بررسی اثر ناهنجاری‌زائی دی سدیم همی فتالات گلیسیریتینیک اسید (Disodium Hemiphthalate Glycyrrhetinic Acid) روی سیستم اسکلتی جنین موش

دکتر حسن مرزبان Ph.D، استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر بتول نصراله زاده، Ph.D استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محمد اکبری Ph.D، استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
مهنوش توبک، M.S، مربی گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر احمدرضا دهپور، Ph.D استاد گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر علیرضا فاضل، Ph.D دانشیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر ناصر سلسبیلی، Ph.D استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر هوشنگ رفیق‌دوست، Ph.D استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

A Study of Anomaly Producing Effects of Disodium Hemiphtalate Glycyrrhetinic Acid on Skleton of Mice Embryo

ABSTRACT

Disodium hemiphthalate Glycyrrhetinic acid (DHGA) possesses anti-inflammatory and analgestic activities. In our research, this agent was injected intraperitoneally to mice, according to the following schedule.

1) 25 mg/kg, 50mg/kg & 75mg/kg at 7th day of pregnancy.

2) 50 mg/kg & 75mg/kg at 8th day of pregnancy.

3) 50mg/kg & 75mg/kg at 9th day of pregnancy.

DHGA with doses of 50mg/kg and 75mg/kg at 7th, 8th and 9th day, delays the growth, decreases developing of ossification centers (specially in hand and foot middle phalanxes), decreases the number of caudal vertebrae of sacro-illiac joint and results in slight but important increases in fetus mortality.

Abbreviations

H & E=Haematoxylin & Eosin

CRL=Crown-Rump Length

BPD=Biparietal Diameter

W=Weight

ETS=Embryo Toxicity Score

چکیده

دی سدیم همی فتالات گلیسیریتینیک اسید (DHGA) دارای اثرات ضدالتهابی و ضددرد است.

در مطالعه حاضر مقادیر ۲۵mg/kg، ۵۰mg/kg و ۷۵mg/kg به منظور ارزیابی اثرات ناهنجاری‌زائی بر روی جنین در روزهای هفتم، هشتم و نهم بارداری به صورت داخل صفاقی (IP) به موشهای سوری تزریق شد.

DHGA سبب تأخیر رشد با دوزهای ۵۰mg/kg و ۷۵mg/kg در روزهای هفتم، هشتم و نهم شده است و کاهش گسترش مراکز استخوان‌سازی مخصوصاً بند (فلانکس) میانی دست و پا را نشان داده است و همچنین تعداد مهره‌های دمی از مفصل ساکروایلیاک کاهش یافته است. افزایش خفیف اما بااهمیت در مرگ و میر رویانی و جنینهای بازجذبی وجود داشت. این نتایج نشان دهندهٔ تأخیر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]

رشد و امبریوتوکسیسیتی وابسته به دوز این دارو در موش می‌باشد.

مقدمه

گلیسیرین ماده مؤثر در ریشه گیاهی بنام شیرین بیان می‌باشد که بر اثر هیدرولیز آن گلیسیریتینیک اسید بدست می‌آید که در این واکنش دو مولکول گلیکورونیک اسید و آب حاصل می‌شود.

آب + اسیدگلیکورونیک + اسید گلیسیریتینیک ←هیدرولیز گلیسیریزین

گلیسیریتینیک در کلینیک بعنوان ضددرد و ضد التهاب (۳)، درمان آلرژی (۵)، درمان زخم معده (۲)، درمان هپاتیت (۹) و ضد سمیت کبدی (۷) استفاده می‌شود. تاکنون توانسته‌اند ۱۵ فرآورده از گلیسیریتینیک اسید تهیه کنند که یکی از آنها تحت عنوان دی‌سدیم همی فتالات گلیسیریتینیک اسید (DHGA) است (۴) و وزن ملکولی آن ۶۶۲ دالتون می‌باشد (۶). DHGA دارای اثر ضدالتهاب و ضد درد قوی‌تری نسبت به گلیسیریتینیک اسید می‌باشد (۳).

