

ارزیابی اثرات ناهنجاری زایی فنوباریتال بر روی جنین‌های موش نژاد BALB/c در روزهای سوم تا ششم بارداری

منیره منفردی^۱، محسن قیاسی^۲، منیره موحدی^۳، پروین تراب زاده^{۴*}

۱- دکترای تخصصی بیولوژی جانوری-سلولی و تکوینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- دکترای تخصصی بیولوژی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات قلب و عروق شهید رجایی، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

یافته / دوره ۲۶ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۳ / مسلسل ۱۰۱

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۹

مقدمه: فنوباریتال از داروهای آرامبخش و جزء دسته‌ی باربیتورات می‌باشد. باربیتورات‌ها با اثر بر روی نورون‌ها تحریک‌پذیری آن‌ها را کاهش می‌دهد. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثرات ناهنجاری زایی فنوباریتال، بر روی جنین‌های موش ماده بالغ BALB/c انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ۶۰ سر موش ماده بالغ BALB/c با وزن تقریبی ۲۴ تا ۲۶ گرم در شش گروه کنترل، شاهد و تحت درمان طبقه بندی شدند. برای انجام بررسی از آمپول فنوباریتال استفاده شد و دوز کشنده (LD50) در شرایط درون تنی معادل ۳/۸۴ ml/kg.bw محاسبه گردید. تزریق درون صفاقی در روزهای ۳، ۴، ۵ و ۶ بارداری انجام گردید، روز ۷ بارداری (پس از آخرین تزریق) موش‌ها پس از توزین، تشریح شدند؛ رحم و تخمدان آن‌ها با سرم فیزیولوژی استریل شست‌و شو داده شد و ارزیابی ماکروسکوپی و میکروسکوپی بر روی نمونه‌ها انجام گردید. نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و با آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد فنوباریتال موجب سین‌داکتیلی، اگزوهپاتیک، اگزانسفال، اسپینایفیدا، عدم تشکیل اندام حرکتی، عدم تقارن در جهت‌یابی اندام حرکتی، بزرگ شدن کبد، کاهش وزن، کاهش اندازه فرق سری-نشیمنگاهی، خونریزی‌های زیر پوست، بدن C شکل و فتق نافی می‌شود. علاوه بر این کاهش معنادار وزن جنین و جفت و قطر جفت و CR گزارش گردید ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی حاضر نشان داد که احتمالاً داروی فنوباریتال بر روی جنین در مرحله اندام‌زایی تاثیر منفی گذاشته و سبب سقط، ناهنجاری زایی و عدم باروری می‌گردد، لذا باید از مصرف این دارو در دوران بارداری اجتناب جدی کرد.

واژه‌های کلیدی: فنوباریتال، نقص جنین، مطالعه تجربی.

*آدرس مکاتبه: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

پست الکترونیک: p.torabzadeh@gmail.com

مقدمه

فنوباربیتال دارویی از گروه باربیتورات محسوب می‌گردد که خاصیت ضد تشنجی و تسکین‌دهندگی آن سال‌هاست در بیماران مبتلا به صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). بررسی‌ها نشان داده است که فنوباربیتال یک القاکننده سیتوکروم P450 (CYP) 3A است (۲). صرع یک اختلال عصبی مزمن است که تقریباً در هر دو جنسیت به یک میزان مشاهده می‌گردد (۳،۴).

این بیماری سیستم عصبی حاصل افزایش غیرطبیعی در هیپر سینکرونیزاسیون (Hypersynchronization) نورون‌های مغزی است (۵). استفاده از داروها در دوران بارداری یکی از چالش‌های مهم در این دوران محسوب می‌گردد. این موضوع در بیمارانی که درگیر بیماری‌های مزمن و طولانی مدت هستند بیشتر مورد توجه پزشکان قرار دارد. به دلیل عود و شدت بیماری‌های زمینه‌ای، بسیاری از زنان نباید مصرف داروها را قطع کنند (۶).

امروزه مدیریت این بیماری عمدتاً بر اساس داروهای ضد صرع (AEDs) بوده؛ لذا تعداد کل کودکانی که در معرض درمان توسط داروهای صرع قرار گرفته‌اند به طور قابل توجهی زیاد است (۷). مشکل زمانی جدی‌تر می‌شود که آگاهی داشته باشیم داروهای ضد صرع این پتانسیل را دارند که بر رشد جنین در طول بارداری تأثیر بگذارند. البته بررسی‌ها نشان داده است که اکثر کودکان متولد شده از زنان مبتلا به صرع طبیعی هستند، اما امکان ایجاد ناهنجاری در کودکان وجود دارد (۷). از طرفی این موضوع را هم نمی‌توان نادیده گرفت که رخداد صرع در مادران باردار می‌تواند اثرات منفی بر مادر و جنین به جای بگذارد، بنابراین با توجه به این موضوع فنوباربیتال توسط اداره کل نظارت مواد غذایی و دارویی آمریکا (FDA) در گروه D داروهای استفاده شده در دوران حاملگی قرار داده شده است.

این موضوع بیانگر این واقعیت است که در موارد خاص و ضروری، می‌توان از داروی فنوباربیتال در دوران بارداری

جهت درمان بیماران مبتلا به صرع استفاده نمود. البته در سال‌های گذشته گزارشی از تولد نوزادانی دارای ناهنجاری به دلیل استفاده مادر از این دارو در دوران بارداری در جهان وجود دارد. از میان گروه‌های دارویی، داروهای ضد تشنج مانند فنوباربیتال شایع‌ترین عامل عوارض ناخواسته دارویی در دوران بارداری و پس از آن بودند (۸،۹).

