

بررسی اثرات کارودیلول و ویتامین E بر ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرایی

رضا رنجبر^۱، فاطمه حسینی سیاهی^۲، محمود خاکساری مهابادی^۱، حسین نجف‌زاده ورزی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: داروی ضد تشنج والپروات سدیم، دارای اثرات تراتوژنیک روی سیستم اسکلتی انسان و حیوانات از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌باشد. کارودیلول بتالاکری، اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی دارد و در بیماری‌هایی مانند دیابت و نارسایی کلیه مفید است و در مدل‌های تجربی ایجاد کننده‌ی استرس اکسیداتیو، اثر حفاظتی داشته است. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، مقایسه‌ی نقش کارودیلول و ویتامین E (به عنوان آنتی‌اکسیدان شاخص) در کاهش یا پیش‌گیری از ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرایی بود.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر، بر روی ۳۰ سر موش صحرایی آبستن در ۴ گروه انجام شد. در روزهای ۸ و ۹ آبستنی گروه اول (گروه شاهد) تا چهارم به ترتیب نرمال‌سالین، والپروات سدیم به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، والپروات سدیم و کارودیلول به میزان ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و والپروات سدیم و ویتامین E به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم داخل صفاقی تجویز شد. روز ۲۰ آبستنی پس از آسان‌کشی تمامی موش‌ها و استخراج جنین‌ها، طول و وزن آن‌ها تعیین و با آلیزارین قرمز-آلسین آبی رنگ‌آمیزی شد و سیستم اسکلتی جنین‌ها در زیر استریومیکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: درصد ناهنجاری‌های اگزوسفالی، شکاف کام، مهره‌ی شکاف‌دار و آملوسل در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به تنهایی به ترتیب ۱۴/۵۸، ۱۴/۵۸، ۱۶/۶۶ و ۱۰/۴۱ درصد بود؛ در حالی که درصد این ناهنجاری‌ها توسط کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب ۶/۵۵، ۸/۱۹ و ۶/۵۵ درصد و توسط ویتامین E با دز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب به ۳/۵۰، ۸/۷۷ و ۳/۵۰ درصد کاهش یافت. میانگین طول جنین‌ها در گروه والپروات سدیم همراه با کارودیلول و گروه والپروات سدیم به اضافه‌ی ویتامین E نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود، اما اختلاف معنی‌داری نداشتند. میانگین وزن جنین‌ها در گروه والپروات سدیم به اضافه‌ی ویتامین E، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های والپروات سدیم و گروه والپروات سدیم به اضافه‌ی کارودیلول بود، اما نسبت به گروه شاهد کمتر بود.

نتیجه‌گیری: کارودیلول بر روی ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم و تغییرات طول جنین‌ها به اندازه‌ی ویتامین E تأثیر داشت، اما ویتامین E بر روی تغییرات وزن جنین‌ها اثر محافظتی بیشتری داشت.

واژگان کلیدی: والپروات سدیم، کارودیلول، ویتامین E، ناهنجاری‌های ناشی از دارو، آبستنی

ارجاع: رنجبر رضا، حسینی سیاهی فاطمه، خاکساری مهابادی محمود، نجف‌زاده ورزی حسین. بررسی اثرات کارودیلول و ویتامین E بر ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۸): ۱۲۹۷-۱۲۸۹

مقدمه

آنتی‌اکسیدانی همانند آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و منابعی مثل گلوتاتیون و استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، موجب ناهنجاری‌های جنینی مانند ناهنجاری‌های اسکلتی شوند. یکی از مکانیسم‌های تراتوژنی والپروئیک اسید، ایجاد رادیکال‌های آزاد و افزایش کفه‌ی تعادل به سمت استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱-۳). بر اساس تحقیقات، استفاده از داروی ضد صرع حین بارداری، باعث

داروی ضد تشنج والپروات سدیم که برای درمان انواع مختلف صرع استفاده می‌شود، در انسان و حیوانات دارای اثرات تراتوژنیک شامل نقایص لوله‌ی عصبی و ناهنجاری‌های مادرزادی می‌باشد. مواد و داروهایی که با آسیب به غشاهای سلولی نظیر جفت و سلول‌های در حال تمایز و تکثیر جنین، می‌توانند با ایجاد عدم تعادل بین دفاع

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

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

۳- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(۱۴). ویتامین E در داخل غشای چربی به منظور جلوگیری از اکسیداسیون و تشکیل رادیکال‌های آزاد که می‌تواند غشای سلولی را آسیب برساند، عمل می‌کند. استرس اکسیداتیو به طور معمول در میان افراد مصرف کننده سیگار، بیماران مبتلا به دیابت، بیماران مبتلا به سرطان و افراد مبتلا به بیماری قلبی - عروقی افزایش می‌یابد. تحقیقات نشان می‌دهد که دزهای بالای ویتامین E در پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی - عروقی و سرطان با عمل آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی ایفا می‌کنند. گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر این که مصرف دزهای بالای ویتامین E در سه ماهه اول بارداری، با افزایش خطر ابتلا به ناهنجاری‌های عمده همراه نیست، اما ممکن است با کاهش وزن همراه باشد (۱۵).

از آن جایی که مقایسه‌ی کارودیلول و ویتامین E بر روی ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرایی بررسی نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی نقش این داروها در کاهش یا پیش‌گیری از ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از والپروات سدیم در جنین موش صحرایی انجام شد.

روش‌ها

داروها: داروهای مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر شامل والپروات سدیم تهیه شده از شرکت روز داروی تهران، آمپول ویتامین E تهیه شده از شرکت دارویی اسوه و کارودیلول تهیه شده از شرکت داروسازی عبیدی بودند.

