

سمیت جنینی رانیتیدین

دکتر بتول نصرالهزاده، استادیار گروه آناتومی و سریرست بخش جنین‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محمد عبدالهی، استادیار سم شناسی و داروشناسی، بخش سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مهران مجیر لیلانی، دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Embryotoxicitic effects of Ranitidine

ABSTRACT

In this work, we tried to know something more about the embryotoxicity effects of the doses of 50, 200, 400mg/kg/day of ranitidine of (H₂ antihistaminic agent) by intraperitoneal administration on mice. The studies were performed on albino mice kept under specific conditions and a constant dark - light cycle at 24 + 1 C and 55 + 5% relative humidity. Generally, the animals were acclimatised for four weeks before mating. Two female mice at 12 - 14 weeks of age were placed overnight with a male of proven fertility. The day on which a vaginal plug was found, was taken as day one of pregnancy. Also the vaginal smear was prepared for further proof. Treatment of pregnant females was started from day 7 and continued up to the 15th day of gestation and then on day 18 they were necropsied for routine teratological observations. The live fetuses were weighed and inspected for gross external abnormalities under a dissecting microscope. Resorption plus dead fetuses less than 6mm of length were designated early death and dead fetuses of more than 6mm of length were consequently called late death. The statistical study was done by student t - test.

One - third of the fetuses were fixed in bouin's fluid to detect visceral malformations by the rasor - section technique. There was no significant difference in the frequency of late death between the control groups and the groups given ranitidine. Differences were observed in the number of implantation sites except for 400mg/kg/day. Data pooled from all experimental groups clearly show that pig tail, deformed cranium, low body weight and skeleton, unshaped external ear and jaw and polydactyly are the most common external abnormalities. Results of this study show the hazards of ranitidine used during early pregnanecy.

خلاصه

(Albinus) بررسی شده اند. رانیتیدین هیدروکلراید با دوزهای 400، 200، 50 mg/kg/day بصورت داخل صفاقی یکبار در روز بین روزهای ۱۵ - ۷ بارداری به موشهای سوری تجویز شد. در روز هیجدهم بارداری، موشها کشته شده و توله‌ها بیرون آورده شدند و در این مطالعه، اثرات سمی رانیتیدین هیدروکلراید بعنوان یک آنتاگونیست بلوک کننده H₂ (H₂-blocker) در ایجاد عوارض مورفولوژیکی بافتی و اسکلتی در نسل اول موشهای سوری آلبینو

بارداری) و گاهی از اوقات، عدم اطلاع از وقوع بارداری درین دوران و همچنین نظر به محدود بودن اطلاعات در زمینه عوارض تراوتوزن این داروی تقریباً جدید، علاوه‌نمایند شدیم که اثرات آن را در دوران ارگانوژن موشهای سوری از لحاظ بروز عوارض اسکلتی، بافتی و مورفولوژیکی بررسی نماییم.

مواد و روشهای کار

پودر رانیتیدین هیدروکلراید خالص بصورت اهدایی از کارخانه داروسازی کیمیدارو، تهیه گردید. در این تحقیق، از موشهای سوری واریسته البینو (*Var. Musculus, albinus*) (FUS) استفاده گردید. موشها از انتستیتو پاستور خریداری شده و سن همه آنها بالای ۹۰ روز بود که سن مناسبی برای باروری می‌باشد. موشها سالم بوده، پشم براق و سفیدی داشته و از نظر تحريك طبیعی بودند. موشها مدت دو هفته فیل از جفتگیری در موقعیت و محل جدید قرار گرفتند تا به محیط عادت کنند. در هر فقس ۳ موش ماده قرار داده شد و غذا و آب به اندازه کافی در اختیار آنها قرار داده شد. درجه حرارت و رطوبت آزمایشگاه بترتیب ۲۶ - ۲۲ درجه سانتیگراد و ۵۵ - ۴۵٪ بود. بعد از عادت کردن موشها به شرایط جدید، در هر فقس یک موش نر سالم و جوان با سن حدود پنج ماه گذاشته شد تا عمل جفتگیری صورت گیرد. پس از جفتگیری، در دهانه واژن، توده سفت و کرم رنگی ایجاد شد که مانند یک چوب پنهه دهانه واژن را می‌پوشاند. این توده، پلاک واژنیال نام دارد. این پلاک تا چند ساعت پس از جفتگیری در محل باقی مانده و سپس از بین می‌رود. در موشهای ماده‌ای که این پلاک ظاهر گردید، یعنوان روز اول بارداری در نظر گرفته شده و در قفسهای جداگانه نگهداری شدند. بقیه موشها بطریقه اسمیر (smear) برای تعیین روز اول بارداری، مورد آزمایش قرار گرفتند. موشها بصورت دسته‌های پنج تایی در قفسهای جداگانه نگهداری شدند. از روز هفتم بارداری (شروع ارگانوژن) تزریق دارو بصورت داخل صفاتی پسرخانه شد و تا روز پانزدهم (اتمام ارگانوژن) ادامه یافت. در روز هیجدهم بارداری، موشها با روش نخاعی کردن کشته شده و جنین‌ها خارج گردیدند. جنین‌ها پس از خروج از درون رحم از کیسه آمنیون (amnion) خارج گشته و در محلول بوئن قرار گرفتند. پودر دارو در سرم فیزیولوژیک ۹/۰٪ استریل حل گردید و هر روز در ۲/۰ میلی لیتر بطریقه داخل صفاتی تزریق شد. گروه کنترل نیز با ۰/۲ میلی لیتر از سالین استریل مورد تزریق قرار گرفتند.

