

بررسی اثرهای ناهنجاری زایی متوکسالن بر رشد و نمو کبد و کلیه جنین موش آزمایشگاهی در روزهای ۷، ۸، و ۹ بارداری

کازم پریور، Ph.D.*، عباسی شکروی، Ph.D.**، محسن فدایی، M.Sc.*

* گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران

** گروه شیمی دانشگاه تربیت معلم تهران

تاریخ وصول: بهمن‌ماه ۸۰، تاریخ پذیرش: فروردین‌ماه ۸۱

چکیده

هدف: پژوهش حاضر به منظور بررسی احتمالی تأثیر این دارو بر جنین مادران باردار در موش نژاد Balb/c انجام شده است. پسرالنها یک گروه از ترکیبهای سه حلقه‌ای، هتروسیکلی و مسطح هستند که در معالجه برخی از اختلالات پرولیفراتیو اپیدرم استفاده می‌شوند. متوکسالن همراه با اشعه فرابنفش با طول موج بلند (UVA، ۳۲۰-۴۰۰) به کار می‌رود.

مواد و روشها: میزان LD50 این دارو در حد ۳۰۰ mg/kg تعیین شد و دوز UVA که سبب اریتما می‌شود، 0.046 J/cm^2 است. یک دوز معالجه‌ای از دارو به میزان ۱۶۰ mg/kg از محلول متوکسالن به صورت درون صفاقی به موشهای باردار در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری تزریق شد و ۲ ساعت بعد موشها در معرض UVA به میزان 0.034 J/cm^2 قرار گرفتند و تجربه‌های متوکسالن بدون UVA و همراه UVA نیز انجام شد.

یافته‌ها: تشریح ماکروسکوپی و میکروسکوپی جنینها در روز پانزدهم بارداری نشان داد که ناهنجاریهای معنی‌دار در کبد و کلیه جنینهای تجربی در مقایسه با جنینهای کنترل وجود دارد ($P < 0.05$). ناهنجاریهای ایجاد شده عبارتند از: کاهش تعداد سلولهای هیپاتوسیت، افزایش تعداد سلولهای مگاکاریوسیت، افزایش گلبولهای قرمز هسته‌دار، کاهش تعداد گلو مروزها و تعداد توبولهای کلیوی.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که متوکسالن در دوره اندام‌زایی باعث ایجاد ناهنجاریهای جنینی در حیوانات تجربی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: متوکسالن، اشعه فرابنفش با طول موج بلند (UVA، ۳۲۰-۴۰۰ nm)، ناهنجاری‌زایی، جنین موش

مقدمه

از دیگر داروهایی که در دوران اختلالات پرولیفراتیو استفاده می‌شود آنترالین (دایترانول یا سینگولین) است که اثرهای ناهنجاری‌زایی این دارو بر رشد و نمو جنین موش آزمایشگاهی در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری مطالعه شده است. ناهنجاریهای ایجاد شده عبارتند از اگزوهپاتیک، اگزونسفالی، سین داکتیلی، لورودوزیس، جنینهای کوچک و آمفالوسل [۲]. متوکسالن یک ماده فعال شونده با نور است که در گیاه Ammi majus از خانواده چتریان (Umbeliferae) قرار دارد. متوکسالن به گروه پسرالنها یا فورکومارین متعلق است. نام شیمیایی آن

