

## اثر بروملین بر ناهنجاری‌های ظاهری ناشی از بیس فنول آ در جنین موش صحرایی

کاوه خزائیل<sup>۱</sup>، جواد جمشیدیان<sup>۱</sup>، محمود خاکساری مهابادی<sup>۲</sup>، نرگس ذوالفقاری<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** مواجهه قبل از تولد با بیس فنول آ، با پیش‌آمدهای مضر هنگام تولد در ارتباط است. بروملین، متعلق به گروهی از آنزیم‌های هضم کننده است که به طور تجاری از میوه یا ساقه‌ی آناناس به دست می‌آید. بروملین، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و تقویت کننده‌ی سیستم ایمنی است و در مدل‌های تجربی ایجاد کننده‌ی استرس اکسیداتیو، اثر حفاظتی داشته است. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی اثر بروملین و ویتامین E (به عنوان آنتی‌اکسیدان شاخص) بر ناهنجاری‌های ظاهری ناشی از بیس فنول آ بوده است.

**روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، ۳۴ سر موش آبستن به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه شاهد، روغن زیتون را به صورت خوراکی (گاواژ) دریافت کرد و گروه‌های آزمایش به ترتیب بیس فنول آ (۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم؛ گاواژ)، بروملین (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم؛ داخل صفاقی)، بیس فنول آ همراه با بروملین (۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) و بیس فنول آ همراه با ویتامین E (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم؛ داخل صفاقی) در روزهای ۱۵-۶ آبستنی دریافت کردند. جنین‌ها در روز ۲۰ آبستنی جمع‌آوری و بعد از اندازه‌گیری وزن و طول، از نظر ناهنجاری‌های ظاهری ارزیابی شدند.

**یافته‌ها:** میانگین وزن و طول در گروه بیس فنول آ  $0.49 \pm 1.20$  گرم و  $21.76 \pm 3.33$  میلی‌متر تعیین شد که به طور معنی‌داری کمتر از دیگر گروه‌ها بود؛ در حالی که بروملین همانند ویتامین E باعث بهبود این پارامترها شد. در بررسی ظاهری جنین‌ها، اگزئسفالی مشاهده شد که در ۲۱/۴۲ درصد جنین‌های گروه بیس فنول آ و ۵/۴۰ درصد جنین‌های گروه بیس فنول آ همراه با بروملین با دز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وجود داشت، اما در سایر گروه‌ها مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** تجویز بیس فنول آ در موش‌های صحرایی آبستن، به صورت معنی‌داری سبب کاهش وزن و طول جنین‌ها و ناهنجاری‌های ظاهری آن‌ها گردید. صرف نظر از مکانیسم حفاظتی، بروملین و ویتامین E می‌توانند ناهنجاری‌های ظاهری ناشی از بیس فنول آ را به صورت معنی‌داری کاهش دهند.

**واژگان کلیدی:** بیس فنول آ، بروملین، ناهنجاری، جنین، موش صحرایی

**ارجاع:** خزائیل کاوه، جمشیدیان جواد، خاکساری مهابادی محمود، ذوالفقاری نرگس. اثر بروملین بر ناهنجاری‌های ظاهری ناشی از بیس فنول آ در جنین

موش صحرایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۵۲): ۱۵۰۳-۱۴۹۶

## مقدمه

در سال‌های اخیر، کاربرد مواد پلاستیکی در زندگی که عملکرد سیستم اندوکراین را تحت تأثیر قرار می‌دهند، نگرانی‌هایی در برداشته است. از ترکیباتی که در حجم زیاد برای تولید ظروف یک بار مصرف، پوشش‌های داخلی قوطی‌های کنسرو، بطری‌های نگهداری مایعات، بطری‌های تغذیه کننده‌ی اطفال و همچنین، تجهیزات الکترونیکی، پزشکی و دندان‌پزشکی استفاده می‌شود، بیس فنول آ می‌باشد (۱) که به دلیل حلالیت در چربی، از سد خونی-جفتی عبور می‌کند (۲). طبق بررسی‌های انجام شده، اتصالات مولکول‌های

بیس فنول آ در پلاستیک پلی‌کربناتی با گرم شدن یا قرار گرفتن در معرض اسیدها و بازها شکسته می‌شود و می‌تواند وارد غذا، شیر، نوشابه یا آبمیوه‌ی درون ظروف پلی‌کربناته شد و در نهایت وارد بدن انسان شود (۳-۵). این ترکیب، فعالیت استروژنی ضعیفی دارد و موجب افزایش سرطان بیضه و سینه، کاهش باروری، ناهنجاری‌های تکاملی، تغییر در عملکرد غدد درون‌ریز، کاهش کارایی دستگاه ایمنی و تأثیر منفی بر جنین می‌شود (۶، ۲). Sharf-El Deen و همکاران، با القای دزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بیس فنول آ در موش‌های صحرایی آبستن، کاهش معنی‌داری در طول جنین‌های آن‌ها در مقایسه

۱- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دکتری حرفه‌ای دام‌پزشکی، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: کاوه خزائیل

برخی مدل‌های تجربی نشان داده شده است که بروملین می‌تواند موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردد و استرس اکسیداتیو را مهار کند (۱۹). همچنین، اشاره شده است که بروملین، سبب تقویت عملکرد دستگاه ایمنی می‌گردد (۱۷).