عوارض ناخواسته‌ی داروی فنوباربیتال، در کودکان نسبت به بالغین باعث بستری شدن بیشتر در بیمارستان می‌شود. با توجه به میزان بالای عوارض ناخواسته داروی فنوباربیتال، لزوم توجه بیشتر در تجویز این دارو و پیگیری و تحقیقات بیشتر در دوز مصرفی این دارو اهمیت خاصی پیدا می‌کند. بنابراین با در نظر گرفتن تمامی این ابعاد بررسی حاضر به ارزیابی اثرات ناهنجاری‌زایی این دارو بر روی جنین‌های موش‌های ماده بالغ باردار BALB/c و مقایسه اثرات ناشی از آن در سطوح بالاتر بطور مثال انسان انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر تعداد ۶۰ سر موش ماده بالغ BALB/c با وزن تقریبی ۲۴ تا ۲۶ گرم از موسسه سرم‌سازی رازی (البرز-ایران) خریداری شدند. موش‌ها جهت تطابق با محیط جدید به مدت یک هفته در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۶ درجه و رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد با غذای استاندارد جوندگان آزمایشگاهی تغذیه شدند. به منظور تعیین نمودن روزهای مشخص بارداری، موش‌های نر و ماده بالغ ۲/۵ تا ۳ ماهه با وزن ۲۴ تا ۲۸ گرم برای آمیزش به روش پلی گامی در قفس‌های ویژه موش صوری قرار داده شدند و با مشاهده درپوش واژنی (Vaginal plug)، موش‌های ماده از موش‌های نر جدا شدند و در قفس‌های جداگانه‌ای نگهداری شدند.

تعیین مقدار LD50

با استفاده از روش انتگرالسیون دوبل، مقدار LD50 محاسبه گردید و مقدار آن ۳/۸۴ تعیین شد؛ بطوریکه ۶ سطح دوز مصرفی را بر اساس کاهش ضریب ثابت هندسی

وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی تشریح شدند و جنین‌های داخل رحم خارج و در محلول سرم فیزیولوژی شست و شو و پس از اندازه‌گیری طول فرق سر-نشیمنگاهی (CR) و وزن جنین و جفت‌ها و بررسی‌های ابتدایی مورفولوژیکی جنین‌ها و جفت‌ها به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد به منظور تثبیت نگهداری شدند. در ادامه به منظور برش‌گیری و رنگ آمیزی نمونه به آزمایشگاه پاتوبیولوژی ایرانمهر (تهران-ایران) منتقل گردیدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ صورت پذیرفت و برای ارزیابی آماری در پژوهش حاضر آنالیز واریانس و آزمون‌های تعقیبی توکی و دانکن استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج مطالعات انجام گرفته بر رحم‌های متورم

بررسی نتایج بدست آمده، مشخص نمود که موش‌هایی که روز ۳ بارداری تزریق فنوباربیتال داشتند (۶۰ درصد)، نسبت به روزهای دیگر، روز ۴ بارداری (۶۰ درصد)، روز ۵ بارداری (۵۰ درصد) و روز ۶ بارداری (۳۰ درصد) با التهاب بیشتر رحمی مشاهده شدند و تأثیرات دارو بر روی تغییرات رحمی مشهودتر بود (جدول ۱)، و در نتیجه می‌توان بیان نمود نمونه‌هایی که روز سوم بارداری تزریق فنوباربیتال را تجربه نمودند نسبت به گروه کنترل سطح معناداری را نشان دادند ($P < 0.001$).

۱/۴۳ با انتخاب مقدار اولیه ۱/۲۰ ml/kg.bw مشخص نموده و تجربیات را بر ۲ گروه کنترل و شاهد (Sham) با انتخاب ۴ موش ماده در هر گروه انجام شد. تجربیات LD50 بر ۴۸ موش ماده بالغ ۲۴ تا ۲۶ گرمی انجام گرفت. بطوریکه به گروه تجربی یکی از سطوح دارو و به گروه کنترل آب مقطر استریل به طریق درون صفاقی تزریق گردید.

تزریق داروی فنوباربیتال در دوره‌های زمانی مختلف

در این سری از تجربیات موش‌ها به ۶ گروه دسته‌بندی شدند، گروه ۱ (کنترل) شامل ۱۰ سر موش می‌باشد که در طی آزمایش هیچگونه حلال یا دارویی دریافت نکردند. گروه ۲ (Sham) شامل ۱۰ سر موش بود که در روزهای ۳، ۴، ۵ و ۶ بارداری آب مقطر دریافت نمودند. گروه ۳ (گروه تجربی ۱) شامل ۱۰ سر موش بود که در روز ۳ بارداری به میزان ۰/۰۲ mg/kg.bw بصورت IP فنوباربیتال دریافت کردند. گروه ۴ (گروه تجربی ۲) شامل ۱۰ سر موش بود که در روز ۴ بارداری به میزان ۰/۰۲ mg/kg.bw فنوباربیتال دریافت کردند. گروه ۵ (گروه تجربی ۳) شامل ۱۰ سر موش بود که در روز ۵ بارداری به میزان ۰/۰۲ mg/kg.bw فنوباربیتال دریافت کردند و گروه ۶ (گروه تجربی ۴) شامل ۱۰ سر موش بود که در روز ۶ بارداری به میزان ۰/۰۲ mg/kg.bw فنوباربیتال دریافت نمودند. تزریق در تمامی گروه‌ها بصورت درون صفاقی انجام گردید. پس از تزریق در روزهای سوم تا ششم بارداری، تمامی موش‌ها در روز پانزدهم بارداری مطابق با راهنمای اخلاقی پژوهش بر حیوانات، شورای سیاستگذاری

جدول ۱. مقایسه تأثیرات دارو در روزهای ۳، ۴، ۵ و ۶ بارداری بر روی رحم و میزان باروری نمونه‌ها

ردیف	روز	تعداد موش	تعداد بارداری	درصد	تعداد ناباروری	درصد
۱	موش‌های کنترل	۱۰	۱۰	۱۰۰	-	-
۲	موش‌های شاهد (Sham)	۱۰	۱۰	۱۰۰	-	-
۳	روز ۳ بارداری	۱۰	۴	۴۰	۶	۶۰
۴	روز ۴ بارداری	۱۰	۴	۴۰	۶	۶۰
۵	روز ۵ بارداری	۱۰	۵	۵۰	۵	۵۰
۶	روز ۶ بارداری	۱۰	۷	۷۰	۳	۳۰