- اساس انتخاب دوزها بر پایه معیار دوز کم (بدون سمیت مادری) و دوز بالا (داشتن سمیت مادری و ۱۰٪ مرگ و میر) و دوز متوسط (بین دوز بالا و کم در پایه لگاریتمی) بود.

بررسی مورفولوژیک در جنین‌ها شامل مشاهده ناهنجاری‌ها توسط استریومیکروسکوپ و اندازه‌گیری طول سری - دمی، قطر سر و اندازه‌گیری وزن بود.

مورد بررسی مورفولوژیکی، بافتی و اسکلتی قرار گرفتند. بررسی رفتار موشهای براقتی پشم و میزان مرگ و میر در موشهای باردار تحت درمان، یعنوان معیارهای سمیت مادری در نظر گرفته شد که معیار انتخاب میزان (dosage) دارو بود. پانزده تا سی ثانیه پس از تزریق داخل صفاتی رانیتیدین، تاکی پنه، وضعیت خوابیده و درازکش و لوزش زودگذر مشاهده شد که از افت سریع فشارخون ناشی می‌شود. در طول درمان با رانیتیدین، موشهای باردار یک کاهش وزن جزئی در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. برطبق نتایج بدست آمده، رانیتیدین با دوز بالاتر از ۵۰ mg/kg/day تراوتوزن بوده و بیشترین اثر آن در سیستم اسکلتال می‌باشد، بطوری که شروع استخوان سازی را به تأخیر می‌اندازد.

مقدمه

گیرندهای H₂ برای اولین بار در سال ۱۹۷۱ شناخته شدند. در سال ۱۹۷۷، اداره غذا و داروی امریکا (FDA)، با مصرف سایمیتیدین در درمان زخم‌های دوازده و سندروم زولینجر-ليسون موافقت کرد. سایمیتیدین همانند هیستامین، حاوی یک حلقه ایمیدازولی می‌باشد، ولی بعدها مشخص شد که وجود حلقه ایمیدازولی برای اثرات H₂ بلوکری این داروها ضروری نیست و سرانجام در اواخر دهه هفتاد میلادی بود که رانیتیدین یعنوان یک H₂ بلوکر با اثرات قویتر از سایمیتیدین (۱۰ - ۴ برابر) به بازار عرضه شد و تا به امروز در درمان اختلالات ترشح اسید دستگاه گوارشی از دوز ۳۰۰ میلی گرم در روز گرفته تا شش گرم در روز، بطور موفق به کار رفته است. رانیتیدین یک مولکول قطبی بوده و از گوارشی از دوز ۳۰۰ میلی گرم در روز گرفته تا شش گرم در روز، چفت به آسانی عبور می‌کند و می‌تواند با غلظتی بیشتر از غلظت پلاسمما در شیر مادر ظاهر گردد. آن بصورت تغییر نیافته و بقیه بصورت متابولیت‌های اکسید شده از طریق کلیه‌ها دفع می‌شود. کارهای انجام شده قبلی نشان داده است که سمیت متابولیت ان - اکسید پمرات کمتر از خود رانیتیدین می‌باشد (۱).

