

بررسی اثر داروهای والپورات سدیم و فولیک اسید بر وزن و تکامل اندامهای جنین موش*

معصومه زیرک جوانمرد^۱، دکتر فرحناز نوروزنی نیا^۲، دکتر زهرا یکتا^۳

چکیده

- **مقدمه:** والپوریک اسید، اسید چربی است که معمولاً بصورت والپورات سدیم تجویز شده و یکی از داروهای مهم ضد صرع محسوب می شود. این دارو در انسان، موش، رات و میمون خواص تراژونیک دارد. تحقیقات انجام شده نشانگر این است که والپورات سدیم باعث کاهش وزن و بروز بد شکلی در اندامها می شود. این اسید از بروز ناهنجاریهای جنینی جلوگیری نموده و والپورات با متابولیسم فولات جنین مقابله می کند.
- **مواد و روشها:** در این تحقیق تأثیر والپورات سدیم و فولیک اسید بر وزن و تکامل اندامهای جنین موش در دو گروه آزمایشی بررسی شد. موشهای باردار گروه آزمایشی I در روز هشتم بارداری ۲۰۰mg/kg والپورات سدیم بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. موشهای باردار گروه آزمایشی II همزمان ۲۰۰mg/kg والپورات سدیم و ۴mg/kg فولیک اسید تحت همان شرایط دریافت نمودند. در روز سیزدهم جنینی، جنینها از رحم خارج شده و از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند.
- **یافته ها:** والپورات سدیم باعث کاهش وزن جنینها و تأخیر در رشد اندامهای جنین موش بصورت بیرون زدگیهایی در ناحیه جانبی شکمی جنین می شود. میانگین وزن در گروه شاهد (۰/۰۸۶ gr) در گروه VPA ۱ (۰/۰۲۱ gr) و در گروه FA۲ و VPA (۰/۰۶۱۹ gr) می باشد. با $P < ۰/۰۵$ اختلاف معنی داری بین گروههای شاهد و آزمایشی I و همچنین آزمایشی I و II دیده می شود. اسید فولیک می تواند از بروز کاهش وزن و ناهنجاری جوانه اندام جلوگیری کند.
- **نتیجه گیری:** کاهش وزن جنینها و ایجاد ناهنجاری در اندامها عمدتاً مربوط به آثار تخریبی VPA بصورت کاهش تکثیر عروق خونی و شرایط تغذیه ای نامناسب جنین است. والپورات باعث ایجاد جهش در آنزیم 10-5 methylene hydrofolate reductase شده و متعاقب این جهش، کاهش وزن و ناهنجاری اندام مشاهده می شود. کافی نبودن اسید فولیک باعث تأخیر در رشد داخل رحمی جنین می گردد.
- **واژه های کلیدی:** والپورات سدیم، فولیک اسید، جنین موش

* تاریخ وصول مقاله: ۸۲/۱۱/۳ - تاریخ پذیرش مقاله ۸۴/۳/۱۸

۱- مری گروه آناتومی، دانشکده پزشکی ارومیه (مؤلف مسؤول)

۲- استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی ارومیه

۳- استادیار گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی ارومیه

مقدمه

هر چند مکانیسم ملکولار سدیم والپورات در چگونگی ایجاد ضایعات جنینی کاملاً مشخص نشده، ولی مقابله این دارو با متابولیسم فولیک اسید مسلم شده و می‌تواند در زمینه درک عملکردهای احتمالی مربوطه راهگشا باشد (۶).

دریافت ۲۶۰ mg/kg (۳mmol) والپورات سدیم باعث افزایش هموسیتین پلاسما می‌شود، لیکن مصرف همزمان ۴mg/kg فولیک اسید، این افزایش را جبران نموده و میزان آن را به حد طبیعی می‌رساند (۷). بروز کاهش وزن جنینها و همینطور جذب جنینها در طول رحم با مصرف ۳۰۰ mg/kg والپورات طی روزهای ۸ و ۹ و ۱۰ جنینی نشان دهنده آثار تراژدیکی این دارو و همچنین تداخل آن با چرخه فولیت است (۸).