با توجه به اثرات اثبات شده و سودمند بروملین در مدل‌های مختلف تجربی (۱۷) و این که بروملین به عنوان یک مکمل غذایی مطرح است که در آمریکا و اروپا در فروشگاه‌های غذای سالم و داروخانه‌ها عرضه می‌گردد (۲۰) و همچنین، به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بروملین و نقش استرس اکسیداتیو در ایجاد ناهنجاری‌های جنینی (۱۱)، به دلیل محدودیت مطالعات در دسترس در مورد اثرات استفاده از بروملین در دوره بارداری، این مطالعه با هدف بررسی اثر بروملین بر میانگین وزن، طول و ناهنجاری‌های ظاهری ناشی از بیس فنول آ در جنین موش صحرایی و نقش حفاظتی احتمالی آن در کاهش این ناهنجاری‌ها طراحی و اجرا گردید.

### روش‌ها

**داروها:** داروهای استفاده شده در مطالعه حاضر، شامل بیس فنول آ (Merck, Germany)، آمپول ویتامین E (اسوه، ایران) و پودر بروملین (آکروس ارگانیک، تایلند) بودند.

**حیوانات:** در این مطالعه، از موش‌های صحرایی نژاد Wistar که از مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه شد، استفاده گردید. موش‌های صحرایی نر و ماده یک هفته به منظور تطابق با شرایط محیطی در خانه‌ی حیوانات آن مرکز به طور مجزا از یکدیگر نگهداری شدند. در آن جا، موش‌ها تحت شرایط دمایی  $21 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد و دوره‌ی ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. موش‌های صحرایی در سن ۴-۳ ماهگی و دارای میانگین وزنی  $20 \pm 2$  گرم بودند و در شرایط یکسان از نظر تغذیه و محیط نگهداری شدند و به صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. غذای فشرده ساخت کارخانه‌ی خوراک دام و طیور پارس برای تغذیه‌ی آن‌ها استفاده شد و بستر حیوانات حداقل یک روز در میان تعویض گردید. شیوه‌نامه‌های تجربی مورد استفاده توسط کمیته‌ی اخلاق دانشکده‌ی دام‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز مطابق با دستورالعمل‌های بین‌المللی آزمایش‌های حیوانی مورد استفاده قرار گرفت. برای کاهش درد و رنج حیوانات، از حداقل تعداد حیوان جهت به دست آوردن داده‌های قابل اطمینان استفاده شد.

**روش کار:** برای انجام عمل جفت‌گیری، هر سه موش صحرایی ماده با یک موش صحرایی نر، یک شب هم قفس شدند و روز بعد با مشاهده‌ی پلاک واژنی، روز صفر آبستنی تعیین گردید. موش‌های

با گروه شاهد گزارش کردند (۲). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Ahmed و همکاران بر روی موش‌های صحرایی آبستن انجام گرفت، مشاهده شد که تجویز بیس فنول آ با دز ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت گاوآژ، سبب کاهش طول جنین در مقایسه با گروه شاهد گردید (۷). همچنین در تحقیقات متعدد نشان داده شده است که استفاده از دزهای بالای بیس فنول آ در مادران آبستن، سبب کاهش طول جنین می‌گردد (۸-۹).

برخی مطالعات نشان می‌دهد که بیس فنول آ، سبب تولید Reactive oxygen species (ROS) از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که سبب افزایش استرس اکسیداتیو در کبد موش‌های صحرایی می‌گردد (۱۰-۱۱). همچنین، مشخص شده است که بیس فنول آ در دز ۵۰۰ میکروگرم/کیلوگرم به صورت تزریقی، باعث تولید ROS و کاهش محتوای آنتی‌اکسیدانی در موش‌های صحرایی شده است (۱۱). در مطالعه‌ی Berger و همکاران، به آثار مضر بیس فنول آ بر رویان موش صحرایی در شرایط محیط کشت از طریق القای مرگ سلولی و مهار تکثیر سلولی اشاره شده است (۱۲). مطالعات زیادی در مدل‌های حیوانی گزارش کرده‌اند که دریافت بیس فنول آ در دوره‌ی قبل از تولد، می‌تواند سبب القای نقایص مادرزادی شود (۱۳، ۷، ۲) و در سال‌های اخیر، پتانسیل تراژدیک و امبریوتوکسیک بیس فنول آ مشخص شده است (۲).

