Archive of SID