ذکر این نکته لازم است که اسید فولیک برای رشد طبیعی، تولید پورین، پیریمیدین، تیمیدین و سوخت و ساز اسیدهای آمینه خاصی لازم است. لذا کمبود فولات قطعاً منتهی به اختلال در تقسیم سلولی و عدم رشد طبیعی خواهد شد. کافی نبودن اسید فولیک مادران باردار باعث تولد نوزادان نارس، تأخیر رشد داخل رحمی و ایجاد جهش در آنزیم 10-5 methylene tetra hydrofolate reductase می‌شود (۹).

تحقیق انجام شده در دو منطقه شمالی و جنوبی کشور چین نشان می‌دهد که با مصرف روزانه ۴۰۰ kg فولیک اسید طی سه ماهه اول بارداری کاهش ناهنجاریهای جنینی مربوطه ۸۰٪ می‌باشد (شماره ۱۰). تحقیق حاضر با هدف مطالعه آثار والپورات سدیم و اسید فولیک در جنین موش انجام شده است.

مواد و روشها

موشهای بالغ نر و ماده «Swiss White» که از دانشکده پزشکی ارومیه تهیه شده بودند، به مدت دو هفته جدا از یکدیگر نگهداری شدند تا به محیط حیوانخانه عادت کنند. حرارت حیوانخانه در طول مدت نگهداری حدود

ناهنجاریهای مادرزادی بعنوان نواقص ساختمانی آشکار در موقع تولد تعریف شده‌اند. مکانیسم احتمالی تراژونها عبارتند از مرگ سلولی بیشتر از قدرت ترمیم جنین، تأخیر در میتوز، کند کردن یا توقف تمایز سلولی، مهار مهاجرت سلولی و مکانیسمهای بیوشیمیایی دیگر (۱).

والپورئیک اسید از داروهای ضد صرع می‌باشد و بیش از ۲۰ سال است که تحقیق در زمینه بروز ناهنجاریهای جنینی ناشی از مصرف این دارو توسط مادران باردار آغاز شده و هم اکنون نیز با جدیت تمام پیگیری می‌شود.

طبق گزارشها مصرف ۲۲۵ mg/kg در سال ۱۹۷۹ با بکار بردن سدیم والپورات به صورت خوراکی در موش، طی روزهای ۱۲-۷ بارداری باعث جذب جنینها به میزان ۴۹٪ می‌شود (۲).

افزودن ۱۰۰ mg/ml والپورات سدیم به محیط کشت جنینهای ۹/۵ روزه به مدت ۴۸ ساعت منجر به بروز اسپانیا بیفیدا، کاهش رشد جنینها و مرگ آنها به میزان ۹۰٪ شده است (۳).

کاهش وزن نوزادان موشهای MF₁ به دنبال دریافت ۶۰۰ mg/kg والپورات در روز هشتم بارداری نیز گزارش شده است (۴). مطالعات بالینی در نمونه‌های انسانی نیز حاکی از آثار تخریبی این داروست. تحقیق روی ۲۵۰ نوزادی که مادران آنها طی دوران بارداری سدیم والپورات مصرف نموده‌اند حاکی است که حدود ۱۰٪-۷٪ ناهنجاری به صورت نقص در رشد، اسپانیا بیفیدا و ناهنجاریها ناحیه سر و صورت می‌باشد (۵). قدر مسلم مصرف والپورات سدیم باعث بروز ناهنجاریهایی در لوله عصبی، سر و صورت، جوانه اندام و قلب می‌شود. هم اکنون مطالعات بیشتر در زمینه علت بروز این نقائص و عوامل بر طرف کننده آنهاست.

محلول بوئن به مدت یک هفته الی ۱۰ روز نگهداری شدند.

بعد از گذشت این مدت، جنینها از محلول فیکساتیو خارج و با استفاده از دستگاه استروئوماکروسکوپ تغییرات جنینها مورد بررسی قرار گرفته و ثبت گردید. جهت بررسی تغییرات میکروسکوپی ۲۱ جنین از گروه شاهد و ۲۱ جنین از گروه آزمایشی بطور تصادفی انتخاب و بعد از پاساژ و بلوک گیری، برشهای سریال ۶ میکرونی از ناحیه سر تا دم جنینها تهیه و به طریقه "H&E" رنگ آمیزی شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و استفاده از Fisher's Exact Test آزمون ANOVA و آزمون من ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه به شرح ذیل می‌باشد:

۱- مقایسه وزن جنینها

وزن جنینها قبل از فیکسسیون کامل اندازه گیری شد. سپس تفاوت میانگین وزن در سه گروه مورد بررسی آماری قرار گرفت. میانگین وزن در گروه شاهد $(\pm 0/11)$ (gr) $0/086$ ، در گروه آزمایش یک $(\pm 0/37)$ (gr) $0/021$ و در گروه آزمایش دو $(\pm 0/07)$ (gr) $0/0619$ بود.