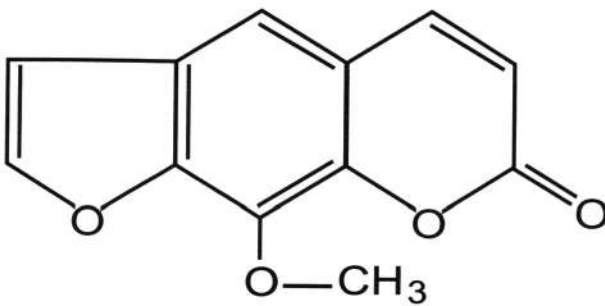
پسرالنها از نظر کلینیکی داروهای مهمی هستند که در معالجه برخی از اختلالات پرولیفراتیو اپیدرم شامل پسروریزیس، ویتلیگو، اگزما، میکوزفونگوئید، استفاده می‌شود. اثر درمانی این ترکیبها به فعال‌سازی آنها به وسیله نور فرابنفش در دامنه A (۳۲۰-۴۰۰ nm) بستگی دارد. بنابراین، ترکیب پسرالنها (p) و تابش اشعه‌های فرابنفش با طول موج بلند (UV، ۳۲۰-۴۰۰ nm) با واژه PUA شناسایی می‌شود [۱].

آدرس مکاتبه: دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم
کدپستی ۱۵۶۱۴، Email: Kazem_parivar@yahoo.com

به صفر می‌رسد و دارو در کبد متابولیز می‌شود و تقریباً ۹۰ درصد از دارو همانند یک سری از متابولیتها بعد از ۲۴ ساعت از طریق ادرار دفع می‌شود [۷].

مواد و روشها

متوکسالن مورد استفاده در این تحقیق از کمپانی Aldrich تهیه شد و و بعضی مشتقات آن نیز در دانشکده شیمی تربیت معلم تهران ساخته شده است (شکل ۱). در این تحقیق از لامپ UVA (L40/79k) استفاده شد و حیوانهای تجربی مورد استفاده موشهای سفید آزمایشگاه نژاد Balb/c با دامنه وزنی ۳۰-۲۴ گرم بودند. موشها در اطاق پرورش حیوانات گروه زیست‌شناسی و در شرایط مشابه با شرایط طبیعی نگهداری شدند. ابتدا میزان کشنده LD50 این دارو و دوز UVA که سبب اریتما می‌شود در حیوانها تعیین شد و LD50 دارو ۳۰۰ mg/kg به‌دست آمد. برای تعیین دوز UVA، ناحیه‌ای از پوست موشها به قطر ۲ سانتیمتر تراشیده شد و سپس حیوانها ۲ ساعت بعد از تزریق دارو در معرض سطوح متفاوتی از دوز UVA قرار گرفتند. دوز حساس به نور (MPD) کوچکترین سطحی از UVA که بعد از ۷۲ ساعت سبب اریتما می‌شود 0.46 j/cm^2 تشخیص داده شد [۳].



شکل ۱. ساختار مولکول متوکسالن که به‌عنوان دارو استفاده شده است.

در مجموعه آزمایشها سه گروه تجربی در نظر گرفته شد؛ در اولین تجربه، متوکسالن محلول در روغن زیتون با غلظت ۱۶۰ mg/kg به‌صورت درون صفاقی به موشهای باردار در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری تزریق شد. مقدار تزریق دارو بر

9-methoxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyryom-7-one است. مکانیسم دقیق عمل متوکسالن ناشناخته است و بهترین واکنش بیوشیمیایی شناخته شده برای متوکسالن عمل متقابل آن با DNA است. متوکسالن به محض فعال‌شدن با نور، اتصالهایی بین پیوندهای دوگانه ۴ و ۵ DNA یا پیوندهای دوگانه ۳ و ۴ با بازهای پیریمیدین (تیمین و سیتوزین) تشکیل می‌دهد. متوکسالن، ممکن است به یک رشته منفرد از DNA نیز متصل شود یا با هر دو رشته DNA اتصال عرضی^۱ برقرار کند که این اتصال عرضی از همانندسازی DNA ممانعت به عمل می‌آورد. بنابراین، حالت هیپرپرولیفراسیون پسونیازیس را کاهش می‌دهد. افزون بر آن، فعال‌شدن نوری پسونال باعث ایجاد گونه اکسیژن واکنش‌پذیر^۲ از قبیل سوپر اکسید می‌شود که این عمل نیز پرولیفراسیون ملانوسیت را تحریک می‌کند [۳، ۴ و ۵].