حیوانات: در این مطالعه، از موش‌های صحرایی نر و ماده‌ی نژاد Wistar که از مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه شدند، استفاده گردید. موش‌های صحرایی با سن حدود ۳-۴ ماهگی و میانگین وزنی 20 ± 200 گرم، حدود یک هفته به منظور تطابق با شرایط محیطی در خانه‌ی حیوانات به طور مجزا از یکدیگر، تحت دمای 21 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد و دوره‌ی ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی، شرایط یکسان تغذیه‌ای و محیطی نگهداری شدند. 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.

برای انجام عمل جفت‌گیری، هر سه سر موش صحرایی ماده با یک سر موش صحرایی نر کنار یکدیگر قرار داده شدند و روز بعد با مشاهده‌ی پلاک واژنی، روز صفر آبستنی تعیین گردید. موش‌های صحرایی آبستن در ۴ گروه مجزا و در هر گروه به طور میانگین ۵ سر

افزایش شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد و آسیب اکسیداتیو سلول می‌گردد و می‌تواند نقش مهمی در پیشرفت صرع ایفا کند (۴). عوارض این دارو، به خصوص ناهنجاری‌زایی آن در مطالعات متعدد به اثبات رسیده است. از این رو، پیش‌گیری از این عوارض، می‌تواند استفاده از این دارو را در بیماران مفیدتر نماید. تجویز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم والپروات سدیم به صورت داخل صفاقی در یکی از روزهای ۷ و ۸ آبستنی، باعث ایجاد ناهنجاری‌های اسکلتی جنین موش سوری می‌شود (۵).

Menegola و همکاران، در دو مطالعه‌ی جداگانه گزارش کردند که تجویز والپروات سدیم به ترتیب با دز ۳۰۰-۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت زیر جلدی در یکی از روزهای ۱۱-۹ آبستنی در موش سفید کوچک و موش صحرایی، باعث ناهنجاری‌های اسکلتی نظیر ناهنجاری‌هایی در استخوان جناغ، مهره‌ها و دنده‌ها می‌شود (۶-۷). در مطالعات دیگر، تجویز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی از والپروات سدیم به ترتیب در روزهای ۹ (سه بار) و ۸ آبستنی، باعث ایجاد ناهنجاری‌های سیستم اسکلتی در موش سفید کوچک و موش صحرایی شده است (۸).

در مطالعه‌ی خاکساری مهابادی و همکاران، تجویز والپروات سدیم با دز ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی، در روزهای ۸ و ۹ آبستنی، باعث ایجاد ناهنجاری‌های شکاف کام، مهره‌ی شکاف‌دار و آگزنسفال شذ (۹). در مطالعه‌ی Abdel Salam و Abd Alaziz Allam بیان شده است که تجویز والپروات سدیم با دز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت گساوژ در روزهای ۲۰-۱ آبستنی، باعث ایجاد تأخیر تکامل و استخوانی شدن در اسکلت محوری و زایده‌ای جنین موش صحرایی می‌شود (۱۰).

کارودیلول، آنتاگونیست گیرنده‌ی بتا است. هر چند این دارو به طور عمده در بیماری‌های قلبی کاربرد دارد، اما برای آن اثرات محافظتی علیه عوامل اکسیدان نیز برشمرده‌اند (۱۱). همچنین، متابولیت هیدروکسیله‌ی آن، توان قوی‌تری از خود کارودیلول دارد. این دارو، با جمع کردن رادیکال‌های آزاد از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی جلوگیری می‌نماید (۱۲). خاکساری و همکاران گزارش کردند که تجویز کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی در روز ۱۳ آبستنی، ناهنجاری‌های سیستم اسکلتی ناشی از سیکلوفسفامید در جنین موش را کاهش داد (۴). کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، از طریق خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند اثرات مخرب تزریق طولانی مدت D-گالاکتوز را که سبب پیری و کاهش یادگیری و حافظه می‌شود، بهبود بخشد (۱۳).

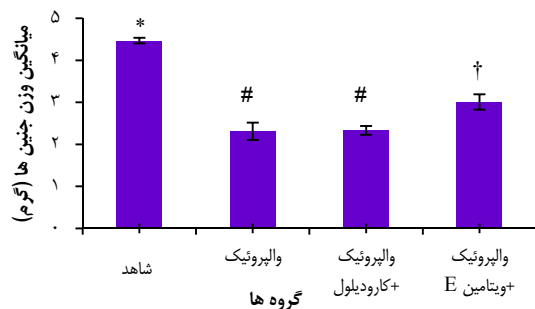
ویتامین E نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده است

معنی دار تلقی شد. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد در نمودار و جداول نشان داده شدند.

یافته‌ها

تعداد کل موش‌های مادر آبستن در گروه‌های مختلف، ۳۰ سر و تعداد جنین‌های به دست آمده ۲۲۵ سر بود که به تفکیک در گروه‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. بررسی نتایج آماری نشان داد که درصد جنین‌های زنده و جذب شده در گروه‌های مختلف با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشت.

وزن جنین‌ها: وزن هر جنین بر حسب گرم تعیین شد و میانگین وزن جنین‌های هر گروه در شکل ۱ مشخص گردید. میانگین وزن جنین‌ها در گروه‌های شاهد، والپروات سدیم، والپروات سدیم به همراه کارودیلول و والپروات سدیم به همراه ویتامین E به ترتیب $0/46 \pm 0/20$ ، $0/30 \pm 0/10$ ، $0/33 \pm 0/18$ ، $0/46 \pm 0/20$ گرم محاسبه شد. با توجه به شکل ۱، میانگین وزن جنین‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به طور معنی داری ($P < 0/001$) کمتر از میانگین وزن جنین‌های سایر گروه‌ها به استثنای گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه کارودیلول ($P > 0/050$) بود.



شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین \pm انحراف معیار وزن (گرم) در جنین‌های گروه‌های مختلف تحت مطالعه

* نشان دهنده‌ی اختلاف معنی دار ($P < 0/050$) وزن گروه شاهد با سایر گروه‌ها می‌باشد.
نشان دهنده‌ی اختلاف معنی دار ($P < 0/050$) وزن گروه والپروئیک و والپروئیک به همراه کارودیلول با سایر گروه‌ها می‌باشد.
† نشان دهنده‌ی اختلاف معنی دار ($P < 0/050$) وزن گروه والپروئیک و والپروئیک به همراه ویتامین E با سایر گروه‌ها می‌باشد.

موش صحرایی آبستن نگه‌داری شد. نحوه‌ی مصرف داروها به صورتی بود که برای موش‌های گروه اول (گروه شاهد)، در روزهای ۸ و ۹ آبستنی به صورت هم‌حجم والپروات سدیم و نرمال‌سالین به شکل داخل صفاقی تجویز شد. برای موش‌های گروه دوم (گروه والپروات سدیم) در روزهای ۸ و ۹ آبستنی (۹، ۱۶-۱۷) والپروات سدیم به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تجویز شد. برای موش‌های گروه سوم (گروه والپروات سدیم و کارودیلول)، والپروات سدیم، به همراه کارودیلول به میزان ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۱۸) و برای موش‌های گروه چهارم (گروه والپروات سدیم و ویتامین E)، والپروات سدیم، به همراه ویتامین E به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تجویز شد (۱۹).

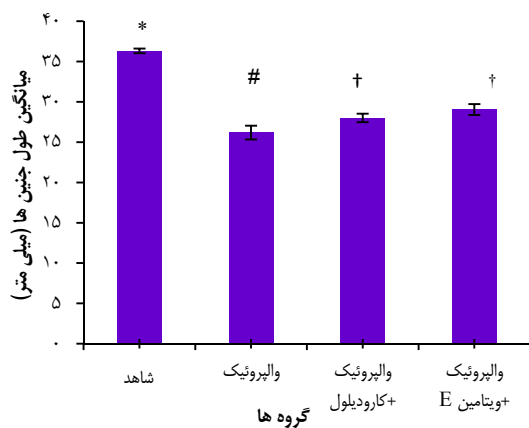
نمونه‌گیری: در روز ۲۰ آبستنی، تمام موش‌های صحرایی دریافت کننده‌ی دارو به روش بیهوشی با کلروفورم، آسان‌کشی شدند و پس از باز کردن محوطه‌ی شکمی و برش شاخ رحم، جنین‌ها از رحم موش صحرایی مادر خارج گردیدند (۱۰). بلافاصله، جنین‌ها از کیسه‌ی آمیون خارج شدند. در مورد هر موش صحرایی، تعداد جنین‌های زنده و جذب شده شمارش شد و سپس، وزن و طول جنین‌های زنده با استفاده از ترازو و کولیس اندازه‌گیری شد. پس از مشاهده‌ی ظاهری و مطالعه‌ی دقیق آن‌ها، پس از پوست‌کنی و احشاءزدایی، جنین‌ها در الکل ۹۶ درجه تثبیت شدند و سپس، در مخلوطی از آلسین آبی ۱۴/۵ درصد و آلیزارین قرمز ۱۲/۵ درصد در اتانول و اسید استیک گلاسیال قرار گرفتند و بعد از قرار گرفتن در محلول پتاس با گلیسرین و آب مقطر شفاف شستشو و در نهایت، در محلول گلیسرین خالص قرار داده شدند (۲۰). نمونه‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ (Nikon SMZ 800 Japan) از نظر ناهنجاری‌های سیستم اسکلتی محوری و زائده‌ای، مورد بررسی دقیق قرار گرفتند.

آنالیز آماری: داده‌های به دست آمده از گروه‌های مختلف مورد مطالعه، در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) ثبت شدند. جهت واکاوی داده‌ها، از آزمون One-way ANOVA و سپس، آزمون (LSD) Least significant difference (جهت تعیین اختلاف داده‌ها) استفاده شد. تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0/050$

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

گروه‌ها	تعداد موش آبستن	تعداد جنین‌های زنده (درصد)	تعداد جنین‌های جذب شده (درصد)
شاهد	۸	۵۹ (۹۶/۷۳)	۲ (۳/۲۷)
والپروات سدیم	۷	۴۸ (۸۸/۸۹)	۶ (۱۱/۱۱)
والپروات سدیم + کارودیلول	۸	۶۱ (۹۳/۸۵)	۴ (۶/۱۵)
والپروات سدیم + ویتامین E	۷	۵۷ (۹۵/۰۰)	۳ (۵/۰۰)

بود (شکل‌های ۸-۳). تعداد و میانگین درصد ناهنجاری‌های مشاهده شده در گروه‌های دریافت کننده داروها در جدول ۲ آمده است. نتایج آماری نشان داد درصد وقوع ناهنجاری‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم دارای اختلاف معنی‌داری ($P < 0/001$) با سایر گروه‌ها است. اگر چه میزان کاهش ناهنجاری‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه ویتامین E نسبت به گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه کارودیلول بیشتر بود، اما اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P > 0/050$).