روش و مواد

حیوان: ۶۰ سر موش سوری واریته البینو از نژاد انماریا از انستیتو رازی حصارک خریداری شد. غذای آماده و استاندارد از شرکت دام پارس تهیه شد. درجه حرارت و رطوبت حیوانخانه بترتیب $^{\circ}c$ ۲۶-۲۲ و ۵۵٪-۴۵٪، سیکل روشنائی تاریکی ۱۲ ساعت و از قفسهای مجهز به آبخوری اتوماتیک استفاده شد.

مواد: دی سدیم همی فتالات گلیسیریتینیک اسید Disodium Hemiphthalate Glycyrrhetinic Acid از مرکز تحقیقات داروئی شرکت داروپخش تهیه شد.

موشها را جهت روزهای هفتم، هشتم و نهم بارداری تقسیم کرده و در هر روز از دوزهای مختلف بقسمی که در روز هفتم از دوزهای ۲۵mg/kg، ۵۰mg/kg و ۷۵mg/kg و در روزهای هشتم و نهم باروری از دوزهای ۵۰mg/kg و ۷۵mg/kg استفاده شد. دارو را بصورت داخل صفاقی تزریق کرده‌ایم. از آنجائی که داروی تهیه شده بصورت پودر بوده لذا می‌بایست در آب مقطر حل کنیم و برای رسیدن به حلالیت مطلوب و صددرصد مقدار کمی نیز NaOH اضافه کردیم، از اینرو در هر دوز تحت بررسی سه گروه در نظر گرفتیم. گروه کنترل که با حجم مناسب سرم فیزیولوژی تزریق شد گروه تزریقی با NaOH که با حجم مناسب NaOH تزریق شد و گروه تجربی که دارو تزریق شد. سپس موشهارا در روز ۱۸ بارداری Decerebrate کرده جنینها را از رحم خارج نموده‌ایم. تعداد ۲ جنین از هر موش را در داخل الکل ۹۶٪ جهت شفاف کردن (Clearing) و رنگ‌آمیزی با الیزارین رد S قرار داده‌ایم و به نسبت مساوی، باقی مانده جنینها را جهت تهیه مقاطع بافتی در محلول بوئن و در صورت نیاز جهت شفاف کردن (Clearing) و برش بافتی در داخل محلول بافر شده خنثی قرار داده‌ایم و بررسی در موارد زیر انجام گرفته است.

۱ـ جهت محاسبه امبریوتوکسیستی از فرمول

$$EST = \frac{\text{تعداد جنینهای مرده + تعداد جنین‌های بازجذبی}}{\text{تعداد کل جنینها}} \times ۱۰۰$$

استفاده شد.

۲ـ جهت بررسی مرفولوژی و مالفورماسیونهای خارجی تمام جنینها از استریومیکروسکوپ Nikon مدل 5MZ-2T استفاده شد.

۳ـ جهت بررسی سیستم اسکلتی از تکنیک شفاف کردن (Clearing) و رنگ‌آمیزی با الیزارین رد S استفاده شد که در آن تغییرات ساختمان سیستم اسکلتی، درجات استخوان‌سازی این سیستم براساس پارامترهای انتخاب شده (بعنوان مثال: دیافیز استخوانی شده در استخوان بازو، رادیوس، اولنا، فمور و...) و شمارش مراکز استخوان سازی در مهره‌های دمی، متاکارپ و غیره انجام گرفت.

۴ـ تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی H&E جهت بررسی و مقایسه مهره C_5 تا تمایز و رشد سلولها در استخوان‌سازی مشخص گردد.

۵ـ CRL، BPD و W را با استفاده از Student's t-test، Kruskal Wallis test و Bartlett's test تجزیه و تحلیل آماری نموده‌ایم.

نتایج

نسبت مرگ و میر و جنینهای بازجذبی براساس محاسبه امبریوتوکسیسیتی در گروه کنترل ۱/۳۵٪، گروه تزریقی با NaOH ۱/۳۵٪ و گروه تحت درمان با دارو ۶٪ بدست آمده است.