بروملین، ترکیب طبیعی حاصل از آناناس کموسوس است و حاوی عوامل مختلف تیول اندو-پپتیداز نظیر آنانین و کوماسین و مهارکننده‌ی پروتئیناز نظیر سیستاتین، فسفاتاز، پراکسیداز، سلولاز، گلیکوپروتئین و کربوهیدرات می‌باشد (۱۶-۱۴) و عمده‌ی خواص دارویی آن مرتبط با اثرات پروتئولیتیک است که به عملکرد دستگاه گوارش کمک می‌کند و فعالیت عضلات و مفاصل را تسهیل می‌نماید (۱۷). مطالعات درون تنی (In vivo) و بیرون تنی (In vitro) متعدد خواص ضد التهابی، ضد ادم، ضد انعقادی و مهارکننده‌ی تجمع پلاکتی، آنتی‌آترو اسکروزیس، آنتی‌آنژیوژنیزس، ضد آرتریت، ضد سرطان، ضد انگل و آنتی‌باکتریال بروملین را اثبات کرده است (۱۷). همچنین، به اثرات سودمند بروملین در کاهش درد، بهبود زخم و سوختگی اشاره شده است. سازمان غذا و دارو، بروملین را در دسته‌ی مکمل‌های غذایی مجاز طبقه‌بندی نموده و سلامت آن را مورد تأیید قرار داده است (۱۵).

دز کشنده‌ی تزریقی بروملین در موش سوری ۳۵-۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و در موش صحرایی ۸۵/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم گزارش شده است، اما تجویز خوراکی آن تا دز ۱۰ گرم/کیلوگرم در موش سوری و صحرایی و خرگوش بدون تلفات بوده است (۱۸). در

تزریق شد (۲۱).

**نمونه‌گیری:** در روز بیستم آبستنی، تمام موش‌های صحرایی دریافت‌کننده دارو با در نظر گرفتن اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی، به روش بیهوشی عمیق با کلروفورم آسان‌کشی شدند و پس از باز کردن محوطه‌ی شکمی و برش شاخ رحم، جنین‌ها از رحم موش‌ها بیرون آورده و بلافاصله از کیسه‌ی آمیون خارج شدند. برای بررسی ناهنجاری‌های ناشی از بیس فنول آ و اثرات احتمالی بروملین، جنین‌ها از نظر ظاهری در نواحی مختلف بدن ارزیابی شدند و وزن و طول جنین با ترازو و کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. تعداد جنین‌های زنده و جذب شده (Fetal resorption) نیز برای هر گروه تعیین گردید.

**آنالیز آماری:** نتایج به دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) به طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA و سپس، آزمون تکمیلی Least significant difference (LSD) انجام گرفت. اختلاف میانگین بین گروه‌های مختلف در سطح  $P < 0/05$  معنی‌دار تلقی گردید.

### یافته‌ها

تعداد کل موش‌های مادر آبستن در گروه‌های مختلف مورد مطالعه، ۳۴ سر بود و تعداد جنین‌های زنده‌ی حاصل از آن‌ها، ۲۱۳ سر شمارش گردید که به تفکیک گروه‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. شکل ۱، مقایسه‌ی رحم‌های حاوی جنین‌های زنده و جذب شده را نشان می‌دهد.

بر اساس جدول ۱، اگر چه گروه دریافت‌کننده‌ی بیس فنول آ دارای تعداد جنین‌های جذب شده‌ی بیشتری بود، اما این اختلاف در مقایسه با سایر گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مورد طول و وزن جنین‌ها، میانگین  $\pm$  انحراف معیار طول و وزن جنین‌های هر گروه در جدول ۲ آمده است.

صحرایی ماده‌ی جفت‌گیری کرده به ۶ گروه مجزا تقسیم شدند. در این مطالعه، محلول‌های بیس فنول آ ۳۰ درصد (۳۰ گرم بیس فنول آ در ۱۰۰ میلی‌لیتر روغن زیتون) و بروملین ۲ درصد (۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) تهیه گردید. به منظور تعیین دز بروملین، مطالعه‌ی آزمایشی انجام گردید که طی آن، ۱۵ سر موش صحرایی در سه گروه ۵تایی به مدت دو هفته بروملین را با دزهای ۱۰، ۴۰ و ۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت تجویز داخل صفاقی دریافت کردند که در انتها، دز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به عنوان دز درمانی و دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به عنوان بالاترین مقدار مشخص شده در مطالعه‌ی آزمایشی در نظر گرفته شدند. همچنین، دز ۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به دلیل ایجاد واکنش‌های نامطلوب انتخاب نشد. به موش‌های گروه اول (شاهد)، هم‌حجم با گروه‌های تیمار، روغن زیتون (به عنوان حلال بیس فنول آ) به صورت گاوآز با استفاده از Feeding tube خوراندند شد.

در گروه دوم، بیس فنول آ به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت گاوآز با استفاده از Feeding tube خوراندند شد (۲).