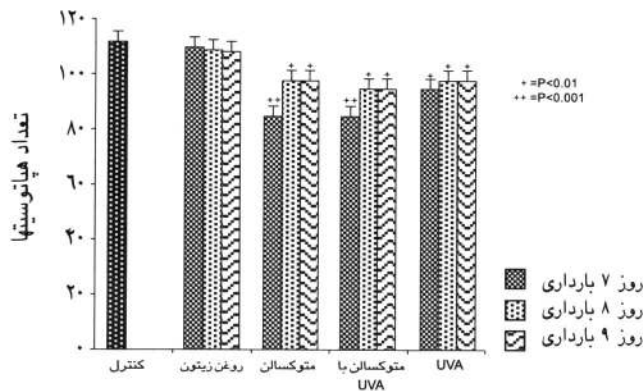
تشکیل اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) در سلولها همراه با ترکیب پسونال-پروئتین و اسیدنوکلیک-پسونال دلالت بر اثرهای درمانی و بیولوژیکی پسونال و نور UVA در بیماری دارد. مهار رشد بستگی به دوز نور UVA و غلظت پسونال دارد. آنالیزهای Isobologram نشان می‌دهد که با افزایش غلظت پسونال نور UVA کمتری برای ممانعت از رشد سلول مورد نیاز است و نتیجه آن تقویت عمل پسونال توسط نور فرابنفش سینرژیک است [۳ و ۶].

متوکسالن همراه با اشعه UVA به سلول آسیب می‌رساند و از طریق خون به پوست می‌رسد و UVA هم به داخل پوست نفوذ می‌کند. اگر آسیب سلول پوست به اندازه کافی باشد یک واکنش التهابی اتفاق می‌افتد که ظهور آشکار این واکنش به نام اریتما^۳ است که ممکن است برای چندین ساعت این واکنش شروع نشود. حداقل دوز سمیت به نور^۴ حساسیت آستانه‌ای بیمار را به PUVA نشان می‌دهد و برای شروع دوز درمان PUVA به کار می‌رود [۴].

دوز UVA متناسب با حساسیت بیمار تغییر می‌کند، سطح متوکسالن (8-Mop) پلاسما ۲ تا ۳ ساعت بعد از خوردن دارو به حداکثر می‌رسد و این عمل با دامنه واکنش‌پذیری پوست به UVA منطبق است. بنابراین، تابش UVA باید ۲ تا ۳ ساعت از خوردن 8-MOP صورت گیرد. حساسیت نوری بعد از ۸ ساعت

1- Cross-link
2- Reactive oxygen species
3- Erythema
4- Minimum dose phototoxicity

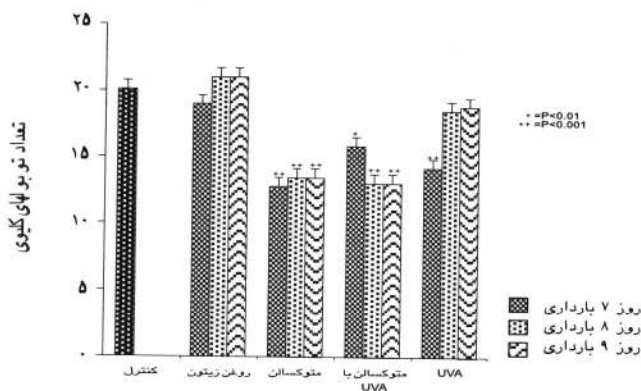
بارداری نیز در تجربه متوکسالن با UVA نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۲. مقایسه تعداد هپاتوسیت در تجربه‌های متوکسالن، متوکسالن با UVA و UVA

نتایج تجربه‌ها رشد و نمو کلیه

بررسی‌های به عمل آمده از مقاطع بافتی کلیه در جنینهای تجربی روز هفتم بارداری نشان داد که طول، تعداد گلوبولها و تعداد توپولهای کلیوی در هر سه تجربه (متوکسالن، متوکسالن با UVA و UVA) در مقایسه با جنینهای کنترل کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0.001$). همچنین، عرض کلیه در روز هفتم بارداری کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.001$) (شکل ۴).