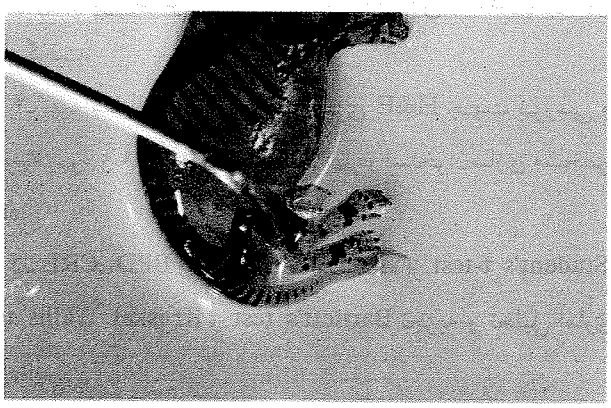
بررسی مرفولوژی و مالفورماسیونهای خارجی نشان داده است که ناهنجاری و اختلاف رشد بین گروهی که تحت درمان با دارو بوده‌اند و گروه تزریقی با NaOH و گروه کنترل در دوز ۲۵mg/kg وجود نداشت اما اختلاف رشد بین گروه کنترل و گروه تحت درمان با دارو در دوزهای ۵۰mg/kg و ۷۵mg/kg وجود داشت بطوری که جنینهای گروه تحت درمان با دارو در دوزهای ۵۰mg/kg و ۷۵mg/kg نسبت به گروه کنترل از جثه کوچکتری برخوردار بوده‌اند.

پارامترهای انتخاب شده جهت بررسی سیستم اسکلتی نشان داده است که در بعضی از پارامترها مثلاً تعداد دنده‌ها هیچ اختلافی

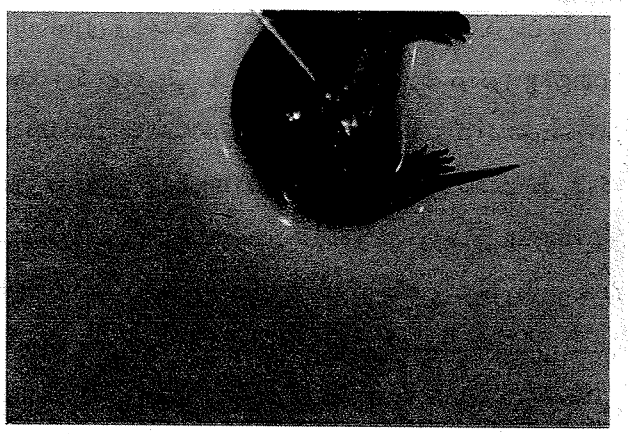
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]

بین گروه‌های مختلف وجود نداشت. اما مراکز استخوان‌سازی در گروه تحت درمان با دارو (تصویرهای ۲ و ۴) نسبت به گروه کنترل (تصویرهای ۱ و ۳) از رشد کمتری برخوردار بوده است و تعداد مهره‌های دمی از مفصل ساکروایلیاک، تعداد مراکز استخوان‌سازی در بند میانی دست، در تارس و بند میانی پا در گروه تحت درمان با دارو نسبت به گروه کنترل تأخیر رشد نشان داده است، بطوری که میانگین مهره‌های دمی از مفصل ساکروایلیاک در گروه تحت درمان با دارو ۱۰ عدد بوده در حالی که در گروه کنترل ۱۵ عدد می‌باشد و مراکز استخوان‌سازی در فالانکس میانی دست، تارس و فالانکس میانی پا در گروه تحت درمان با دارو ظاهر نشده ولی در گروه کنترل شکل گرفته است.