با $P < 0/05$ اختلاف معنی داری بین گروههای شاهد و آزمایشی (۱) و همینطور آزمایشی (۱) و (۲) وجود دارد. به نظر می‌رسد سدیم والپورات تأثیر قابل توجهی بر کاهش وزن جنینها داشته و در مقابل اسید فولیک قدرت مقابله با این نقص را دارا بوده و در جهت جبران آن بسیار موفق بوده است (جدول ۱).

۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد بود و موشها حدود ۱۲ ساعت در تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنایی قرار داشتند.

در مرحله Coupling موشهای نر و ماده به صورت یک به دو در هر قفس کنار هم قرار داده شدند، سپس با تشخیص پلاک واژنیال، آن روز به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. در ابتدا میزان 3 mmol (۲۶۰ mg/kg) والپورات سدیم و 4 mg/kg فولیک اسید را به عنوان دوز مصرفی انتخاب کردیم (۷). با تزریق 260 mg/kg والپورات جذب جنینها بطور قابل توجهی افزایش یافت. در مورد تعداد اندکی که جذب نشدند به دلیل اندازه بسیار کوچک قادر به مطالعه با دستگاه استریو ماکروسکوپ نشدیم.

با کاهش تدریجی دوز، بطوری که جنینها قابل مطالعه با این دستگاه باشند نهایتاً 200 mg/kg در نظر گرفته شد. موشهای باردار بطور جداگانه و تحت شرایط ذکر شده در بالا تا روز ۸ بارداری نگهداری شدند. ۱۰ مادر باردار در روز هشتم حاملگی به عنوان گروه شاهد تحت تزریق آب مقطر استریل قرار گرفتند به ۱۰ مادر باردار دوز 200 mg/kg والپورات سدیم و به ۱۰ مادر دوز 4 mg/kg محلول اسید فولیک و 200 mg/kg والپورات سدیم در روز هشتم بارداری تزریق شد.

در روز ۱۳ بارداری، موشهایی که تحت تزریق قرار گرفته بودند و نیز موشهای شاهد و تزریق شده توسط حلال، بوسیله ایجاد دررفتگی در ناحیه گردن (Cervical dislocation) کشته شده و جنینها همراه با رحم خارج شدند. سپس رحم به مدت ۳۰ دقیقه داخل محلول فیکساتیو بوئن نگهداری شده و در مرحله بعد جنینها از رحم خارج شده و پس از خشک کردن با کاغذ صافی، وزن آنها اندازه گیری و سپس داخل

جدول (۱) مقایسه میانگین وزن جنینها در سه گروه مورد بررسی (۱۳ روزه) پس از تزریق

سدیم والپروئیک (VPA) و اسید فولیک $P < 0.05$

گروهها	شاهد	آزمایشی (۱)	آزمایشی (۲)	معنی داری گروههای شاهد و آزمایشی ۱	معنی داری گروههای شاهد و آزمایشی ۲	معنی داری گروههای آزمایشی ۱ و ۲
میانگین وزن	۰/۰۸۶	۰/۰۲۱	۰/۰۶۱۹	×	-	×
انحراف معیار	± 0.0037	± 0.007	۰/۰۱۱	×	-	×
قطر طناب نافی (mm)	۰/۶۱	۰/۲۸	۰/۴۹	×	-	×
تعداد کل	۲۱	۲۱	۲۱			

اختلاف معنی داری بین گروههای شاهد و آزمایشی یک همینطور گروههای آزمایشی یک و دو وجود دارد.

افزایش می یافت بطوری که در دوز ۲۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم والپورات سدیم جنینها قابل مطالعه نبودند. آمار نشان می دهد که $P < 0.05$ اختلاف معنی داری بین گروههای شاهد و آزمایشی (۱) و آزمایشی (۲) وجود دارد. سدیم والپورات جذب جنینها را افزایش داده و اسید فولیک توانسته بود جنینها را به سطح نرمال نزدیکتر کند. (جدول ۲، نمودار ۱).