در گروه سوم، بروملین به میزان ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (بر اساس مطالعه‌ی آزمایشی) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

در گروه چهارم، هم‌زمان با تجویز بیس فنول آ به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت گاوآز، بروملین با دز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن (بر اساس مطالعه‌ی آزمایشی به عنوان دز درمانی) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

در گروه پنجم، هم‌زمان با تجویز بیس فنول آ به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوآز، بروملین به میزان ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (به عنوان بالاترین مقدار مشخص شده در مطالعه‌ی آزمایشی) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

در گروه ششم، هم‌زمان با تجویز بیس فنول آ به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوآز، ویتامین E به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی

جدول ۱. تعداد موش‌های صحرایی آبستن، جنین‌های زنده و جذب شده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه‌ها	وضعیت جنین‌ها	تعداد موش آبستن	تعداد جنین‌های زنده	تعداد جنین‌های جذب شده	کل
			تعداد(درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
شاهد		۷	۳۹ (۹۵/۱۲)	۲ (۴/۸۸)	۴۱ (۱۰۰)
بیس فنول آ		۶	۲۸ (۸۴/۸۵)	۵ (۱۵/۱۵)	۳۳ (۱۰۰)
بروملین ۴۰		۵	۳۶ (۱۰۰)	۰ (۰)	۳۶ (۱۰۰)
بیس فنول آ + بروملین ۱۰		۶	۳۷ (۹۲/۵۰)	۳ (۷/۵۰)	۴۰ (۱۰۰)
بیس فنول آ + بروملین ۴۰		۵	۴۳ (۹۷/۷۳)	۱ (۲/۲۷)	۴۴ (۱۰۰)
بیس فنول آ + ویتامین E		۵	۳۰ (۹۶/۷۷)	۱ (۳/۲۳)	۳۱ (۱۰۰)



شکل ۲. مقایسه‌ی طول جنین در گروه‌های مورد مطالعه  
(۱): گروه شاهد، (۲): گروه بیس فنول آ به همراه بروملین با دز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، (۳): گروه بیس فنول آ

در مورد وزن جنین‌ها، گروه شاهد دارای بیشترین وزن و گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ دارای کمترین وزن بودند. با مراجعه به جدول ۲ مشخص شد که دریافت بیس فنول آ به صورت معنی‌داری وزن جنین را نسبت به تمام گروه‌ها کاهش داد ( $P < 0/001$ ). دریافت بروملین با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و ویتامین E، اگر چه باعث افزایش وزن جنین‌ها نسبت به گروه بیس فنول آ شد، اما هنوز به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ( $P < 0/001$ ). در این بین، گروه دریافت‌کننده بروملین با دز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارای جنین‌هایی بود که وزن آن‌ها اختلاف معناداری با گروه شاهد نداشت. در بررسی ظاهری جنین‌های گروه‌های مختلف، تنها ناهنجاری مشاهده شده، اگزینسفالی بود (شکل ۳) که در ۲۱/۴۲ درصد جنین‌های گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ و ۵/۴ درصد جنین‌های گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ همراه با بروملین با دز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وجود داشت و در سایر گروه‌ها مشاهده نشد.



شکل ۳. مقایسه‌ی جنین بیست روزه‌ی موش صحرایی سالم (گروه شاهد) و دارای ناهنجاری اگزینسفالی (گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ). در سمت چپ تصویر، جنین سالم و در سمت راست جنین دچار ناهنجاری اگزینسفالی (پیکان زرد) مشاهده می‌شود.



شکل ۱. رحم موش صحرایی دارای جنین‌های ۲۰ روزه در گروه شاهد (بالا) و جذب جنینی (Fetal resorption) در گروه بیس فنول آ (پایین)

همان‌گونه که در جدول ۲ مشخص شده است، طول جنین‌های گروه شاهد به صورت معنی‌داری بزرگ‌تر از سایر گروه‌ها بود ( $P < 0/010$ ).

جدول ۲. مقایسه‌ی میانگین  $\pm$  انحراف معیار طول (بر حسب میلی‌متر) و وزن (بر حسب گرم) جنین‌های گروه‌های مختلف

نام گروه	طول جنین (میلی‌متر)	وزن جنین (گرم)
شاهد	$9.29 \pm 3.68$	$0.502 \pm 0.188$
بیس فنول آ	$4.76 \pm 3.33$	$0.120 \pm 0.049$
بروملین ۴۰	$3.36 \pm 2.73$	$0.344 \pm 0.057$
بیس فنول آ + بروملین ۱۰	$3.70 \pm 4.9$	$0.53 \pm 1.09$
بیس فنول آ + بروملین ۴۰	$3.32 \pm 4.74$	$0.345 \pm 1.40$
بیس فنول آ + ویتامین E	$3.45 \pm 7.58$	$0.55 \pm 1.67$

\*- حروف کوچک تفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/050$ ) در هر ستون است.