بررسی قرار گرفت و نتایج مشخص نمود که کاهش در اندازه‌ی فرق سر-نشیمنگاهی (CR)، وزن

در مجموع اثر داروی فنوباربیتال بر روی موش ماده بالغ باردار پس از تزریق دارو و تشریح مورد

جنین و جفت در گروه تجربی در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد (Sham) وجود داشت. بررسی نتایج مشخص نمود که کاهش معنی‌داری در وزن جفت و جنین در مقایسه با گروه کنترل و شاهد (Sham) وجود داشت ($P < 0.001$). همچنین کاهش معنی‌داری در اندازه قطر جفت در مقایسه با گروه کنترل و شاهد (Sham) گزارش شد ($P < 0.001$). علاوه بر این کاهش معنی‌داری در اندازه فرق سر-نشیمناگی (CR) جنین گروه تجربی با گروه کنترل و شاهد (Sham) وجود داشت ($P < 0.001$). نتایج تحلیل آماری و تجربیات روز سوم تا ششم (انحراف معیار $\pm$ میانگین) با دوز تزریقی 3/84 ml/kg.bw در جداول 2 تا 5 ارائه گردیده است. حروف یکسان برای هر متغیر در این جداول نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار و حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.

جدول 2. نتایج تحلیل آماری تجربیات روز سوم (انحراف معیار $\pm$ میانگین)

گروه	وزن جنین (گرم)	وزن جفت (گرم)	اندازه CR (میلی‌متر)	قطر جفت (میلی‌متر)
کنترل	0.665 $\pm$ 0.050 ^a	0.187 $\pm$ 0.014 ^a	16/436 $\pm$ 1/086 ^a	9/030 $\pm$ 0/601 ^a
شاهد (Sham)	0.661 $\pm$ 0.038 ^a	0.185 $\pm$ 0.014 ^a	15/826 $\pm$ 1/388 ^a	9/061 $\pm$ 0/474 ^a
تجربی	0.299 $\pm$ 0.077 ^{b**}	0.125 $\pm$ 0.025 ^{b**}	12/946 $\pm$ 0/984 ^{b**}	7/389 $\pm$ 0/639 ^{b**}
-مقدار P	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

**معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ جدول 3. نتایج تحلیل آماری تجربیات روز چهارم (انحراف معیار $\pm$ میانگین)

گروه	وزن جنین (گرم)	وزن جفت (گرم)	اندازه CR (میلی‌متر)	قطر جفت (میلی‌متر)
کنترل	0.631 $\pm$ 0.078 ^a	0.181 $\pm$ 0.016 ^a	15/955 $\pm$ 1/137 ^a	9/032 $\pm$ 0/615
شاهد (Sham)	0.620 $\pm$ 0.096 ^a	0.179 $\pm$ 0.015 ^a	15/828 $\pm$ 1/072 ^a	9/031 $\pm$ 0/587 ^a
تجربی	0.251 $\pm$ 0.080 ^{b**}	0.114 $\pm$ 0.008 ^{b**}	12/605 $\pm$ 0/547 ^{b**}	7/707 $\pm$ 0/563 ^{b**}
-مقدار P	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

**معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ جدول 4. نتایج تحلیل آماری تجربیات روز پنجم (انحراف معیار $\pm$ میانگین)

گروه	وزن جنین (گرم)	وزن جفت (گرم)	اندازه CR (میلی‌متر)	قطر جفت (میلی‌متر)
کنترل	0.515 $\pm$ 0.071 ^a	0.171 $\pm$ 0.013 ^a	14/996 $\pm$ 0/964 ^a	9/229 $\pm$ 0/653 ^a
شاهد (Sham)	0.501 $\pm$ 0.068 ^a	0.169 $\pm$ 0.011 ^a	14/882 $\pm$ 1/119 ^a	9/124 $\pm$ 0/695 ^a
تجربی	0.254 $\pm$ 0.025 ^{b**}	0.134 $\pm$ 0.019 ^{b**}	11/862 $\pm$ 0/560 ^{b**}	7/875 $\pm$ 0/500 ^{b**}
-مقدار P	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

**معنی‌داری در سطح $P < 0.001$

جدول ۵. نتایج تحلیل آماری تجربیات روز ششم (انحراف معیار $\pm$ میانگین)

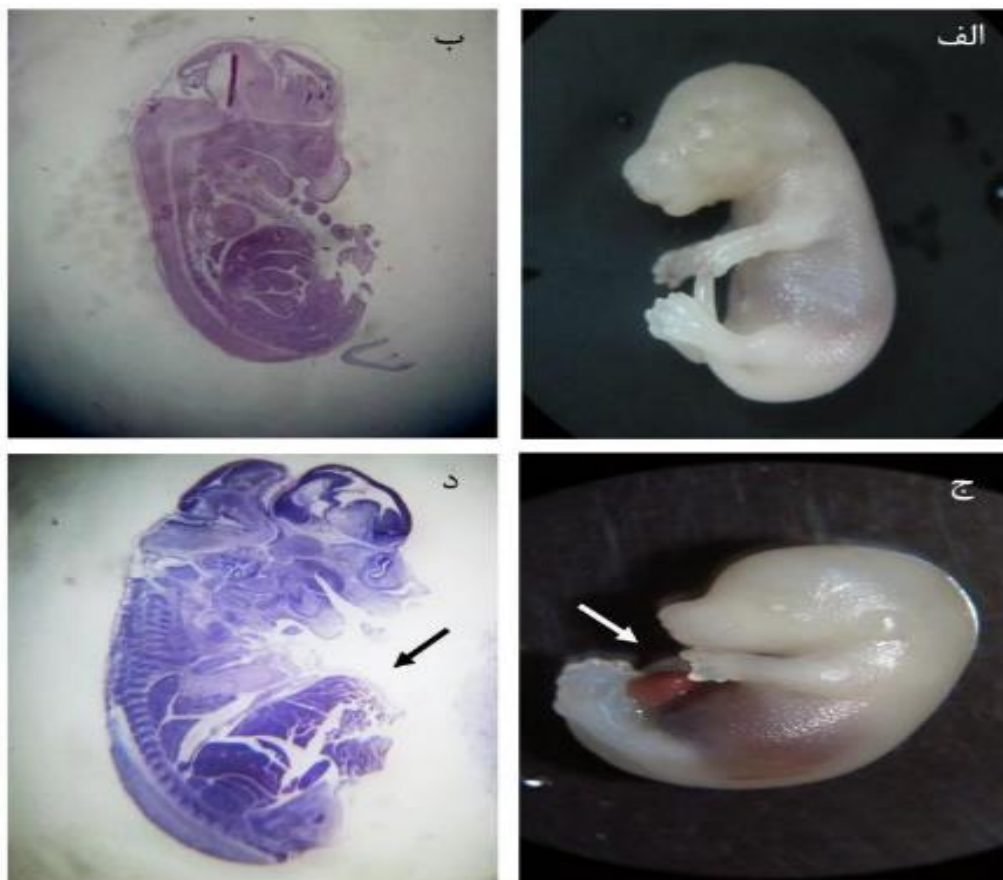
گروه	وزن جنین (گرم)	وزن جفت (گرم)	اندازه CR (میلی متر)	قطر جفت (میلی متر)
کنترل	0.618 ± 0.083^a	0.160 ± 0.013^a	15.092 ± 1.034^a	9.003 ± 0.700^a
شاهد (Sham)	0.614 ± 0.080^a	0.159 ± 0.014^a	15.092 ± 1.034^a	9.003 ± 0.700^a
تجربی	$0.428 \pm 0.092^{b**}$	$0.143 \pm 0.017^{b**}$	14.583 ± 1.767^a	$8.283 \pm 0.390^{b**}$
P-مقدار	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