۲- جنینهای جذب شده

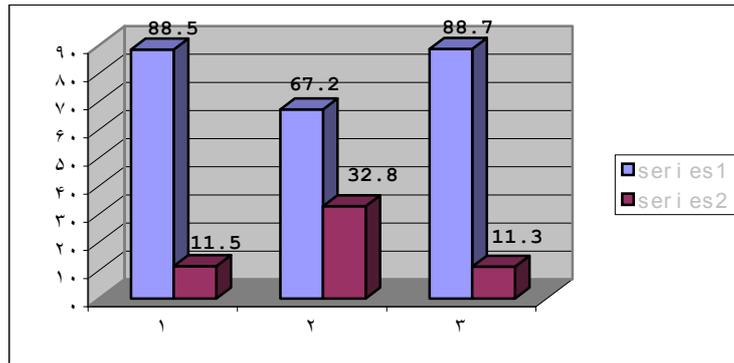
جذب جنینها در هر سه گروه مورد مطالعه مشاهده شد، لیکن در موشهایی که تحت تزریق والپورات سدیم قرار گرفتند، میزان جذب بسیار مشهود بود. جایگاه جذب بیشتر در دو انتهای رحم متمرکز بود و با افزایش دوز والپورات سدیم، این میزان به طور قابل توجهی

جدول (۲) مقایسه میزان جذب جنینها در سه گروه مورد بررسی (۱۳ روزه) متعاقب

تزریق سدیم والپروئیک (VPA) و اسید فولیک

گروهها	شاهد	آزمایشی (۱)	آزمایشی (۲)	معنی داری گروههای شاهد و آزمایشی ۱	معنی داری گروههای شاهد و آزمایشی ۲	معنی داری گروههای آزمایشی ۱ و ۲
نوع ناهنجاری		(VPA)	(F.A)	شاهد و آزمایشی ۱	شاهد و آزمایشی ۲	آزمایشی ۱ و ۲
تعداد جذب جنینها	۹	۱۹	۷	×	-	×
در صد	(۱۱/۵)	(۳۲/۸)	(۱۱/۳)	$P = 0.003$	$P = 1.000$	$P = 0.003$
تعداد کل جنینها	۷۸	۵۸	۶۲			

اختلاف معنی داری بین گروههای شاهد و آزمایشی یک همینطور گروههای آزمایشی یک و دو وجود دارد.



نمودار (۱) مقایسه میزان جذب جنینها در سه گروه مورد بررسی اختلاف معنی دار بین گروههای شاهد و آزمایشی ۱ و گروههای آزمایشی ۱ و ۲ وجود دارد $P < 0.05$

۳- ناهنجاری جوانه اندام در گروه شاهد اندامها کاملاً شکل گرفته و در ناحیه دست، انگشتان توسط شیار بین انگشتی از هم جدا شده اند (تصویر ۱). ضمناً در مطالعات میکروسکوپی، تراکمی از سلولهای مزانشیمی جهت تشکیل استخوانهای ناحیه دست دیده می شود، این سلولها هنوز به غضروف تبدیل نشده بودند. در گروه آزمایشی (۱) صفحات دست و پا بوسیله تنگی حلقوی از بخشهای نزدیک جدا شده (تصویر ۲)، مجموعه ایی از سلولهای یکنواخت مزانشیمی دیده می شد که فضای اندام را پر کرده بود و هیچ علائمی از شیار بین انگشتان و تشکیل مراکز استخوانی انگشتان

دیده نمی شد. در گروه آزمایشی (۲) شیارهای بین انگشتان واضح و بخشهای بازو و ساعد نسبت به گروه آزمایشی (۱) طولتر بوده و در مطالعات میکروسکوپی شیار بین انگشتان نیز دیده می شد. در مجموع چنین بنظر می رسد از جهت رشد اندامها، گروه آزمایش (۲) بسیار نزدیک به گروه شاهد می باشد (تصویر ۳). اختلاف معنی دار بین گروههای شاهد و آزمایشی (۱) و گروههای آزمایشی (۱) و (۲) وجود دارد، بطوری که سدیم والپورات نقص اندامها را افزایش داد و فعالیت اسید فولیک در جهت رفع نواقص اندام موجب تاثیر بوده است (جدول ۳).