همچنین، جنین‌های گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ، به طور معنی‌داری دارای طول کوچک‌تر از جنین‌های سایر گروه‌ها بودند ( $P < 0/001$ ) (شکل ۲). جنین‌های گروه دریافت‌کننده بروملین با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به طور معنی‌داری کوچک‌تر از گروه شاهد و از گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ به تنهایی، بزرگ‌تر بودند ( $P < 0/001$ ). در گروه‌هایی که بیس فنول آ را همراه با بروملین و ویتامین E (گروه‌های ۴-۶) دریافت کرده بودند، طول جنین اگر چه به طور معنی‌داری کوچک‌تر از گروه شاهد ( $P < 0/010$ ) و بزرگ‌تر از گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ ( $P < 0/001$ ) بود، اما با گروه دریافت‌کننده بروملین با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین، اگر چه میانگین طول جنین در گروه دریافت‌کننده بیس فنول آ همراه با بروملین با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از سایر گروه‌های دریافت‌کننده بروملین و همچنین، گروه ویتامین E کمتر بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود.

## بحث

**تعداد جنین‌های جذب شده:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اگر چه گروه دریافت کننده بیس فنول آ دارای تعداد جنین‌های جذب شده‌ی بیشتری بود، اما این اختلاف در مقایسه با دیگر گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. در تأیید نتایج پژوهش حاضر، Morrissey و همکاران در بررسی سمیت بیس فنول آ بر روی موش‌های صحرایی و آزمایشگاهی گزارش کردند که افزایش معنی‌داری در میزان جذب جنین‌ها در گروه‌های دریافت کننده بیس فنول آ مشاهده نگردید (۲۲). با توجه به بررسی‌های صورت گرفته و منابع در دسترس، به نظر می‌رسد بیشتر مطالعات (۲۳-۲۴)، افزایش میزان جنین‌های جذب شده در گروه‌های دریافت کننده بیس فنول آ را گزارش کرده‌اند که مطابق با نتایج مطالعه‌ی حاضر نیست. در توضیح این اختلاف، می‌توان به تفاوت دزهای استفاده شده بیس فنول آ و همچنین، طول مدت تجویز آن اشاره کرد؛ چرا که توجه دقیق‌تر به این مطالعات نشان می‌دهد که دزهای بالاتر بیس فنول آ (همچون ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و طول بیشتر مدت تجویز (از روز صفر تا ۱۵ یا روز صفر تا ۱۹) در مطالعات پیش‌گفته استفاده شده است. در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، تجویز بیس فنول آ بین روزهای ۱۵-۶ انجام شد که دوره‌ی ارگانوژنز موش صحرایی و پس از لانه‌گزینی بود (۲۵). ضمن این که در پژوهش حاضر نیز بیشترین تعداد جنین جذب شده در گروه دریافت کننده بیس فنول آ وجود داشت؛ هر چند که از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

**تغییرات طول جنین‌ها:** تجویز بیس فنول آ با دز ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در موش‌های آبستن این مطالعه، باعث کاهش معنی‌دار طول جنین‌های آن‌ها در مقایسه با سایر گروه‌ها گردید. Sharf-El Deen و همکاران، با القای دزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بیس فنول آ در موش‌های صحرایی آبستن، کاهش معنی‌داری در طول جنین‌های آن‌ها در مقایسه با گروه شاهد گزارش کردند که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌سو است (۲). در مطالعه‌ی Ahmed و همکاران بر روی موش‌های صحرایی آبستن، مشاهده شد که تجویز خوراکی به صورت گاوآذ بیس فنول آ با دز ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، سبب کاهش طول جنین در مقایسه با گروه شاهد گردید (۷). این مطالعه نیز نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. همچنین، در تحقیقات متعدد نشان داده شده است که استفاده از دزهای بالای بیس فنول آ (همچون دز ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در پژوهش حاضر) در مادران آبستن سبب کاهش طول جنین می‌گردد (۲۷-۲۶، ۹-۸). اعتقاد بر این است که مواجهه‌ی جنین با ترکیبات مختل کننده‌ی غدد درون ریز، سبب کاهش رشد جنین می‌گردد (۲۶). از طرف دیگر، با توجه به خاصیت استروژنی بیس فنول آ (۲۸) و وجود این

حقیقت که مواجهه‌ی داخل رحمی با ترکیبات استروژنی سبب محدودیت رشد داخل رحمی می‌گردد (۲۹)، کوچک‌تر بودن طول جنین در جنین‌های گروه دریافت کننده بیس فنول، منطقی می‌باشد. هر چند که مکانیسم سمیت بیس فنول آ بر روی جنین هنوز به طور کامل آشکار نشده است، مطالعات قبلی از توانایی بیس فنول آ بر تغییر الگوهای میتلاسیون DNA حکایت دارند (۳۰). همچنین، مشخص شده است که بیس فنول آ باعث تولید ROS و کاهش محتوای آنتی‌اکسیدانی در موش‌های صحرایی شده است (۱۱).

همان‌طور که گفته شد، ویتامین E و بروملین سبب افزایش طول جنین‌ها در مقایسه با گروه دریافت کننده بیس فنول آ شدند. ویتامین E، یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده است و مطالعات نشان می‌دهد که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها به علت کاهش استرس اکسیداتیو در جفت، سبب افزایش رشد جفت و جنین می‌گردد (۳۱). Ahmed و همکاران، با تجویز برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها در موش‌های صحرایی آبستن دریافت کننده بیس فنول آ، بهبود رشد جنین‌های آن‌ها را مشاهده کردند (۷).