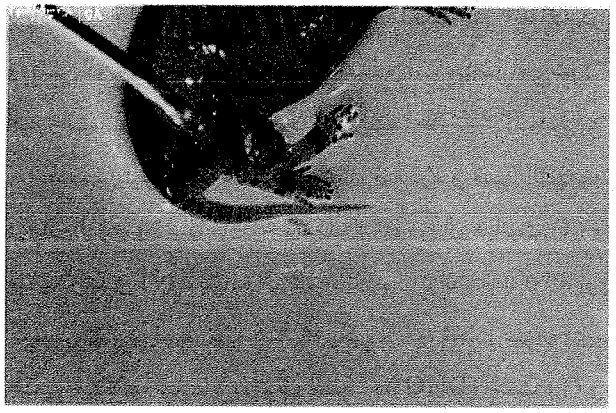
شکل ۱ـ گروه کنترل دوز: ۵۰mg/kg روز: ۷ رنگ‌آمیزی: الیزارین رد S
مراکز استخوان سازی در تارس، متاتارس، فالانکس و همچنین ناحیه دمی از رشد طبیعی برخوردار هستند.



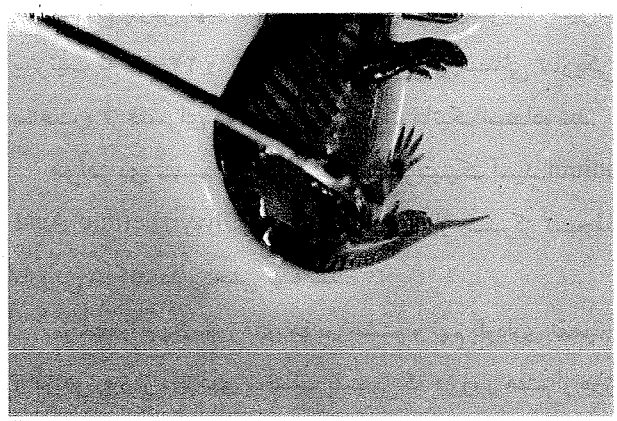
شکل ۲ـ گروه تحت درمان با دارو دوز: ۵۰mg/kg روز: ۷ رنگ‌آمیزی: الیزارین رد S
مراکز استخوان سازی در تارس و فلانکس میانی شکل نگرفته و در ناحیه دمی در مقایسه با گروه کنترل تعداد مراکز استخوان سازی مهره‌های دمی کمتر می‌باشد.



شکل ۳ـ گروه کنترل دوز: ۷۵mg/kg روز: ۷ رنگ‌آمیزی: الیزارین رد S
مراکز استخوان سازی در تارس و فالانکس میانی و رشد طبیعی در مراکز استخوان‌سازی و مهره‌های دمی نشان داده شد.



شکل ٤ـ گروه تحت درمان با دارو دوز: ۷۵mg/kg روز: ۷
رنگ‌آمیزی: الیزارین رد S
مراکز استخوان سازی در تارس و فالانکس میانی شکل نگرفته است و تعداد مراکز استخوان‌سازی در مهره‌های دمی نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد.



در بررسی مقاطع بافتی نشان داده شد که ناحیه غضروف کلسیفیه شده در گروه تحت درمان با دارو نسبت به گروه کنترل از گسترش کمتری برخوردار می‌باشد و سلولهای غضروفی در گروه کنترل در درجه ۴ و ۵ رشد بوده ولی در گروه تحت درمان با دارو در درجه ۳ و ۴ رشد قرار داشته‌اند.

داده‌های آماری نشان داده است که تفاوت میانگین CRL، BPD و W در گروه کنترل و گروه تزریقی با NaOH معنی‌دار نبوده است، در حالیکه تفاوت میانگین CRL، BPD و W در گروه تحت درمان با دارو و گروه کنترل و همچنین گروه تحت درمان با دارو و گروه تزریقی با NaOH در هر سه روز معنی‌دار بوده است ($P<0.005$).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]