در مطالعه‌ای که توسط گروهی از دانشمندان رائینی و با دوزهای ۵۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بصورت خوراکی در موشهای صحرایی باردار انجام شد، افزایش معنی داری در ایجاد عوارض تراوتوزنیک گزارش نشده است (۲). همچنین در مطالعه‌ای که توسط عده‌ای دیگر و با دوزهای وریدی ۵ و ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موشهای صحرایی باردار انجام شد، نیز تفاوت معنی داری از نظر ایجاد عوارض تراوتوزنی در موشهای تحت درمان و گروه کنترل مشاهده نشد. (۳). همچنین در این مطالعه، ایجاد عوارض در دوران شیردهی نیز بررسی شد و هیچگونه اختلاف معنی داری از لحاظ بروز پاسخ‌های رفلکسی، یادگیری و اعمال تولید مثل در نسل اول مشاهده نگردید (۳).

با توجه به گسترش مصرف این دارو و حتی مصرف آن در دوران ارگانوژن (organogenesis) بارداری انسان (هشت هفته اول

دوز 800 mg/kg/day هیچگونه اختلال تراتوژنیک معنی داری مشاهده نشد، حتی وجود سمت مادری نیز در این دوز از لحاظ آماری معنی دار نبود. تحقیق دیگری که یک سال بعد در سال ۱۹۸۴ توسط Kamada و همکاران وی (۳) انجام شد، رانیتیدین بطریقه وریدی در سه دوز به موشهای صحرایی تزریق شد و نتایج حاصل، عوارض تراتوژنیک را نشان نداد. در تحقیقی که ما انجام داده ایم، انتخاب دوز بر اساس آزمایشها مکرر بر اساس معیار سنجهش سمت مادری، بنا شده است. آزمایش با دوزهای 50 ، 200 ، 400 میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدنش موش سوری انجام شد و همانطور که انتظار می رفت و در قسمت نتایج آمده است، اثرات تراتوژنیک رانیتیدین با دوز 200 mg/kg/day در موش سوری از شیوع و شدت بیشتری برخوردار بوده اند. دیگر اینکه، رانیتیدین با دوز 50 mg/kg/day عوارض خفیفی ایجاد می نماید. اثرات تراتوژنیک با دوز بینایی شروع به افزایش میکند که با نتایج Kamada و همکاران وی مطابقت دارد. (۳) و نهایت اینکه، عدمه ترین آنومالی های ایجاد شده مربوط به سیستم اسکلتال می باشند که بصورت تأخیر در شروع استخوان سازی ظاهر می کند. همانطوری که در جدول ۱ آمده است، بیشترین عوارض مربوط به ایجاد دم خوکی (pig tail) و کمترین عوارض مربوط به شکاف گوش خارجی (cleft ear) بوده است و عوارضی از قبیل مننگوآسفالوسل و پای گود (pes cavus) در حد بینایی قرار دارند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده اثرات تراتوژنیک رانیتیدین در موش سوری بوده اند. البته، تعمیم این نتایج به انسان کار ساده ای نیست و احتیاج به مطالعات کامل اپیدمیولوژیک دارد. (۱۰) قویترین تراتوژن انسانی یعنی تالیدومید (thalidomide) که در دوز 1 mg/kg/day نیز 50 mg/kg/day اثرا می کند، در موشهای صحرایی و موش معمولی تا دوز 4000 mg/kg/day نیز هیچگونه اثر تراتوژنیک ندارد (۵) و از طرف دیگر کاربرد استیل سالبیسیلیک اسید در زمان بازداری در انسان تاریخچه درازی دارد و خطر چندانی نداشته، در حالی که در موشهای صحرایی و معمولی و هامستریک تراتوژنی قوی است (۶). اینکه بسیاری از ترکیبات شیمیایی در مدل های حیوانی تراتوژن بوده ولی در انسان نیستند، ممکن است بخشی از آن علت حساسیت کمتر انسان و سطوح تماس کمتر باشد (۷)، بنابراین دخالت دادن مطالعات اپیدمیولوژیکی در بررسی های تراتولوژی ضروری می باشد.

البته قابل ذکر است که راه مصرف رانیتیدین در انسان، خوراکی است، بنابراین، اثر گذر اول کبدی نیز می تواند در این ارتباط دخالت نموده و از میزان فرم آزاد رانیتیدین که به جریان سیستمیک خون می رسد، بکاهد (۸).

پیشنهاد می گردد، مطالعات تراتولوژیکی بعدی در زمینه رانیتیدین متوجه به بررسی اثرات آن در مراکز استخوان سازی جنین

بررسی های بعافتی با کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین اثوزین پس از تهیه برش های نازک انجام گشت. بررسی های اسکلتی نیز با کمک روش آلیزارین قرمز انجام شد (۴).