**معنی داری در سطح $P < 0.05$ **معنی داری در سطح $P < 0.001$

نتایج حاصل از ارزیابی بافتی نمونه‌ها

مقایسه ی بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی در دو گروه: جنین کنترل و جنین با ناهنجاری اگزوهپاتیک (بیرون زدگی کبد) مشخص نمود که کبد بزرگ شده، دیواره شکم از ناحیه ی سینه تا انتهای

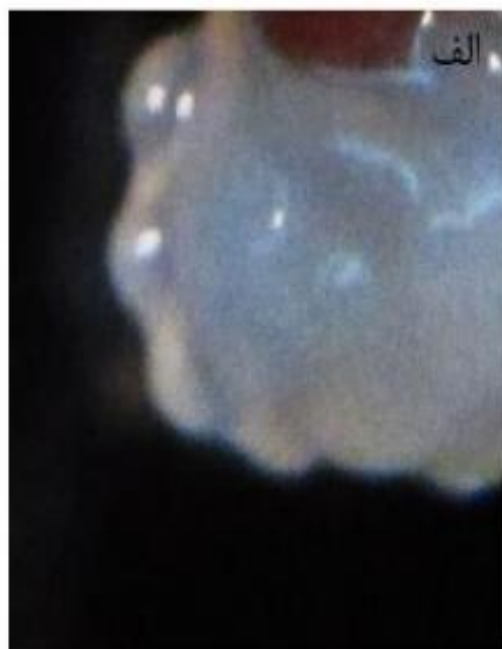
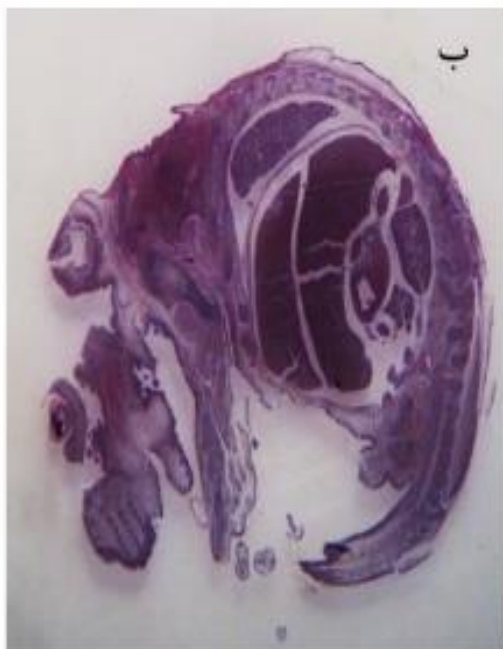
ناحیه ی شکم باز شده و کبد بیرون از بدن دیده می‌شود (شکل ۱). این ناهنجاری در هر ۴ روز بارداری با درصدهای متفاوت مشاهده شد، در روز ۳ بارداری (۲۰ درصد)، روز ۴ بارداری (۱۰ درصد)، روز ۵ بارداری (۱۵/۶۳ درصد) و روز ۶ بارداری (۱۱/۷۶ درصد) گزارش شد.



شکل ۱. استریوفتومیکروگراف از جنین کنترل (الف) و جنین با ناهنجاری اگزوهپاتیک در روز ۱۵ بارداری (ج) (بزرگنمایی $\times 40$). برش سهمی-میانی از جنین کنترل (ب) و جنین با ناهنجاری بیرون زدگی کبد (د) (بزرگنمایی $\times 40$). ضایعه توسط فلش در تصاویر مشخص گردیده است.

بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنومالی سین‌داکتیلی (چسبیدن انگشتان دست و پا) در دست‌ها در روزهای مختلف تزریق حاکی از این موضوع است که

آنومالی در روز ۳ بارداری (۶/۶۷ درصد)، روز ۴ بارداری (۶/۶۷ درصد)، روز ۵ بارداری (۶/۲۵ درصد) و روز ۶ بارداری (۸/۸۲ درصد) می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲. استریو فتومیکروگراف (الف) و برش سهمی-میانی (ب) از گروه تجربی با ناهنجاری سین‌داکتیلی در روز ۱۵ بارداری (بزرگنمایی $\times 40$)

در بررسی‌های ماکروسکوپی بدن جنین‌های مورد مطالعه (از جمله سر، صورت، گوش، ناحیه کمری و...) خونریزی‌هایی در زیر پوست مشاهده شد (گاهاً این خونریزی‌ها در ناحیه پا و دم وجود داشت) همچنین در