شکل ۴. مقایسه تعداد توپولهای کلیوی در تجربه‌های متوکسالن، متوکسالن با UVA و UVA

مطالعه‌های میکروسکوپی کلیه در روزهای ۸ و ۹ بارداری بیانگر کاهش معنی دار طول کلیه و تعداد توپولهای کلیوی در تجربه‌های متوکسالن و متوکسالن با UVA در مقایسه با جنینهای کنترل است ($P < 0.001$). همچنین در تمامی

اساس وزن بدن به طور متوسط حدود 160 mg/kg انتخاب شد. زیرا در دوزهای بالاتر جنینها می‌مردند یا موشهای باردار به علت کم بودن مقاومت بدنی از بین می‌رفتند. دو ساعت بعد از تزریق دارو موشها در معرض نور UVA با دوز 0.34 J/cm^2 قرار گرفتند. در دومین تجربه محلول متوکسالن با غلظت 160 mg/kg به صورت درون صفاقی به موشهای باردار در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری تزریق شد ولی موشها در معرض تابش UVA قرار نگرفتند. در سومین تجربه، موشهای باردار در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری در معرض نور UVA با دوز 0.34 J/cm^2 قرار گرفتند. در کلیه تجربه‌ها موشهای تجربی و شاهد در پایان روز پانزدهم بارداری تشریح شدند و جنینها و جفتها به دست آمده تحت بررسیهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفتند.

یافته‌ها

نتایج تجربه‌ها بر رشد و نمو کبد

مطالعه‌های میکروسکوپی کبد در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری بیانگر کاهش معنی دار تعداد سلولهای هپاتوسیت در جنینهای تجربی در هر سه تجربه (متوکسالن، متوکسالن با UVA، UVA در مقایسه با جنینهای کنترل بود. در تجربه متوکسالن با UVA (PUVA) در مقایسه با دو تجربه دیگر تعداد سلولهای هپاتوسیت کاهش بیشتری یافته بود که بیانگر این نکته است که ترکیب این دو عامل (متوکسالن و UVA) باعث تقویت فارماکولوژیکی دارو می‌شود. همچنین تعداد مگاکاریوسیتها در تجربه متوکسالن در مقایسه با جنینهای کنترل افزایش نشان می‌دهد اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نیست؛ ولی در تجربه متوکسالن با UVA در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری تعداد مگاکاریوسیتها کبد در مقایسه با جنینهای کنترل افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.01$) (شکل ۲).

بررسیهای میکروسکوپی جنینهای تجربی در تجربه‌های متوکسالن با UVA (PUVA) و متوکسالن بیانگر افزایش معنی داری در تعداد گلبولهای قرمز هسته‌دار در مقایسه با جنینهای کنترل است که این پدیده نشان‌دهنده نوعی تأخیر در تمایز این سلولها است. قطر سلولهای هپاتوسیت در روز نهم

تجربه بیانگر کاهش معنی دار تعداد سلولهای هیپاتوسیت در مقایسه با جنینهای کنترل است. که با نتایج Mcneely که گزارش کرد پسورالنها باعث تغییر در هیپاتوسیتها می شوند، مطابقت دارد [۳]. فراوانی تعداد مگا کاربوسیتها در تجربه متوکسالن با UVA دلیل بر تأخیر در رشد و نمو است؛ زیرا شواهد مذکور نشان دهنده خونسازی فراوان در کبد است و در واقع تعداد مگا کاربوسیتها شاخص عمل خونسازی در کبد هستند. همچنین افزایش معنی دار تعداد گلبولهای قرمز هسته دار در تجربه متوکسالن و متوکسالن با UVA بیانگر تأخیر در تمایز گلبولهای قرمز است در بررسیهای میکروسکوپی کلیه جنینهای تجربی تراکم بافت بینابینی در بین لوله ها به طور کامل مشهود است. این تراکم نشان با ارزشی از عدم تمایز آنها به لوله های کلیوی است. به نظر می رسد که بروز چنین نتایجی در کلیه ها از کاهش رشد آن و تأخیر تمایز بافت بینابینی نتیجه می شود.