در برخی مدل‌های تجربی، نشان داده شده است که بروملین می‌تواند سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردد و استرس اکسیداتیو را مهار کند (۱۹). بنابراین، شاید بتوان گفت که بروملین نیز به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدان که همچون ویتامین E دارد، سبب کاهش استرس اکسیداتیو در گروه دریافت کننده بیس فنول آ می‌شود و احتمال می‌رود با بهبود وضعیت رشد جفت، سبب افزایش رشد جنین شده است. عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دریافت کننده بیس فنول آ و بروملین نیز بر تقویت این فرضیه می‌افزاید.

دز بالاتر بروملین در مطالعه‌ی حاضر (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، نتوانست به اندازه‌ی دز پایین‌تر (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، طول جنین‌های دریافت کننده بیس فنول آ را افزایش دهد. از آن جایی که جنین‌های گروهی که فقط بروملین با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم دریافت کردند نیز به صورت معنی‌داری طول کمتر از گروه شاهد داشتند، شاید بتوان گفت دزهای بیشتر بروملین در موش‌های آبستن به علت اختلالات احتمالی که ایجاد می‌نماید، سبب کاهش طول جنین نسبت به دزهای پایین‌تر می‌شود. اگر چه اظهار نظر دقیق‌تر در این مورد، نیازمند مطالعات بیشتر بر روی بروملین در دوره‌ی آبستنی می‌باشد.

**تغییرات وزن جنین‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز بیس فنول آ در موش‌های صحرایی آبستن به صورت معنی‌داری سبب کاهش وزن جنین‌های آن‌ها گردید و استفاده از ویتامین E و بروملین همراه با بیس فنول آ، نتوانست کاهش وزن جنین‌ها را تا حدودی جبران کند، اما بهترین تأثیر را دز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بروملین داشت که جنین‌های این گروه از نظر وزن اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد



نقص در تشکیل استخوان‌های جمجمه منجر شوند.

از طرفی، اثر تحریک سیستم ایمنی مادر در جلوگیری از عوارض تراوتوژنیک ناشی از تجویز داروها و اشعه‌ی ایکس بررسی شده است (۳۳). مطالعات مختلفی به اثر ایمنی‌زایی بروملین اشاره داشته و عنوان کرده‌اند که بروملین، سبب تقویت کارکرد دستگاه ایمنی می‌گردد (۳۴-۳۵، ۱۶). همچنین، در برخی مدل‌های تجربی نشان داده شده است که بروملین می‌تواند استرس اکسیداتیو را مهار کند (۱۹)؛ البته، نباید از نظر دور داشت که ممکن است هر دو مکانیسم به صورت هم‌زمان یا با تقویت یکدیگر توانسته باشند این اثر را بگذارند. در عین حال، استفاده از ویتامین E در این پژوهش، سبب شد که اگزوسفالی در مقایسه با گروه بیس فنول آ به صورت معنی‌داری کاهش یابد و احتمال می‌رود این امر بتواند به دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین E و کاهش استرس اکسیداتیو ایجاد شده‌ی ناشی از مصرف بیس فنول آ باشد. اظهار نظر دقیق‌تر در مورد مکانیسم حفاظتی بروملین، نیازمند مطالعات تکمیلی است و باید مواردی همچون پروفایل استرس اکسیداتیو، شاخص‌های ایمنی مادری و جنین و حتی پارامترهای التهابی در گروه‌ها مقایسه شود. بنابراین می‌توان گفت بروملین می‌تواند اگزوسفالی ناشی از بیس فنول آ را به صورت وابسته به دز کاهش دهد و یا حتی به صفر برساند.

نتیجه‌گیری نهایی این که تجویز بیس فنول آ در موش‌های صحرایی آبستن، به طور معنی‌داری سبب کاهش وزن و طول جنین‌ها و ناهنجاری‌های ظاهری آن‌ها گردید. صرف نظر از مکانیسم حفاظتی بروملین و ویتامین E، می‌توانند ناهنجاری‌های ظاهری ناشی از بیس فنول آ را به صورت معنی‌داری کاهش دهند...

### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر نتیجه‌ی پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری حرفه‌ای دام‌پزشکی می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تأمین اعتبار مالی تشکر می‌گردد.

نداشتند. در تأیید نتایج پژوهش حاضر، مطالعات زیادی (۲۶، ۷، ۲) به کاهش وزن جنین در اثر تجویز بیس فنول آ برای مادران آبستن اشاره کرده‌اند. همچنین، عوارض مصرف دزهای پایین بیس فنول آ در دوره‌ی آبستنی همچون مسمومیت حاملگی، محدودیت رشد داخل رحمی جنین (Intrauterine growth restriction یا IUGR) و نارس بودن جنین‌ها توسط Benachour و Aris بررسی شده است (۳۲). با توجه به اثرات استروژنیک بیس فنول آ (۲۲) و دقت به این نکته که تجویز ترکیبات مختل کننده غدد درون‌ریز سبب اختلالات رشد جنین در رحم می‌گردد (۲۶)، کاهش وزن جنین‌ها در گروه‌های دریافت کننده‌ی بیس فنول آ، مورد انتظار بود.