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین \pm انحراف معیار طول جبین (میلی‌متر) جبین‌های گروه‌های مختلف تحت مطالعه

* نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < 0/050$) گروه شاهد با سایر گروه‌ها می‌باشد.
نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < 0/050$) گروه والپروئیک با سایر گروه‌ها می‌باشد.
† نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < 0/050$) گروه والپروئیک به همراه کارودیلول و والپروئیک به همراه ویتامین E با سایر گروه‌ها می‌باشد.

همچنین، میانگین وزن جبین‌ها در گروه شاهد به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) بیشتر از میانگین وزن جبین‌ها در سایر گروه‌ها بود. میانگین وزن جبین‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه ویتامین E به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) بیشتر از میانگین وزن جبین‌ها در گروه‌های دریافت کننده‌ی والپروات سدیم و والپروات سدیم به همراه کارودیلول و کمتر از میانگین وزن جبین‌ها در گروه شاهد بود.

طول جبین‌ها: همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، میانگین طول جبین‌ها در گروه‌های شاهد، والپروات سدیم، والپروات سدیم به همراه کارودیلول و والپروات سدیم به همراه ویتامین E به ترتیب $31/84 \pm 0/88$ ، $28 \pm 0/52$ ، $26/19 \pm 0/84$ ، $36/32 \pm 0/28$ و $29/50 \pm 0/67$ میلی‌متر محاسبه شد. میانگین طول جبین‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) کمتر از میانگین طول جبین‌های سایر گروه‌ها بود. همچنین، میانگین طول جبین‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه کارودیلول و گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه ویتامین E نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) کمتر بود. میانگین طول جبین‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه کارودیلول، با میانگین طول جبین‌ها در گروه دریافت کننده‌ی والپروات سدیم به همراه ویتامین E اختلاف معنی‌داری نداشت.

ناهنجاری‌های اسکلتی: ناهنجاری مشاهده شده در جبین‌ها به دنبال مصرف والپروات سدیم به صورت جذب شدن جبین، آمفالوسل، اگزوسفالی، شکاف کام، مهره‌ی شکاف‌دار، به هم چسبیدن مرکز بدنه‌ی مهره‌ها، استخوانی نشدن مهره‌های جناغ و دنده‌ی ناقص

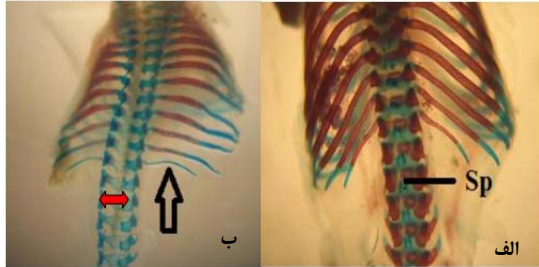
جدول ۲. تعداد و میانگین درصد ناهنجاری‌های مشاهده شده در جبین‌های گروه‌های مختلف

گروه‌ها	ناهنجاری‌ها تعداد (درصد)				
	شکاف کام	مهره‌ی شکاف‌دار	اگزوسفالی	آمفالوسل	عدم استخوانی شدن جناغ
شاهد	#	#	#	†	†#
والپروات سدیم	*	*	*	*	*
والپروات سدیم + کارودیلول	#	#	#*	#*	†#*
والپروات سدیم + ویتامین E	#	#*	#	†#*	†#

گروه‌ها	شکاف کام	مهره‌ی شکاف‌دار	اگزوسفالی	آمفالوسل	عدم استخوانی شدن جناغ	ستون مهره	دنده‌ی ناقص
شاهد	۷ (۱۴/۵۸)	۸ (۱۶/۶۶)	۷ (۱۴/۵۸)	۵ (۱۰/۴۱)	۷ (۱۴/۵۸)	۳ (۶/۲۵)	۳ (۶/۲۵)
والپروات سدیم + کارودیلول	۵ (۸/۱۹)	۴ (۶/۵۵)	۴ (۶/۵۵)	۵ (۸/۱۹)	۴ (۶/۵۵)	۳ (۴/۹۱)	۳ (۴/۹۱)
والپروات سدیم + ویتامین E	۵ (۸/۷۷)	۲ (۳/۵۰)	۲ (۳/۵۰)	۲ (۳/۵۰)	۳ (۵/۲۶)	۱ (۱/۷۵)	۱ (۱/۷۵)

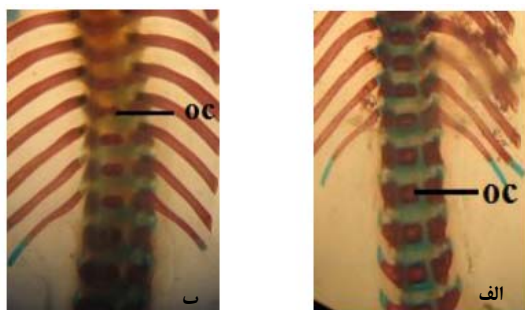
†، # و * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < 0/050$) ناهنجاری‌ها بین گروه‌ها در هر ستون می‌باشد.

و والپروات سدیم به همراه ویتامین E اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما نسبت به میانگین طول در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به طور معنی‌داری کمتر بود.



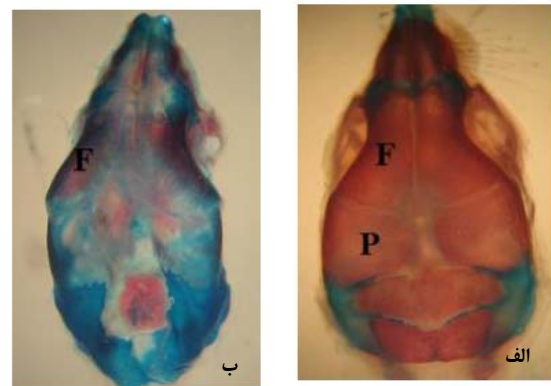
شکل ۵. تصویر استریومیکروسکوپی نمای پشتی ستون مهره‌ی جنین ۲۰ روزه‌ی موش صحرایی (رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). الف) نمای پشتی ستون مهره‌ی جنین سالم موش صحرایی (زایدی شوکی: SP)؛ ب) مهره‌ی شکاف‌دار (اسپاینا بیفیدا) با پیکان قرمز رنگ و عدم استخوانی شدن دنده‌ی آخر با پیکان سیاه مشاهده می‌شود.