جدول (۳) مقایسه میزان وقوع ناهنجاری نقص اندام در سه گروه مورد بررسی

گروهها	شاهد	آزمایشی (۱)	آزمایشی (۲)	معنی داری گروههای	معنی داری گروههای	معنی داری گروههای
نوع ناهنجاری	(VPA)	(F.A)		شاهد و آزمایشی ۱	شاهد و آزمایشی ۲	آزمایشی ۱ و ۲
تعداد نقص اندامها	۱۸	۳	۰	×	-	×
درصد	(۸۵/۷)	(۱۴/۳)	(۰)			
تعداد کل	۲۱	۲۱	۲۱			

اختلاف معنی داری بین گروههای شاهد و آزمایشی یک و همچنین گروههای آزمایشی یک و دو وجود دارد.

بحث

ضایعه در تحقیقات انجام شده نیز گزارش شده است. کاهش وزن، مربوط به آثار تخریبی والپورات سدیم بر غشاهای جفتی است که با نکروز سیتوتروفوبلاست،

بر اساس نتایج این مطالعه، وزن جنینها تحت تأثیر والپورات سدیم کاهش معنی داری را نشان داد. این

خود اثر القایی داشته و باعث تکثیر سریع سلولها و عدم تمایز آنها می‌شود که این عوامل منجر به تشکیل دومین منطقه بنام «منطقه پیشرفت» (PZ) می‌گردد. این منطقه برای رشد اندامها از نزدیک به دور لازمست و «نهایتاً شکل‌پذیری قدامی، خلفی اندام نیز توسط «منطقه فعالیت قطبی (ZPA)» که در حاشیه خلفی اندام است تنظیم می‌شود (۱۳). بنظر می‌رسد والپورات سدیم روند طبیعی رشد اندامها را مختل می‌کند. جبران این نقص با تزریق همزمان اسید نشان می‌دهد که این ماده برای رشد طبیعی جنین لازم است؛ چرا که تولید اسید آمینه‌های خاصی مانند تیمیدین و پورین با دخالت اسید فولیک انجام می‌شود (۹).

RFC (Reduced folate carrier) یکی از بزرگترین پروتئین‌هایی است که در انتقال فولیت دخیل بوده و بطور طبیعی در جفت و کیسه زرده طی روزهای ۹-۱۱/۵ جنین در موش قابل تشخیص است. این پروتئین برای رشد طبیعی جنینها لازم است و در تراکمهای سلولی مربوط به ناحیه لوله عصبی، سر و صورت و جوانه اندام متمرکز شده، لذا موتاسیون در ژن RFC یا کم بودن مصرف فولیت منجر به ایجاد نقص در این نواحی می‌شود. در تحقیقات انجام شده تاکنون ثابت شده که مناطق حساس برای آثار سوء والپورات سدیم همین مراکزی است که تمرکز پروتئین RFC در آنجا وجود دارد. بنظر می‌رسد کمبود اسید فولیک متعاقب مصرف والپورات سدیم، بر سلولهای جوانه اندام تأثیر گذاشته حتی مرگ سلولی طبیعی را در منطقه ستیغ اکتودرم راسی جهت تشکیل انگشتان به تأخیر می‌اندازد (۱۴).

ضرورت مصرف قرصهای والپورات سدیم در مادران باردار و نیز مسلم بودن این امر که این دارو از طریق جفت به جنین منتقل شده و ناهنجاریهای متعددی را با درصد بالا ایجاد می‌کند، موجب بروز نگرانی‌های شدید در این طیف می‌شود. مصرف روزانه

توقف تکثیر عروق خونی، کاهش قطر و حتی انسداد عروق بند نافی همراه است. این عوامل باعث تغییر شرایط تغذیه‌ای و هموستاتیک در تکامل جنینها می‌شود و همچنین کاهش سطح تبدلات بین مادر و جنین را بدنبال دارد که می‌تواند سبب کاهش وزن آنها گردد (۲). کاهش میزان DNA و پروتئین علت احتمالی دیگر در مورد کم بودن وزن جنین می‌باشد (۱۱).

نتایج نشان داد تزریق والپورات سدیم باعث جذب جنینها به ویژه در دو انتهای رحم می‌شود و میزان این جذب با افزایش دوز دارو بالا می‌رود. احتمالاً اثر سمی مستقیم دارو یا تغذیه نامناسب جنینها در اثر تغییرات دژنراتیو ساختمان غشاهای جفتی است که تحت تأثیر والپورات سدیم ایجاد شده است (۱۲).