بحث

دی سدیم همی فتالات گلیسیریتینیک اسید، مرگ و میر خفیف اما نسبتاً بااهمیتی در دوز ۷۵mg/kg به همراه داشت. تأخیر رشد جنین و رشد سیستم اسکلتی در دوزهای ۵۰mg/kg و ۷۵mg/kg در هر سه روز مشاهده شد. از گزارشات موجود در رابطه با این دارو چنین استنباط می‌شود که یکی از مشتقات گلیسیریتینیک اسید (کربنوکسلون) اثر تثبیت‌کننده‌ای روی غشاء سلول، غشاء لیزوزوم و غشاء رتیکولوم اندوپلاسمیک و همچنین فسفاتیدیل کولین و کلسترول دارد که باعث افزایش میزان فسفولیپید و کلسترول در غشاء می‌گردد (۱۰) و گزارش شده که بعضی از مشتقات گلیسیریتینیک اسید روی نفوذپذیری عروق و انتقال مواد از غشاء سلول اثر مهاری دارند (۵) و این نیز شناخته شده است که اثر تراتوژن روی جنین داشته یا با عبور از سد جفتی و ورود به جنین اثر اعمال می‌کند یا بدون عبور از سد جفتی و با ایجاد اختلال در انتقال مواد مغذی از جفت اثر می‌گذارد (۱۱). از اینرو DHGA قبل از ورود به جنین با سن‌سی‌تیوم تروفوبلاست تماس حاصل می‌نماید. لذا اولین مکان جهت تأثیرگذاری می‌باشد که باعث تثبیت غشاء سن‌سی‌تیوم تروفوبلاست و افزایش میزان فسفولیپید و کلسترول و مهار نفوذپذیری و انتقال مواد از غشاء گشته به این ترتیب انتقال مواد به جنین کاهش یافته و باعث تأخیر رشد می‌گردد. تأخیر رشد با تغییر در تمایز کندروسیتها نیز همراه می‌باشد که این تغییر در تمایز کندروسیتها ممکن است بدلیل اثر دارو روی رپلیکاسیون سلولهای رویانی و رشد کندروسیتها باشد (۸). در گزارش دیگری که بررسی Zinc deficiency بر روی سیستم اسکلتی بوده مشخص شد که تغییر ساختمانی و عملی در Growth plate استخوانهای جنین، باعث تأخیر رشد در استخوان‌سازی می‌شود (۱).

نتایج این بررسی نشان دهنده اثر واضح این دارو بر روی سیستم اسکلتی و رشد طبیعی جنین موش سوری می‌باشد.

منابع

1- Da-cunga-Ferreira-RM &Rodriguez.JI.Changes in the fetal tibial growth plate secondary to maternal zinc defficiency in the rat:A histological and histochemical study.Teratolgy. 1991. 44(4): 441-51

2- Doll R, Hill 1D, Hutton C and Underwood Dj. Clinical trial of a triterpenoid liquorice compound in gastric and duodenal ulcer. Lancet, 1962. 2:793-796

3- Finney RSH and Somers G.F. The anti-inflammatory activity of glycyrrhetinic acid and derivatives. J pharm. pharmacol.1985.10:613-620

4- Inoue H & Mori T.Pharmacological activities of glycyrrhetinic acid derivatives: analgesic and anti-type IV allergic effects. Chem. Pharm-Bull. 1987. 35(9): 3888-93

5- Inove-H, Mori-T, Shibata-S & Koshihara- Y. Inhibitory effect of glycyrrhetinic acid derivatives on arachidonic acid-induced mouse ear oedema. J.Pharm. Pharmacol. 1988. 40(4): 272-8

6- Khaksa, G., Zolfaghari, M.E., Dehpour, A.R. and Samadian, T.Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activitiy of Disodium Glycyrrhetinic Acid Hemiphthalate. Planta medica. 1995. 62:326-328

7- Kisoy, Tohkin M and Hikino H.Assay method for antihepatotox activity using ionophore A23187 induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. Shoyakugakuzasshi. 1985. 39: 218-222

8- Styrud-J, Eriksson UJ. In vitro effects of glucose and growth factors on limb bud and mandibular arch chondrocytes maintained at various serum concentrations. Teratology. 1991. 44(1): 65-75

9- Suzuki H. Ohta Y.takino T. Therapeutic effects of stronger Neo-minophagene on chronic hepatitis. Igaku no. Ayumi. 1977. 102: 562-578

10- Symens-Am & Parde-Dv. The effects of sodium carbenoxolone on the stability of cellular membranes. Scand. J. Gastroenterol. Suppl 1980; 65: 3-10

11- Zahn PV & Rheinholzi. The many faces of Research. Chemistry, pharmacy & Medicine. Ecom verlag, first edition. 1980: 276-286

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]