همچنین، اگر چه میزان کاهش ناهنجاری‌ها در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه ویتامین E نسبت به گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه کارودیلول بیشتر بود، اما اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.



شکل ۶. تصویر استریومیکروسکوپی نمای شکمی ستون مهره‌ی جنین ۲۰ روزه‌ی موش صحرایی (رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). الف) بدنه‌ی مهره‌های ستون مهره‌ی جنین سالم موش صحرایی دارای یک مرکز استخوان‌سازی است. ب) بدنه‌ی مهره‌های جنین ناهنجار، دارای حداقل دو مرکز استخوان‌سازی است که به یکدیگر جوش خورده‌اند.

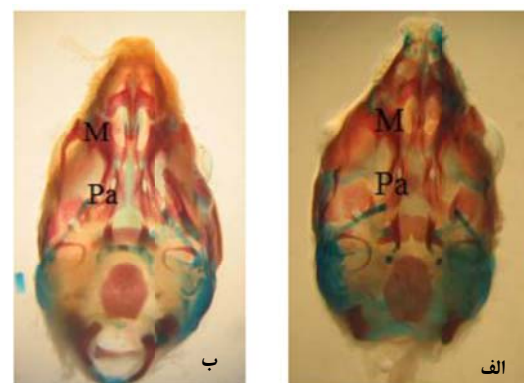
همچنین، بر اساس نتایج به دست آمده، مشخص گردید بیشترین درصد ناهنجاری در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم مربوط به مهره‌ی شکاف‌دار بود، اما پس از تجویز کارودیلول همراه با والپروات سدیم و ویتامین E همراه با والپروات سدیم، بیشترین درصد ناهنجاری مربوط به شکاف کام بود. با توجه به تشکیل مهره و تزریق



شکل ۳. تصویر استریومیکروسکوپی نمای پشتی جمجمه‌ی جنین ۲۰ روزه‌ی موش صحرایی (رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). الف) در نمای پشتی جمجمه‌ی سالم جنین موش صحرایی استخوان‌های پیشانی (F) و آهیانه‌ی (P) به صورت طبیعی مشاهده می‌شوند. ب) این استخوان‌ها به صورت کامل تشکیل نشده است و مغز به راحتی از آن بیرون می‌زند و موجب اگزوسفالی می‌شود.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، مشاهده گردید که استفاده از والپروات سدیم، به طور معنی‌داری باعث کاهش وزن و طول جنین‌ها گردید.



شکل ۴. تصویر استریومیکروسکوپی سطح شکمی جمجمه‌ی جنین ۲۰ روزه‌ی موش صحرایی پس از برداشتن فک پایین (رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز-آلسین آبی). الف) نمای شکمی جمجمه‌ی جنین سالم موش صحرایی (استخوان کام: Pa و فک بالا: M)؛ ب) نمای شکمی جمجمه‌ی جنین دارای ناهنجاری شکاف کام (شکاف بین دو قسمت Pa) مشاهده می‌شود.

میانگین وزن جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه ویتامین E به طور معنی‌داری بیشتر از میانگین وزن جنین‌ها در سایر گروه‌ها بود. همچنین، مشاهده شد اگر چه میانگین طول جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده والپروات سدیم به همراه کارودیلول

والپروات سدیم، تجویز این دارو تأثیر بیشتری روی تشکیل مهره‌ی شکاف‌دار داشت.

والپروات سدیم، تجویز این دارو تأثیر بیشتری روی تشکیل مهره‌ی شکاف‌دار داشت.

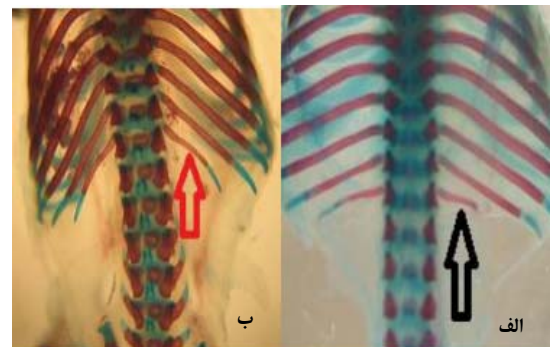
ساختمان غشاهای جفتی که تحت تأثیر والپروات سدیم ایجاد شده است، علت جذب شدن جنین‌ها باشد (۲۲).
Massa و همکاران، مطالعه‌ای بر روی موش‌های سوری آبستن از نظر ناهنجاری اسکلتی ناشی از والپروئیک اسید انجام دادند و گزارش نمودند که تجویز دارو در روز ۸/۵ پس از جفت‌گیری با دز ۲/۷۲ یا ۱/۳۶ مول/کیلوگرم والپروات سدیم به صورت داخل صفاقی باعث بروز ناهنجاری‌های اسکلتی می‌شود (۲۳) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد.

Faiella و همکاران بیان کردند که تجویز داروی والپروات سدیم با دز ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش در روزهای ۸ و ۹ آبستنی، باعث کاهش وزن و ایجاد ناهنجاری اسکلتی از قبیل شکاف کام، ناهنجاری در اندام مانند اسپینایفیدا و ناهنجاری در دنده می‌شود (۱۷) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد.