کلیه داده ها توسط روش آماری Student's t - test بررسی شد و اختلاف داده ها در گروه تحت درمان و کنترل با داشتن $P < 0.05$ بعنوان معنی دار مشخص گشت.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی های مورفو لوژیک در جدول ۱ آمده است. بیشترین موارد مشاهده شده، بترتیب شیوع، عبارتند از: دم خوکی (pig tail)، مننگوآسفالوسل، گردن پرده دار (webbed neck)، پای گود (pes cavus)، لب شکافدار (cleft lip)، سکاف گوش خارجی، چند انگشتی و اندام های غیرطبیعی و جثه کوچکتر (شکلهای ۲۱، ۲۳، ۴۳).

بررسی های بافتی نشان دهنده فیوز نشدن (fuse) مهره های اول و دوم گردن، بطی بودن رشد سلول های غضروفی و جدا نشدن عضلات سه سر (triceps) در اندام فوقانی و کلیه های دارای کالیس گشاد و گلومرول های متسع است (شکلهای ۵، ۶، ۷ و ۸). در بررسی با آلیزارین مشخص شد که در استخوان های سر و آرواره (mandibular) و سایر اندام های فوقانی و تحتانی و دم در گروه 50 mg/kg/day یک مهره و در گروه 200 mg/kg/day تعداد مهره های بیشتری دچار نقص مراکز استخوان سازی هستند و استخوان سازی در تنه بند های انگشتان دست و پا در گروه 200 mg/kg/day شروع نشده است (شکلهای ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). (۱۳)

بررسی آماری نشان داد که تغییر وزن مادران در گروه تحت درمان با 50 mg/kg/day نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری ندارد، در حالی که این اختلاف در گروه تحت درمان با 200 mg/kg/day مشاهده شده است. وزن و طول بدن و قطر دو طرف جمجمه در توله های گروه تحت درمان با 200 mg/kg/day در مقایسه با گروه کنترل با $P < 0.01$ کمتر بود. وجود سمت مادری در گروه تحت درمان با 400 mg/kg/day با $P < 0.01$ معنی دار بوده است.

بحث

عدمه ترین بررسی هایی که تاکنون در مورد رانیتیدین انجام گرفته اند، مربوط به کاربردها و عوارض کلینیکی و تداخل با سایر داروهای می باشد و کمتر به بررسی اثرات ناهنجاری زیستی (teratogenicity) آن پرداخته شده است. در مطالعه های که توسط Higashida و همکاران وی در سال ۱۹۸۳ انجام شد (۲)، رانیتیدین بصورت خوراکی به موشهای صحرایی باردار خورانده شد ولی تا

مراکز استخوان سازی جنین باشد، بتویله استفاده از حیوان در این زمینه توصیه می شود. روش‌های *in vitro* و کشت اندامها در خارج از بدن

شکل شماره (۱)

نمای نیم رخ سمت چپ از دو جنین ۱۸ روزه تحت آزمایش گروه (سمت راست) و جنین کنترل (سمت چپ)، در تصویر، جمجمة غیرطبیعی و گردن کوتاه با حالت پرده‌دار (webbed) در جنین تحت آزمایش مشخص است.

Mag : $\times 10$ 

شکل (۲)

نمای نیم رخ از سمت راست دو جنین ۱۸ روزه از گروه کنترل (سمت چپ) و گروه ۲۰۰ میلی گرم در روز (سمت راست). فرم جمجمه کاملاً غیرطبیعی، جثه کوچکتر و اسکلت نسبتاً خمیده در جنین تحت آزمایش مشخص است.

Mag : $\times 5$ 

شکل (۳)

یک جنین ۱۸ روزه از گروه supine pig tail نمای ۵۰ mg/kg/day به وضوح مشخص است.