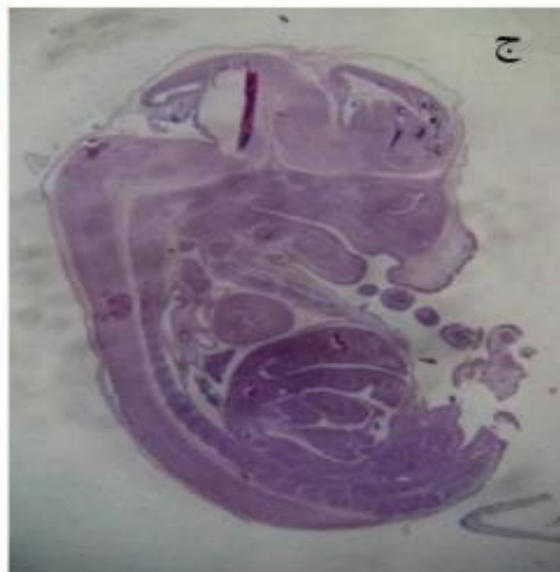
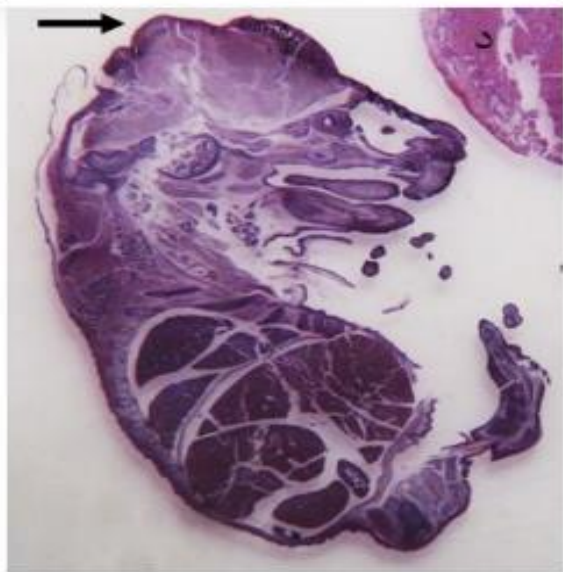
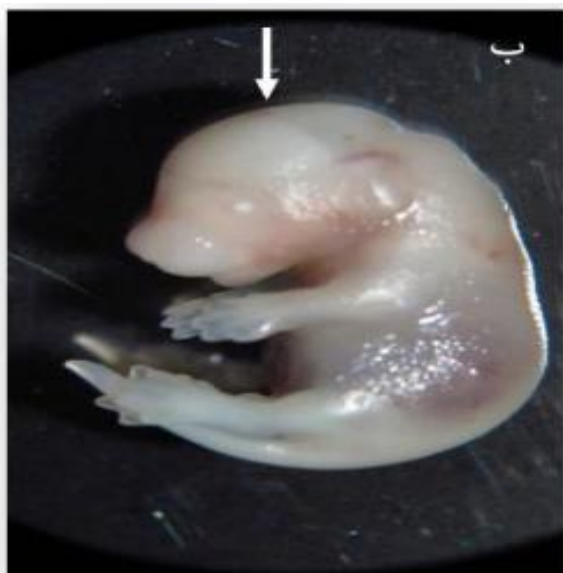
روزهای مختلف با درصدهای متفاوت دیده شد به طوریکه در روز ۳ بارداری (۱۰ درصد)، روز ۴ بارداری (۱۰ درصد)، روز ۵ بارداری (۹/۳۸ درصد) و روز ۶ بارداری (۷۱/۱۴ درصد) بود (شکل ۳).



شکل ۳. استریو فتومیکروگراف از جنین کنترل (الف) و جنین با خونریزی در روز ۱۵ بارداری (ج) (بزرگنمایی $\times 40$).

مختلف بارداری با درصدهای متفاوت مشاهده شد: در روز ۴ بارداری (۱۰ درصد)، در روز ۵ بارداری (۱۲/۵ درصد)، این ناهنجاری در روز ۶ بارداری (۱۱/۷۶ درصد) و در روز ۳ بارداری این ناهنجاری مشاهده نگردید (شکل ۴).

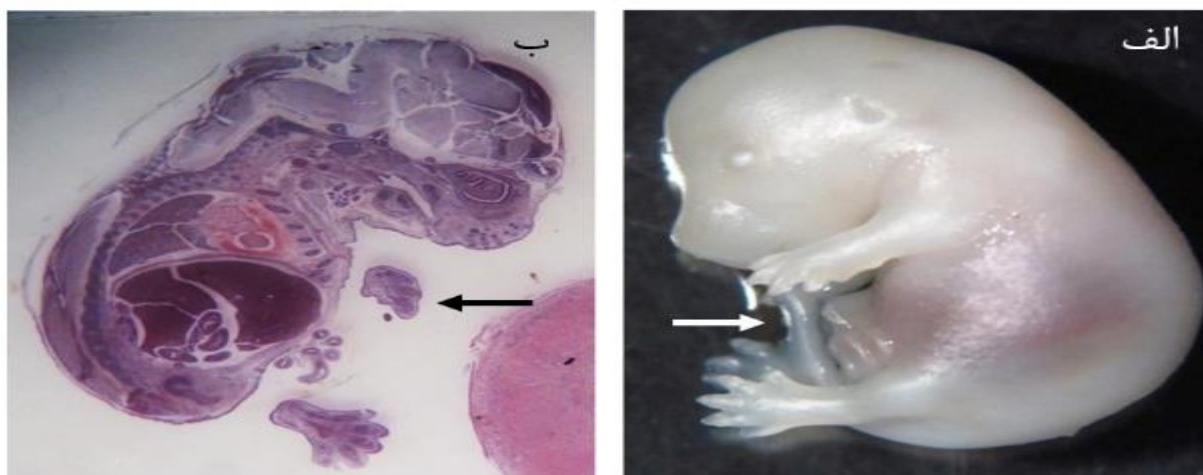
بررسی ناهنجاری اگزانسفال (بیرون زدگی بخش‌های مختلف مغز) جنینی به کمک استریوفتومیکروگراف انجام شد بیرون زدگی مغز در ناحیه رومبنسفال (مغز عقبی) مشاهده شد. مقاطع میکروسکوپی از جنین اگزانسفال برای بررسی‌های دقیق تر تهیه شد که این ناهنجاری در روزهای



شکل ۴. استریوفتومیکروگراف از جنین کنترل (الف) و جنین با ناهنجاری اگزانسفال در روز ۱۵ بارداری (ب) (بزرگنمایی $\times 40$). برش سهمی - میانی جنین کنترل (ج) و جنین دارای ناهنجاری اگزانسفال (د) (بزرگنمایی $\times 40$). ضایعه توسط فلش در تصاویر مشخص گردیده است.