خاکساری مهابادی و همکاران، اثر پیش‌گیری‌کننده‌ی ملاتونین و کارودیلول در ایجاد شکاف کام و ناهنجاری‌های اسکلتی ایجاد شده توسط سیکلوسفامید را در جنین موش مورد مطالعه قرار دادند. در روز ۱۰ آبستنی، سیکلوسفامید با دز ۲۰ میلی‌گرم، ملاتونین با دز ۱۰ میلی‌گرم و کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم در روز ۱۰ آبستنی تزریق شد. درصد بروز شکاف کام در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی ملاتونین و کارودیلول کاهش یافت. ناهنجاری‌های اسکلتی ایجاد شده شامل نقص مهره‌ای و نقص در جناغ بود که در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی ملاتونین و کارودیلول کاهش یافت. همچنین، بیان شد که کارودیلول اثر پروفیلاکتیک بیشتری برای مهار سیکلوسفامید در ایجاد شکاف کام و ناهنجاری‌های اسکلتی دارد (۴).

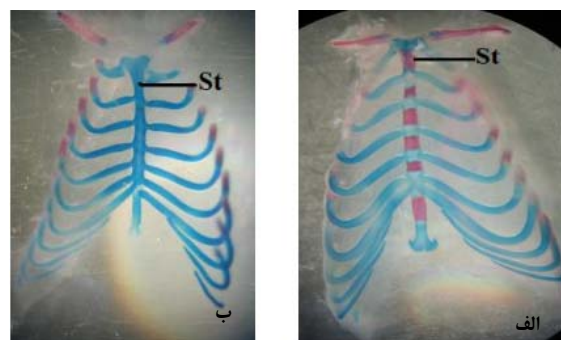
خواص آنتی‌اکسیدانی کارودیلول در مطالعات متعدد به اثبات رسیده است. به عنوان مثال، رشیدی و همکاران در بررسی اثر کارودیلول و اسانس باریجه بر روی ناهنجاری‌های سیستم اسکلتی ناشی از کافتین در جنین موش صحرائی، گزارش نمودند که درصد ناهنجاری‌های شکاف کام، در گروه دریافت‌کننده‌ی کافتین با دز ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش ۳۳/۳۳ درصد بود. میزان وقوع این ناهنجاری در گروه دریافت‌کننده‌ی کافتین همراه با کارودیلول به ۲/۸۵ درصد و در گروه دریافت‌کننده‌ی کافتین همراه با باریجه به ۸/۳ درصد کاهش یافت. میانگین وزن جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده‌ی کافتین همراه با کارودیلول و کافتین همراه با باریجه، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده‌ی کافتین به تنهایی بود (۲۴).

همچنین بیان شده است که تجویز کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، باعث ایجاد ناهنجاری‌های ظاهری و اسکلتی در جنین موش‌ها نشده است (۴). همچنین، Singh و



شکل ۷. تصویر استریومیکروسکوپی نمای پشتی ستون مهره و دنده‌های شناور جنین ۲۰ روزه‌ی موش صحرائی (رنگ‌آمیزی آلزاین قرمز-آلسین آبی). الف) دنده‌ی سیزدهم به صورت ناقص (غضروف دنده‌ای تشکیل نشده است) با پیکان سیاه و ب) دنده‌ی سیزدهم به صورت کامل با پیکان قرمز رنگ نشان داده شده است.

مطالعات متعددی در مورد ناهنجاری‌های اسکلتی در جنین به دنبال استفاده از والپروات سدیم انجام شده است. برای مثال، Ehlers و همکاران (۸) و نیز Finnell و همکاران (۲۱)، در بررسی اساس تراژوژنسیته والپروئیک اسید در موش آزمایشگاهی، مشاهده کردند که تجویز والپروئیک اسید در روز ۸/۵ آبستنی، علاوه بر ناهنجاری‌ها در اندام‌ها از جمله سین‌داکتیلی، اسپینایفیدا و اولیگوداکتیلی، منجر به عدم موفقیت در بسته شدن طناب عصبی جمجمه‌ای گردید که با برخی از نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد.



شکل ۸. تصویر استریومیکروسکوپی جناغ جنین ۲۰ روزه‌ی موش صحرائی (رنگ‌آمیزی آلزاین قرمز-آلسین آبی). الف) مهره‌های جناغی (St) در جنین سالم ۲۰ روزه‌ی موش صحرائی؛ ب) عدم استخوانی شدن مهره‌های جناغ به خوبی قابل مشاهده می‌باشد.

Elmazar و همکاران بیان داشته‌اند که ممکن است اثر سمی مستقیم دارو یا وضع نامناسب جنین‌ها در اثر تغییرات دژنراتیو

کردند که ویتامین E با دز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، وقوع شکاف کام ناشی از فنی‌توئین را به طور معنی‌داری کاهش داد. آن‌ها وقوع شکاف کام را در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنی‌توئین ۱۶/۶۶ درصد گزارش کردند؛ در حالی‌که با مصرف ویتامین E، این مقدار به ۲/۷۷ درصد کاهش یافت. تجویز ویتامین E با این دز، هیچ‌گونه ناهنجاری اسکلتی را در جنین موش‌ها نشان نداد (۲۶).