اگر چه به نظر می رسد که UVA به خاطر اینکه انرژی کمی دارد، اثرهای مضر کمی داشته باشد اما پژوهشهای ما نشان می دهد که UVA نیز در بعضی موارد در کبد و کلیه جنینهای تجربی ناهنجاری ایجاد می کند که ممکن است در اثر تولید رادیکالهای اکسیژن آزاد که در اثر تابش UVA به سطح پوست به وجود می آید این ناهنجاریها ایجاد شده باشند. نتایج این کار پژوهشی نشان می دهد که متوکسالن در حیوانات ناهنجاری زا است و ممکن است کاربرد آن در انسان نیز چنین خطراتی را ایجاد کند. بنابراین، توصیه می شود در مادران مبتلا به بیماریهای پرولیفراتیو اپیدرم و تحت درمان PUVA در صورت امکان در دوره دومه اول بارداری که در طی آن جنین اندامزایی می کند، از این روش درمانی استفاده نشود.

References

۱. پریور کاظم، شکروی عباس، تقی محمد. بررسی اثرات ناهنجاری زایی آنترالین بر رشد و نمو جنین موش آزمایشگاهی در روزهای ۷، ۸ و ۹ حاملگی. سبزه علوم دانشگاه تهران، ۱۳۷۶، جلد ۲۵، شماره ۱، صفحات: ۷۲-۶۳
2. Yurkow EJ, Laskin JD. Mechanism of action of psoralens isobologram analysis reveals that ultraviolet

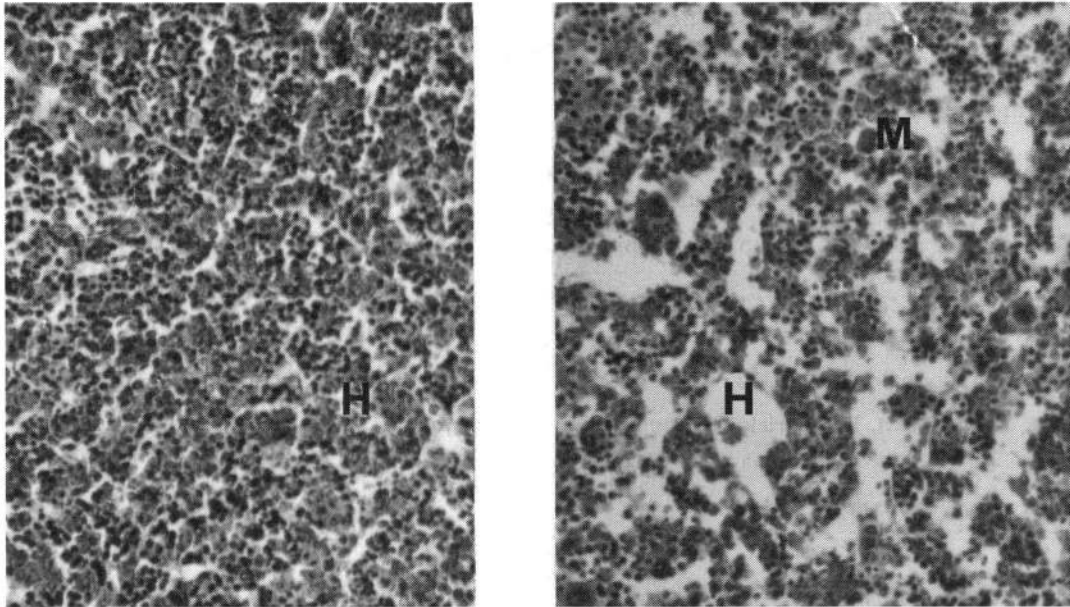
تجربه های روز ۸ و ۹ بارداری تعداد گلوبولهای کلیه کاهش معنی داری را نسبت به جنینهای کنترل با $P < 0.001$ نشان داد. به علاوه؛ در مقاطع بافتی کلیه جنینهای تجربی، تراکم چشمگیری از بافت بینابینی به چشم می خورد. فراوانی بافت بینابینی دلیل بر عدم تمایز آنها است. بنابراین به نظر می رسد که متوکسالن از تمایز این بافت به لوله های کلیوی جلوگیری کرده است (شکل ۵).