روز ۵ بارداری (۱۸/۷۵ درصد) و در روز ۶ بارداری (۱۱/۷۶ درصد) (شکل ۵).

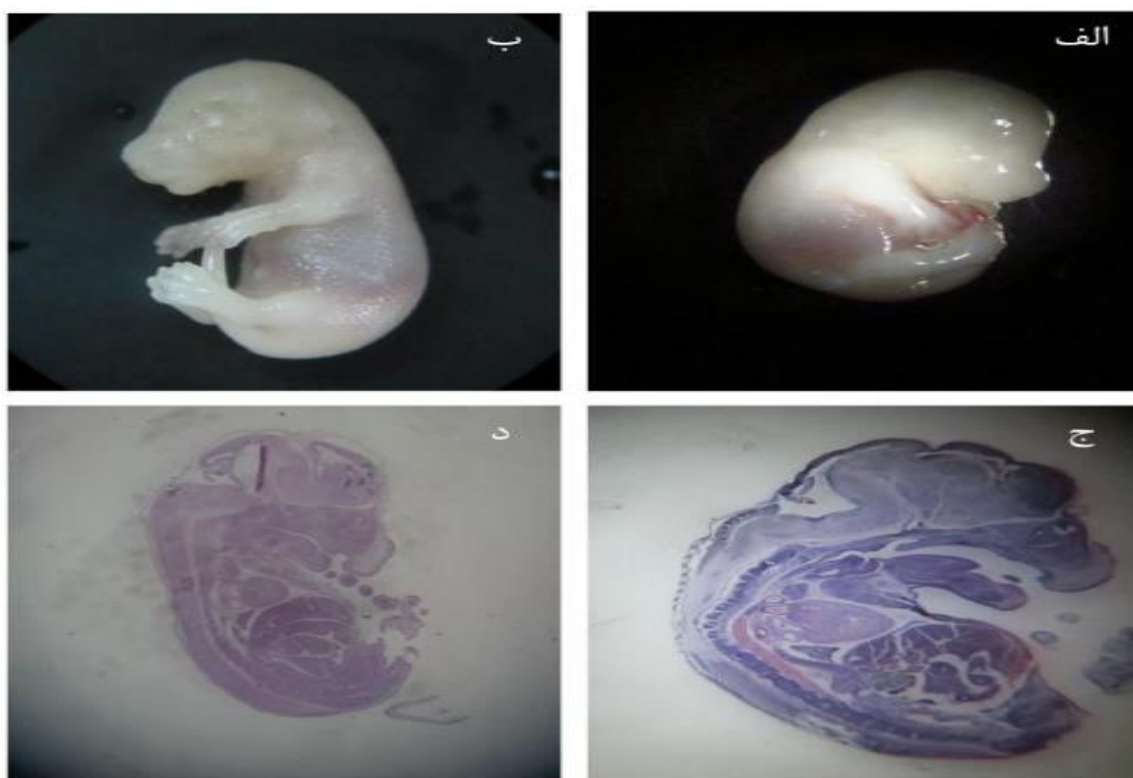
در بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی انجام شده بر روی جنین‌ها فتق نافی مشاهده گردید به طوریکه در روزهای مختلف درصدهای متفاوت مشاهده گردید. روز ۳ بارداری (۱۰ درصد)، روز ۴ بارداری (۶/۶۷ درصد)،



شکل ۵. استریوفتومیکروگراف از جنین گروه تجربی با ناهنجاری فتق نافی در روز ۱۵ بارداری (الف) (بزرگنمایی $\times 40$). برش سهمی-میانی جنین دارای ناهنجاری فتق نافی (ب) (بزرگنمایی $\times 40$). ضایعه توسط فلش در تصاویر مشخص گردیده است.

دیده شد در روز ۳ بارداری این ناهنجاری (۱۳/۳۳ درصد) و در روز ۴ بارداری (۱۶/۶۷ درصد)، روز ۵ بارداری (۹/۳۸ درصد)، روز ۶ بارداری (۱۴/۷۱ درصد) مشاهده شد (شکل ۶).

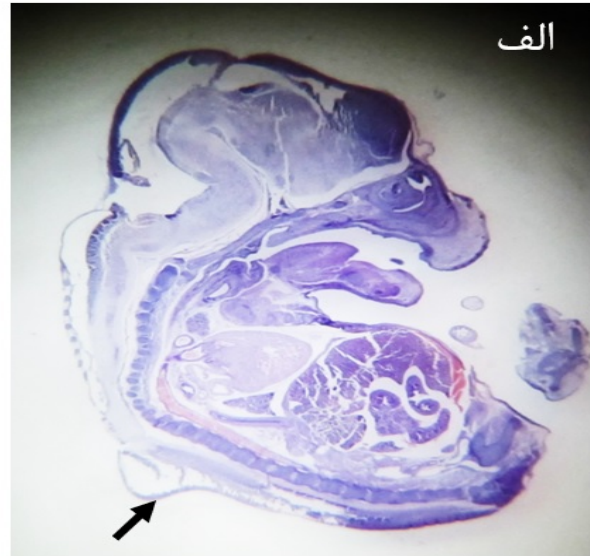
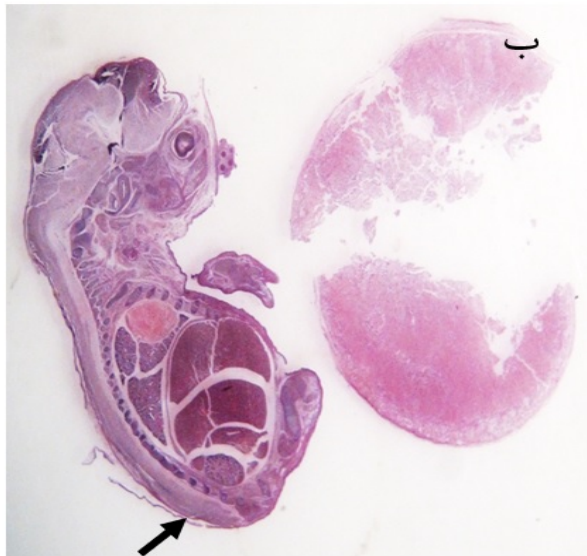
در بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی تعدادی از جنین‌های دریافت کننده داروی فنوباربیتال، دارای بدن C شکل بودند به طوریکه در روزهای مختلف درصد‌های متفاوت