خاکساری مهابادی و همکاران، با بررسی اثر پیش‌گیری‌کننده‌ی ملاتونین ویتامین E بر روی ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از آرسنیک در جنین موش صحرایی، گزارش نمودند که ویتامین E با دز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، درصد وقوع ناهنجاری‌های جنینی ناشی از آرسنیک را به شکل معنی‌داری کاهش داد. درصد ناهنجاری‌های شکاف کام، مهره‌ی شکاف‌دار، چسبیدن دنده‌ها و ناهنجاری جناغ در گروه دریافت‌کننده‌ی آرسنیک به ترتیب ۵۰، ۵۰ و ۲۰ درصد گزارش گردید؛ در حالی‌که میزان این ناهنجاری‌ها در گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین E به ۲۲/۲۲، ۱۸/۵۰، صفر و ۲۲/۲۲ درصد کاهش یافت. همچنین، تجویز ویتامین E با این دز، هیچ‌گونه ناهنجاری ظاهری و اسکلتی را در جنین موش‌ها نشان نداد (۱۶).

در مطالعه‌ی حاضر، مشخص شد که تجویز کارودیلول و ویتامین E اگر چه منجر به کاهش درصد ناهنجاری‌های اسکلتی جنین موش صحرایی گردید، اما این کاهش در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروات سدیم به همراه ویتامین E نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی والپروات سدیم به همراه کارودیلول بیشتر بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌داری نبود، اما ویتامین E بر روی تغییرات وزن جنین‌ها اثر محافظتی بیشتری داشت.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری حرفه‌ای دام‌پزشکی با کد ۹۴۷۹۱۰۳۷ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تأمین اعتبار مالی این مطالعه سپاسگزار می‌گردم.

همکاران در مطالعه‌ی خود نمودند که کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کند (۱۸). Morsy و همکاران، بیان نمودند که تجویز کارودیلول با دزهای ۱۰ و ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود، نفروپاتی ناشی از دیابت ایجاد شده با استرپتوزوتوسین با دز ۶۵ میلی‌گرم/کیلوگرم را کاهش داد (۲۵).

خاکساری مهابادی و همکاران، اثر پیش‌گیری‌کننده‌ی ملاتونین و کارودیلول در ایجاد شکاف کام و ناهنجاری‌های اسکلتی ایجاد شده توسط سیکلوسفامید در جنین موش صحرایی را مورد مطالعه قرار دادند. در روز ۱۰ آبستنی، سیکلوسفامید با دز ۲۰ میلی‌گرم، ملاتونین با دز ۱۰ میلی‌گرم و کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم در روز ۱۰ آبستنی تزریق شد. درصد بروز شکاف کام در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی ملاتونین و کارودیلول کاهش یافت. ناهنجاری‌های اسکلتی ایجاد شده، شامل نقص مهره‌ای و نقص در جناغ بود که در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی ملاتونین و کارودیلول کاهش یافت. همچنین، بیان شد کارودیلول اثر پروفیلاکتیک بیشتری برای مهار سیکلوسفامید در ایجاد شکاف کام و ناهنجاری‌های اسکلتی دارد (۴) که در این مطالعه نیز کارودیلول با دز ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم توانست ناهنجاری‌های ناشی از سدیم والپروات را کاهش دهد.

Kumar و همکاران، گزارش کردند که کارودیلول به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود، اگر به میزان ۲ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی به صورت داخل صفاقی تجویز شود، از مسمومیت کلیوی ناشی از مصرف جنتامایسین با دز ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن جلوگیری می‌کند (۱۳).

در مطالعه‌ی حاضر، ویتامین E توانست ناهنجاری‌های جنینی ناشی از والپروات سدیم را کاهش دهد که این تأثیر در مطالعات دیگران هم گزارش گردید. به عنوان مثال، خاکساری مهابادی و نجف‌زاده در مقایسه‌ی اثر ویتامین E و سیلیمارین بر روی ناهنجاری‌های جنینی ناشی از فنی‌توئین در موش صحرایی مشاهده

References

1. 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(4): 1304-10.
2. Giavini E, Menegola E. Gene-teratogen interactions in chemically induced congenital malformations. *Biol Neonate* 2004; 85(2): 73-81.
3. Lloyd KA. A scientific review: Mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Biosci Horiz* 2013; 6: hzt003.
4. Khaksary Mahabady M, Najafzadeh Varzi H, Bakhtiari E. The effects of cyclophosphamide, melatonin and carvedilol on neural tube and skeletal system of mice fetuses in prenatal period. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 2011; 193(5): 459-65.
5. Rengasamy P, Padmanabhan RR. Experimental studies on cervical and lumbar ribs in mouse embryos. *Congenit Anom (Kyoto)* 2004; 44(3): 156-71.
6. Menegola E, Broccia ML, Prati M, Giavini E. Stage-dependent skeletal malformations induced by valproic acid in rat. *Int J Dev Biol* 1998; 42(1): 99-102.
7. Menegola E, Broccia ML, Di RF, Giavini E.