بحث

به علت اینکه درمان متوکسالن با نور فرابنفش با طول موج بلند (PUVA) (320-400nm, UVA) موثر است و تبادلهای کروماتیدهای خواهری را القا می کند [۸ و ۹]، ما اثرهای ترانوژنیک این درمان را در زمان بارداری مطالعه کردیم و همچنین علاقمند شدیم که در کنار این تحقیق اثرهای متوکسالن بدون UVA و UVA به تنهایی را نیز در زمان بارداری مورد مطالعه قرار دهیم. نتایج تحقیق حاضر بیانگر وجود ناهنجاریهای متعددی در کبد و کلیه جنینهای تجربه های متوکسالن با UVA (PUVA) و متوکسالن است که مشابه آنها در بین جنینهای کنترل مشاهده نمی شود و دلالت بر ترانوژن بودن متوکسالن به تنهایی و به صورت ترکیب با UVA (PUVA) دارد. عمده ناهنجاریهای ایجاد شده در این تجربه ها را می توان ناشی از پدیده مهار رشد یا پدیده تأخیر در رشد و نمو دانست. چون کبد نقش دفاعی بدن را بر عهده دارد و سمیت داروهای گوناگون نیز به وسیله آن از بین نمی رود، پس منطقی است که با ورود متوکسالن به جریان خون، کبد برای کاهش سمیت داروها وارد عمل شده و در سلولهای آن تغییراتی ایجاد می شود. بررسیهای میکروسکوپی از جنینهای تجربی در هر سه

- light potentiation of psoralen action is not additive but synergistic. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991; 27: 315-319
3. Mcneely W, Goa KL. 5-Methoxypsoralen, A Review of its effects in psoriasis and vitiligo. *Drugs.* 1998; 56(4): 667-690

4. **Ibboston SH, Farr PM, Dawa RS.** The effect of methoxsalen dos on ultraviolet A-induced erythma. *J Invest Dermatol.* 2001; 116: 813-815
5. **Sastre MP, Vernet M, Steinert S.** Single-cell gel/comet assay applied to the analysis of UV radiation- induced DNA damage in rhodomonas sp (cryptophyta). *Photochem Photobiol.* 2001; 174(1): 55-60
6. **Morison WL.** Variations of PUVA: Practical and Effective? *Arch Dermatol* 1998; 1134: 1286-1288
7. **Pathak MA, Kramer DM, Fitzpatrick TB.** Sunlighy and man. Chapter 22, 1972, pp 335-368
8. **Stern RS, Lang RL.** Outcomes of pregnancies among women and partners of men with a history of exposure to methoxsalen photochemotherapy (PUVA) for the treatments of psoriasis. *Arch Dermatol.* 1991; 127: 347-351
9. **Stern RS.** Metastatic squamous cell cancer after psoralen. *Photochemother Lancet.* 1994; 334: 1644-1645



شکل ۳. فتومیکروگراف کبد جنین کنترل (a) و جنین تجربی (b). M: مگاکیوسیت، H: هیاتوسیت بزرگنمایی: ×۸۴۰

شکل ۵. فتومیکروگراف کلیه جنینهای کنترل (a) و تجربی (b). RT: لوله کلیوی، IT: بافت بینابینی، بزرگنمایی: ×۸۴۰