شکل ۶. استریوفتومیکروگراف از جنین گروه تجربی با ناهنجاری بدن C در روز ۱۵ بارداری (الف)، استریوفتومیکروگراف از جنین کنترل (ب) (بزرگنمایی $\times 40$). برش سهمی-میانی جنین ناهنجاری بدن C در روز ۱۵ بارداری (ج)، برش سهمی-میانی جنین از جنین کنترل در روز ۱۵ بارداری (د) (بزرگنمایی $\times 40$).

۳ بارداری این ناهنجاری (۱۰ درصد)، روز ۵ بارداری (۶/۲۵ درصد)، روز ۶ بارداری (۵/۸۸ درصد) مشاهده شد و در روز ۴ بارداری این ناهنجاری مشاهده نشد (شکل ۷).

در بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی تعدادی از جنین‌های گروه دریافت کننده داروی فنوباربیتال، دارای اسپینابیفیدا (بیرون زدگی نخاع) بودند به طوریکه در روز



شکل ۷. برش سهمی-میانی از جنین با ناهنجاری اسپینابیفیدا (الف، ب). (بزرگنمایی ۴۰×). ضایعه توسط فلش در تصاویر مشخص گردیده است.

بررسی دیگری که توسط Rengasamy و همکاران انجام شد نشان داده شد که داروهای فنوباربیتال می‌تواند بیان ژنی را در جنین موش تغییر دهد به طوری که تکامل طبیعی جنین را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۱). نتایج بررسی حاضر هم تایید این موضوع است که فنوباربیتال با اثر گذاری بر بیان ژن‌های دخیل در فرآیند تکامل در دوران جنینی موجب بر هم خوردن بیان ژن و پروتئین و موجب ناهنجاری‌های تکاملی در جنین موش‌ها می‌شود. در بررسی‌هایی که Hanson بر روی مصرف داروهای ضد صرع و اثراتشان بر روی جنین‌ها انجام داد، بیان داشت که داروهای ضد صرع ناهنجاری‌هایی نظیر شکاف لب (Cleft lip)، عقب ماندگی ذهنی و رشدی ایجاد می‌کند (۱۲). در بررسی انجام شده توسط Holmes و همکاران بر روی ۲۲۳ نوزاد که در معرض داروی فنوباربیتال، فنی توئین و کاربامازپین قرار داشتند، مشخص شد هر سه دارو موجب یک سری از ناهنجاری‌های رشدی مانند کاهش رشد جسمی، و تاخیر در فرآیند تکامل می‌گردد (۱۳).

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد مصرف فنوباربیتال در دوران بارداری موش سبب القاء ناهنجاری‌هایی فراوانی از جمله: اگزوهپاتیک، سین داکتیلی، خونریزی در بافت جنینی، ناهنجاری اگزانسفال، ناهنجاری فتق نافی، ناهنجاری بدن C شکل و اسپینابیفیدا در دوران جنینی می‌گردد. در بررسی انجام شده توسط افشار و همکاران مشخص شد، تزریق داروی فنوباربیتال در دوران بارداری بر روی سیستم عصبی مرکزی و اسکلتی موش تاثیر می‌گذارد، نتایج این بررسی ناهنجاری‌های دیگری در سیستم اسکلتی جنین‌ها نشان داد. علاوه بر این عدم چرخش مناسب، کوتاهی اندام و در موارد شدیدتر اگزانسفالی و اسپینابیفیدا در جنین‌ها مشاهده شد (۱۰). نتایج حاصل از تحقیق حاضر هم با بررسی صورت گرفته توسط این گروه تحقیقاتی همسو است و تغییرات قابل توجهی در رشد اولیه جنین نشان داده شد، همچنین داروی فنوباربیتال باعث ایجاد تاخیر در رشد و ایجاد نقص خمیدگی انحناء شد (شکل ۵ و ۶). در

در ادامه پیشنهاد می‌گردد می‌توان اثر فنوباربیتال را بر روی فرآیندهای اسپرماتوژنز و اووژنز و همچنین تاثیر آن بر هورمون‌های جنسی موش نژاد BALB/c مورد ارزیابی قرار داد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند در پژوهش حاضر هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

حمایت مالی

نویسندگان در پژوهش حاضر از هیچ حمایت مالی استفاده نکرده‌اند.

مشارکت نویسندگان

طراحی مطالعه و ایده اولیه: پروین تراب زاده، منیره موحدی، منیره منفردی، جمع آوری داده‌های پژوهش: منیره منفردی، نگارش دستنویس اولیه مقاله: محسن قیاسی، تأیید نسخه نهایی مقاله: پروین تراب، منیره منفردی، محسن قیاسی، منیره موحدی.

ملاحظات اخلاقی

کلیه مراحل پژوهش حیوانی مطابق راهنمای اخلاقی پژوهش بر حیوانات، شورای سیاستگذاری وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی انجام گردید.

نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی نیز ریسک استفاده از داروی فنوباربیتال در دوران بارداری را بیان می‌نماید. با توجه به اثرات احتمالی فنوباربیتال در دوران نوزادی توجه پزشکان نسبت به تاثیر فنوباربیتال بر روی اثرات تکاملی این دارو بیشتر شده است. به عنوان مثال در بررسی که در سال ۲۰۲۲ انجام شده است نشان داده شده که گاناکسولون (Ganaxolone) گزینه ای بهتر جهت کنترل تشنج نسبت به فنوباربیتال در نوزاد است (۱۴). نهایتاً می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً فنوباربیتال به واسطه دخالت در مکانیسم سلولی و مولکولی تقسیم و تمایز سلولی و کاهش عملکرد بعضی از آنزیم‌ها و هورمون‌ها می‌تواند بر رشد کمی جنین‌ها و تمایز بعضی از سلول‌ها در دوران تکامل تاثیر منفی داشته باشد. این احتمال نیز وجود دارد که فنوباربیتال در دوز بالا در عدم باروری نقش دارد و با تاثیر بر روی رحم مستقیماً بر روی تکامل جنین موش در مراحل اندام‌زایی اثرگذار می‌باشد. احتمال دیگری نیز وجود دارد و آن این است که فنوباربیتال موجب بر هم زدن تعادل هورمونی شده و در دوران بارداری موجب ایجاد ناهنجاری در جنین می‌شود. در پایان می‌توان عنوان نمود اگرچه داروی فنوباربیتال به عنوان یک کنترل‌کننده تب در نوزادان و تاثیر فوق‌العاده‌ی آن در کاهش حملات صرعی محسوب می‌شود، اما با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق باعث ایجاد ناهنجاری جنینی در دوران بارداری می‌گردد، لذا باید از مصرف دوز بالای این دارو در روزهای ابتدایی بارداری به عنوان کنترل‌کننده حملات صرعی پرهیز کرد.

References

- Hill RM. Teratogenesis and antiepileptic drugs. Mass Medical Soc; 1973. p. 1089-90.
- Favié L, Groenendaal F, Van Den Broek MP, Rademaker C, De Haan TR, Van Straaten HL, et al. Phenobarbital, midazolam pharmacokinetics, effectiveness, and drug-drug interaction in asphyxiated neonates undergoing therapeutic hypothermia. *Neonatology*. 2019;116(2):154-62.
- LaRoche SM. A new look at the second-generation antiepileptic drugs: a decade of experience. *The neurologist*. 2007;13(3):133-9.
- O'Brien M, Gilmour-White S. Management of epilepsy in women. *Postgraduate medical journal*. 2005;81(955):278-85.
- Güler NF, Übeyli ED, Güler I. Recurrent neural networks employing Lyapunov exponents for EEG signals classification. *Expert systems with applications*. 2005;29. 14-506:(3)
- Barrett C, Richens A. Epilepsy and pregnancy: report of an Epilepsy Research Foundation Workshop. *Epilepsy research*. 2003;52(3):147-87.
- Meador KJ. Effects of in utero antiepileptic drug exposure. *Epilepsy currents*. 2008;8(6):143-7.
- Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
- Rafla NM, Meehan FP. Thanatophoric dwarfism; drugs and antenatal diagnosis; a case report. *European Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1991;38(2):161-5.
- Afshar M, Kalali H. Effect of Phenobarbital on Neural Tube and Skeletal Development in Rats During Pregnancy. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2005;13(52):8-15.
- Rengasamy P, Padmanabhan RR. Experimental studies on cervical and lumbar ribs in mouse embryos. *Congenital anomalies*. 2004;44(3):156-71.
- Hanson JW, Smith DW. The fetal hydantoin syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1975;87(2):285-90.
- Holmes LB, Harvey EA, Coull BA, Huntington KB, Khoshbin S, Hayes AM, Ryan LM. The teratogenicity of anticonvulsant drugs. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(15):1132-8.
- Miller SL, Bennet L, Sutherland AE, Pham Y, McDonald C, Castillo-Melendez M, et al. Ganaxolone versus phenobarbital for neonatal seizure management. *Annals of neurology*. 2022;92(6):1066-79.

Evaluation of the malformation effects of phenobarbital on BALB/c mouse embryos on the third to sixth days of pregnancy

Monfaredi M¹, Ghiasi M², Movahedi M³, Torabzadeh P^{4*}

1. PhD in Animal-Cellular and Developmental Biology, Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. PhD in Cellular and Molecular Biology, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4. Assistant Professor, Department of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, p.torabzadeh@gmail.com

Received: 2024/4/2

Accepted: 2024/6/29

Abstract

Background: Phenobarbital is a sedative drug that belongs to the barbiturate class. Barbiturates work by reducing the excitability of neurons. The present study aimed to evaluate the effects of phenobarbital on the embryos of adult female BALB/c mice.

Materials and Methods: In this study, 60 adult female BALB/c mice weighing approximately 24 to 26 g were classified into six groups: control, sham, and treatment groups. Phenobarbital ampoules were used for the study, and the lethal dose (LD50) in vivo was calculated to be 3.84 ml/kg.bw. Intraperitoneal injections were administered on days 3, 4, 5, and 6 of pregnancy. On day 7 of pregnancy (following the last injection), the mice were euthanized, weighed, and dissected. Their uterus and ovaries were rinsed with sterile physiological serum and evaluated both microscopically and macroscopically. The results obtained were analyzed using SPSS software and subjected to an ANOVA test.

Results: Based on the results of the study, phenobarbital caused syndactyly (gluing of fingers and toes), exohepatic, exencephaly, spinabifida, lack of motor organ formation, asymmetry in motor organ orientation, liver enlargement, weight loss, CR size reduction, subcutaneous hemorrhages, C-shaped body, and umbilical hernia. Additionally, a significant decrease ($P < 0.05$) was reported in fetal weight, placental weight, placental diameter, and CR.

Conclusion: The current study indicated that phenobarbital likely has a negative impact on embryos during the embryonic development stage, leading to miscarriage, abnormalities, and infertility. Therefore, serious precautions should be taken to avoid the use of this drug during pregnancy.

Keywords: Experimental study, Fetal defects, Phenobarbital.

***Citation:** Monfaredi M, Ghiasi M, Movahedi M, Torabzadeh P. Evaluation of the malformation effects of phenobarbital on BALB/c mouse embryos on the third to sixth days of pregnancy. *Yafte*. 2024; 26(3):1-12.