- Comparative study of sodium valproate-induced skeletal malformations using single or double staining methods. *Reprod Toxicol* 2002; 16(6): 815-23.
8. Ehlers K, Sturje H, Merker HJ, Nau H. Valproic acid-induced spina bifida: A mouse model. *Teratology* 1992; 45(2): 145-54.
 9. Khaksary Mahabady M, Najafzadeh Varzi H, Ranjbar R, Rahgazar O. Prophylactic effects of melatonin on sodium valproate-induced neural tube defects and skeletal malformations in rat embryos. *Am J Appl Sc* 2011; 8(5): 413-9.
 10. Abdel Salam G, Abd Alaziz Allam O. The effects of valproic acid on the skeletal development and the ameliorative effects of combined use of folic acid and vitamin E in pregnant albino rats. *Int J Clin Dev Anat* 2015; 1(3): 70-8.
 11. Pecivova J, Macickova T, Lojek A, Gallova L, Ciz M, Nosal' R, et al. Effect of carvedilol on reactive oxygen species and enzymes linking innate and adaptive immunity. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27(Suppl 2): 160-3.
 12. Yoshioka T, Iwamoto N, Tsukahara F, Irie K, Urakawa I, Muraki T. Anti-NO action of carvedilol in cell-free system and in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2000; 129(7): 1530-5.
 13. Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 380(5): 431-41.
 14. Yue TL, McKenna PJ, Lysko PG, Ruffolo RR, Jr., Feuerstein GZ. Carvedilol, a new antihypertensive, prevents oxidation of human low density lipoprotein by macrophages and copper. *Atherosclerosis* 1992; 97(2-3): 209-16.
 15. Boskovic R, Gargaun L, Oren D, Djulus J, Koren G. Pregnancy outcome following high doses of Vitamin E supplementation. *Reprod Toxicol* 2005; 20(1): 85-8.
 16. Khaksary Mahabady M, Najafzadeh Varzi H, Ranjbar R, Mehrzadi S. Melatonin and vitamin E protects against sodium arsenite-induced skeletal malformations in rats. *Am-Euras J Toxicol Sci* 2011; 3(3): 184-9.
 17. Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostick U, Hofmann C, Hustert E, et al. A mouse model for valproate teratogenicity: Parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Hum Mol Genet* 2000; 9(2): 227-36.
 18. Singh A, Naidu PS, Gupta S, Kulkarni SK. Effect of natural and synthetic antioxidants in a mouse model of chronic fatigue syndrome. *J Med Food* 2002; 5(4): 211-20.
 19. 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.
 20. Cruz YP. *Laboratory exercises in developmental biology*. New York, NY: Academic Press; 1993.
 21. Finnell RH, Bennett GD, Karras SB, Mohl VK. Common hierarchies of susceptibility to the induction of neural tube defects in mouse embryos by valproic acid and its 4-propyl-4-pentenoic acid metabolite. *Teratology* 1988; 38(4): 313-20.
 22. Elmazar MM, Thiel R, Nau H. Effect of supplementation with folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on valproic acid-induced teratogenesis in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1992; 18(3): 389-94.
 23. Massa V, Cabrera RM, Menegola E, Giavini E, Finnell RH. Valproic acid-induced skeletal malformations: associated gene expression cascades. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(11): 787-800.
 24. Rashidi F, Khaksary-Mahabady M, Ranjbar R, Najafzadeh-Varzi H. The effects of essential oil of galbanum on caffeine induced-cleft palate in rat embryos. *Zahedan J Res Med Sci* 2014; 16(2): 37-41.
 25. Morsy MA, Ibrahim SA, Amin EF, Kamel MY, Abdelwahab SA, Hassan MK. Carvedilol ameliorates early diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 105214.
 26. Khaksary Mahabady M, Najafzadeh Varzi H. A compression study of effects of vitamin E and silymarin on phenytoin-induced cleft palate in rats. *J Biol Sci* 2009; 9(4): 381-4.

The Effects of Carvedilol and Vitamin E on Sodium Valproate-Induced Skeletal Teratogenicity in Rat Fetuses

Reza Ranjbar¹, Fatemeh Hosseini-Siahi², Mahmood Khaksary-Mahabady², Hossein Njafzadeh-Varzi³

Original Article

Abstract

Background: Sodium valproate, an anticonvulsant drug, has teratogenic effects on humans' and animals' skeletal system via causing free radicals and oxidative stress. Carvedilol has beta-blocker, antioxidant and anti-inflammatory effects and was the benefit in diseases such as diabetes and renal failure and has protective effect in experimental oxidative stress models. The aim of this study was to compare the roles of carvedilol and vitamin E (a well-known antioxidant) in reducing or preventing skeletal abnormalities from sodium valproate in rat fetuses.

Methods: This study was performed on 30 pregnant rats in four groups. On 8th and 9th days of pregnancy, for first (control) to fourth groups, intraperitoneal normal saline, sodium valproate (300 mg/kg), sodium valproate (300 mg/kg) plus carvedilol (5 mg/kg), and valproate sodium (300 mg/kg) plus vitamins E (100 mg/kg) were administrated, respectively. On the 20th day of pregnancy, all rats were euthanized and fetuses were extracted. Weight and height were determined, skeletal system samples were stained by Alizarin red-alcian blue method, and skeletal system was examined by stereomicroscope.

Findings: In fetuses of sodium valproate group, the incidence rates of exencephaly, cleft palate, spina bifida, and omphalocele were 14.58%, 14.58%, 16.66%, and 10.41%, respectively. However, it decreased to 6.55%, 8.19%, 6.55%, and 8.19% by carvedilol and so to 3.5%, 8.75%, 3.5%, and 3.5% by vitamin E, respectively. The mean length of fetuses in sodium valproate group plus carvedilol and sodium valproate plus vitamin E was significantly less than the mean length in the control group but did not have significant differences with each other. The mean fetal weight in sodium valproate plus vitamin E group was significantly more than sodium valproate and sodium valproate plus carvedilol, although it was lower than the control group.

Conclusion: Carvedilol and vitamin E had similar effects on fetal skeletal abnormality and changes of fetal length caused by sodium valproate; but vitamin E was more protective against fetal weight changes.

Keywords: Valproate, Carvedilol, Vitamin E, Drug-induced abnormalities, Gestation

Citation: Ranjbar R, Hosseini-Siahi F, Khaksary-Mahabady M, Njafzadeh-Varzi H. **The Effects of Carvedilol and Vitamin E on Sodium Valproate-Induced Skeletal Teratogenicity in Rat Fetuses.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(448): 1289-97.

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

2- DVM, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

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

Corresponding Author: Reza Ranjbar, Email: dabir120@yahoo.com