در مورد اثر مثبت بروملین و ویتامین E بر وزن جنین، همان طور که پیش از این در مورد پارامتر طول جنین توضیح داده شد، احتمال می‌رود بتوان به اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در مقابل استرس اکسیداتیو احتمالی ایجاد شده به وسیله‌ی بیس فنول آ اشاره کرد. هر چند که اظهار نظر دقیق‌تر مستلزم مطالعات بیشتر و آگاهی از وضعیت پروفایل استرس اکسیداتیو در گروه‌های مورد مطالعه است.

**اگزوسفالی:** در بررسی ظاهری جنین‌های گروه‌های مختلف، تنها ناهنجاری مشاهده شده، اگزوسفالی بود که در ۲۱/۴۲ درصد جنین‌های گروه دریافت کننده‌ی بیس فنول آ و ۵/۴ درصد جنین‌های گروه دریافت کننده‌ی بیس فنول آ همراه با بروملین با دز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وجود داشت و در سایر گروه‌ها مشاهده نشد. Sharf-El Deen و همکاران، تراوتوژنیسیته بیس فنول آ را در موش‌های صحرایی بررسی کردند و کاهش القایی استخوانی شدن جمجمه را به صورت وابسته به دز و زمان گزارش نمودند (۲). با توجه به این که بیشتر استخوان‌های سر و صورت توسط سلول‌های مزانشیمی مشتق از ستیغ عصبی ساخته می‌شوند (۲۵)، بعید به نظر نمی‌رسد که متابولیت‌های مختلف فنل همچون بیس فنول آ، از طریق تأثیرگذاری بر روند تمایز این سلول‌ها اثر بگذارند و از تبدیل آن‌ها به استئوبلاست‌ها جلوگیری کنند و در نهایت، به نقایص اسکلتی نظیر

### References

1. Wang J, Schnute WC. Direct analysis of trace level bisphenol A, octylphenols and nonylphenol in bottled water and leached from bottles by ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; 24(17): 2605-10.
2. Sharf-El Deen O, El-Bakry S, Ali Abo Shaeir W, Elshaer F, Adel M. Teratogenicity of bisphenol-A (BPA) in pregnant rat. *Am-Euras J Toxicol Sci* 2017; 7(4): 229-38.
3. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009; 30(1): 75-95.
4. Hoekstra EJ, Simoneau C. Release of bisphenol A from polycarbonate: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013; 53(4): 386-402.
5. Goodson A, Robin H, Summerfield W, Cooper I. Migration of bisphenol A from can coatings--effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit Contam* 2004; 21(10): 1015-26.
6. Ranjit N, Siefert K, Padmanabhan V. Bisphenol-A and disparities in birth outcomes: a review and directions for future research. *J Perinatol* 2010; 30(1): 2-9.