والپورات سدیم بر غشاهای جفتی آثار دژنراتیو بسیاری داشته، علاوه بر ترمبوس باعث کاهش تکثیر عروق خونی و حتی انسداد بند ناف می‌گردد. این ناهنجاریها سطح تبدلات را بشدت کاهش می‌دهد و باعث عدم رشد جنینها و نهایتاً جذب آنها می‌شود. والپورات سدیم فعالیت آنزیم «گلوتامات فرمیل ترانسفراز» را متوقف نموده و باعث تغییرات وابسته به دوز در متابولیسم فولیت می‌شود؛ به علاوه والپورات سدیم از جذب اسید فولیک در لوله گوارش جلوگیری می‌کند (۶).

عدم رشد اندامها و جدا نشدن قسمتهای بازو، ساعد و انگشتان از یکدیگر و مشاهده جوانه‌های اندام صرفاً بصورت صفحات پاروئی شکل نتیجه دیگری بود که در این تحقیق بدست آمد.

در روند تکاملی اندامهای جنین موش سه ناحیه مهم وجود دارد: «ستیغ اکتودرم راسی (A.P.R)». این ناحیه اکتودرم ضخیم شده‌ای است که محور مزانشیمی اندامها را می‌پوشاند. این منطقه بر روی سلولهای زیرین

9. Walter Fo Marasas. Fumonisin Disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural development in embryo culture and in Vivo: J. of Nutrition. Apr 2004. Vol. B4. 711-716.
10. Robert J. prevention of neural tube defects with folic acid in china. The new England J. of medicine. 1999. 341, 1485-1490.
11. Elmazer, M.M.A., Nou, H. Methorelate increases VPP induce developmental toxicity in particular N.T.D. in mice. Teratogen carcinogen mutagen. 1992, 210-230.
12. Seeg miller R.E. Mophological differences elicited by two weak acid retionoic and valporic in rat embryos grown in vitro. Teratology, 1991 43: 133-150.
13. Andras Nagy et al. Manipulation the mouse embryo, a laboratory monual. Third edition. PuBl. Kowkab. 2003. P: 91-93.
14. Dennis M. Maddon. Reduced folate carrier (RFC) is expressed in placenta and yolk sac, as well as in cells of the developing forebrain, hind brain, neural tube, limbhud and heart. Dev Biol. 2003, 3(1); 6.

mg ۰/۴ فولیک اسید به ویژه سه ماهه اول بارداری اثر معجزه آسایی در کاهش ناهنجاریهای جنین دارد؛ ولی مکانیسم اثر والپورات سدیم همچنان ناشناخته مانده است.

References:

- 1: T.W. Sadler. Langman's Medical embryology. Eight edition. 2000. P: 122-123
2. Suchesdton K., Ehler S H lt: Valproic acid induced spina bifida: a mou se model pharmacol. 1979. suppl R44.
3. Bogumil Biernacki, Bogdan wlodarczyk and MaRia M. effect of sodium Valproate on rat embryo development in Vitro. National Veterinary Research Institute, 2000. 24 -100 pulawy, Poland.
4. Padmanabhan-R, Hameed-MS. Exencephaly and anial skeletal malformations induced by maternal administration of sodium Valproate in the MF1 mouse. J-cranio fac-Genet-Dev-Biol. 1994 Jul-Sep, 14(3): 192-205.
5. Lindhout-D. Omtzigt-JG. Teratogenic effects of antiepileptic drugs: implications for managemen of epilepsy in women of childbearing age. Epilepsia 1994. 35 suppl 4: 519-58.
6. Nau-H. Valproic acid-induced tube defects ciba-Found-symp. 1994. 181: 144-52.
7. Hishida-R. Nau-H. VPA induced neural tube defects in mice altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione. Terato-carcinog-Mutagen. 1998. 18 (2): 49-61.
8. Ubeda, martin N, Alonso E, Perez de. Morphdological changes indced by Vualporate and its administration concomitant with folic acid or-s-adenosylme-thionine in pregnant rats. Nutr-Hosp. 1998 Jan-Fed, 13 (7): 41-9.