7. Ahmed HI, EzzEldin E, Ahmed AA, Ali AA. The possible protective effects of some antioxidants against growth retardation and malformations induced by bisphenol-A in rats. *Life Sci J* 2013; 10(4): 1575-86.
8. Snijder CA, Heederik D, Pierik FH, Hofman A, Jaddoe VW, Koch HM, et al. Fetal growth and prenatal exposure to bisphenol A: The generation R study. *Environ Health Perspect* 2013; 121(3): 393-8.
9. Hijazi A. Effects of prenatal exposure to bisphenol A on fetal lung development [PhD Thesis]. London, ON: The University of Western Ontario; 2016.
10. Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 2000; 74(2): 99-105.
11. Jain S, Kumar CH, Suranagi UD, Mediratta PK. Protective effect of N-acetylcysteine on bisphenol A-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(6): 1404-9.
12. Berger RG, Hancock T, deCatanzaro D. Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reprod Toxicol* 2007; 23(2): 138-44.
13. Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007; 24(2): 199-224.
14. Maurer HR. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(9): 1234-45.
15. Napper AD, Bennett SP, Borowski M, Holdridge MB, Leonard MJ, Rogers EE, et al. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem J* 1994; 301 (Pt 3): 727-35.
16. Irene D, Chen BJ, Lo SH, Liu TH, Tzen JT, Chyan CL. Resonance assignments and secondary structure of a phytocystatin from *Ananas comosus*. *Biomol NMR Assign* 2012; 6(1): 99-101.
17. Rathnavelu V, Alitheen NB, Sohila S, Kanagesan S, Ramesh R. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. *Biomed Rep* 2016; 5(3): 283-8.
18. Duke JA, Bogenschultz-Godwin MJ, Ottosen AR. Duke's handbook of medicinal plants of Latin America. 1<sup>st</sup> ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008. p. 45.
19. Agarwal S, Chaudhary B, Bist R, Bacoside A and bromelain relieve dichlorvos induced changes in oxidative responses in mice serum. *Chem Biol Interact* 2016; 254: 173-8.
20. Ley CM, Tsiami A, Ni Q, Robinson N. A review of the use of bromelain in cardiovascular diseases. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2011; 9(7): 702-10.
21. Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Arslan O, Aksoy S. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. *Nutr Res* 2005; 25(6): 625-30.
22. Morrissey RE, George JD, Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol* 1987; 8(4): 571-82.
23. Kim JC, Shin HC, Cha SW, Koh WS, Chung MK, Han SS. Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Sci* 2001; 69(22): 2611-25.
24. George KR, Malini NA. Maternal exposure to xenoestrogen bisphenol A on embryo fetal development and teratogenic potential in *rattus norvegicus*. *The Bioscan* 2012; 7(3): 517-20.
25. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2014. p. 141-9.
26. Manikkam M, Crespi EJ, Doop DD, Herkimer C, Lee JS, Yu S, et al. Fetal programming: prenatal testosterone excess leads to fetal growth retardation and postnatal catch-up growth in sheep. *Endocrinology* 2004; 145(2): 790-8.
27. Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Quesada I, Nadal A. Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: A new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. *Endocrinology* 2015; 156(5): 1659-70.
28. Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 2002; 110(Suppl 3): 415-22.
29. Bamigboye AA, Morris J. Oestrogen supplementation, mainly diethylstilbestrol, for preventing miscarriages and other adverse pregnancy outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (3): CD004353.
30. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(32): 13056-61.
31. Jones ML, Mark PJ, Mori TA, Keelan JA, Waddell BJ. Maternal dietary omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat. *Biol Reprod* 2013; 88(2): 37.
32. Benachour N, Aris A. Toxic effects of low doses of bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 241(3): 322-8.
33. Holladay SD, Sharova LV, Punareewattana K, Hrubeck TC, Gogal RM, Jr., Prater MR, et al. Maternal immune stimulation in mice decreases fetal malformations caused by teratogens. *Int Immunopharmacol* 2002; 2(2-3): 325-32.
34. Engwerda CR, Andrew D, Ladhams A, Mynott TL. Bromelain modulates T cell and B cell immune responses in vitro and in vivo. *Cell Immunol* 2001; 210(1): 66-75.
35. Hale LP. Proteolytic activity and immunogenicity of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(2): 255-64.

## Effect of Bromelain on Apparent Abnormalities Induced by Bisphenol A in Rat Fetus

Kaveh Khazaeel<sup>1</sup>, Javad Jamshidian<sup>1</sup>, Mahmood Khaksary-Mahabady<sup>2</sup>, Narges Zolfaghari<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Prenatal exposure to bisphenol A (BPA) has been associated with adverse birth outcomes. Bromelain belongs to a group of protein digesting enzymes obtained commercially from the fruit or stem of pineapple. It is known to possess antioxidant and immunomodulatory effects and to protect against oxidative stress in experimental models. The aim of the present study was to evaluate the effectiveness of bromelain and vitamin E (a well-known antioxidant) on apparent abnormalities of bisphenol A in rat model.

**Methods:** In this experimental study, 34 pregnant rats were divided into 6 groups. Control group received olive oil gavage and test groups received bisphenol A (300 mg/kg, gavage), bromelain (40 mg/kg, intraperitoneal), bisphenol A plus bromelain (10 mg/kg, intraperitoneal), bisphenol A plus bromelain (40 mg/kg, intraperitoneal), and bisphenol A (300 mg/kg, intraperitoneal) plus vitamin E (100 mg/kg, intraperitoneal) at 6<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> days of gestation. Fetuses were collected at 20<sup>th</sup> day of gestation and after determination of weight and length, they were evaluated for apparent abnormalities.

**Findings:** The mean weight and length of fetuses received bisphenol A were  $1.20 \pm 0.49$  g and  $21.76 \pm 3.33$  mm, respectively, that significantly were less than other groups; but bromelain improved them, as same as vitamin E. In apparent evaluation of fetuses, only exencephaly was seen in 21.42 percent of fetuses in bisphenol A group and 5.4 percent of fetuses in bisphenol A plus bromelain (10 mg/kg) group, while it was not seen in the other groups.

**Conclusion:** Regardless of protective mechanism of bromelain, results of this study showed that bromelain can decrease apparent abnormalities of bisphenol A.

**Keywords:** Bisphenol A, Bromelain, Abnormalities, Fetus, Rat

**Citation:** Khazaeel K, Jamshidian J, Khaksary-Mahabady M, Zolfaghari N. **Effect of Bromelain on Apparent Abnormalities Induced by Bisphenol A in Rat Fetus.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(452): 1496-503.

1- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Doctor of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

**Corresponding Author:** Kaveh Khazaeel, Email: k.khazaeel@scu.ac.ir