Mag : $\times 5$



شکل (۴)

تصویر از رخ - نیمرخ، پای گروه کنترل (بالا)، و پای گروه تحت آزمایش گروه ۵۰ mg/kg/day (پایین). در پای موشهای تحت آزمایش، رشد کمتر و عدم تکامل پنجه‌ها مشخص است. (pes cavus)

Mag : $\times 20$

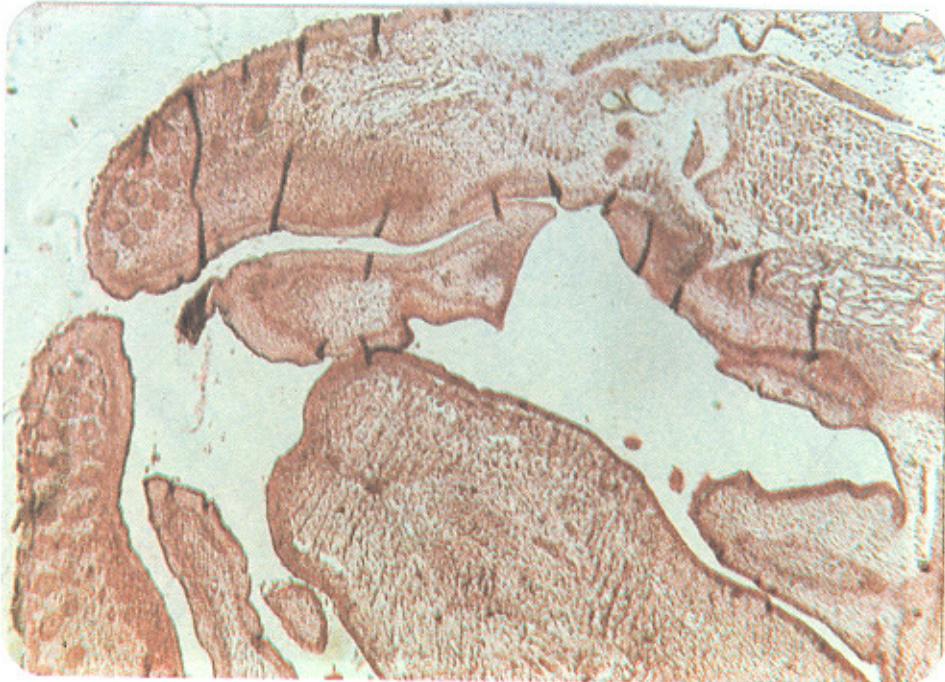


شکل (۵)

نمای تصویری بطریقه horizontal از ناحیه لب و کام از جنین تحت آزمایش از گروه 200 mg/kg/day فک فوقانی در ناحیه سخت کام به هم ترسیده و cleft palate کاملاً مشخص است.

Mag : $\times 21$

Stain : H & E

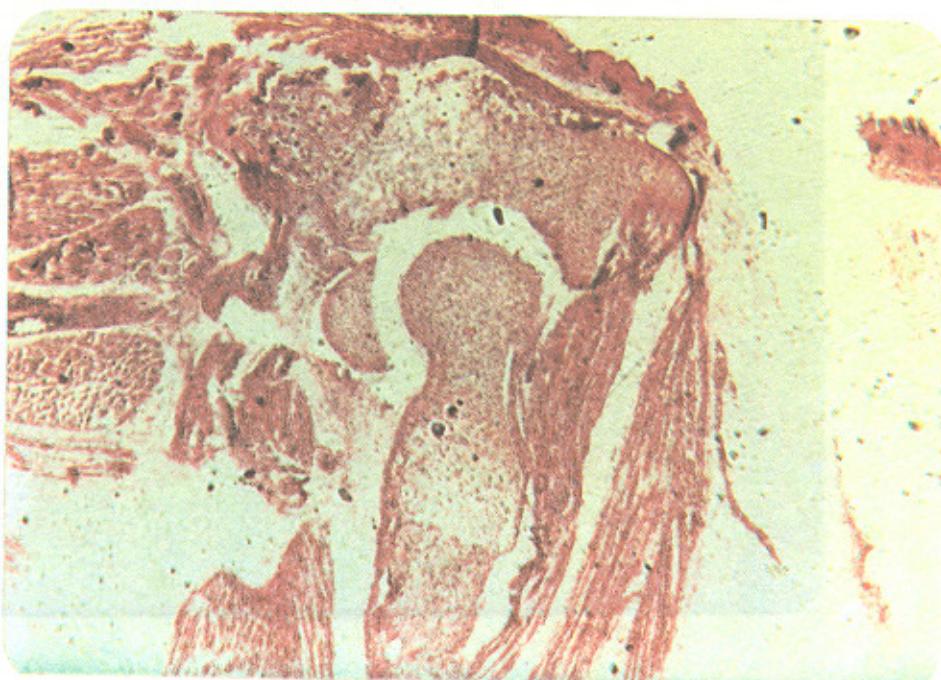


شکل (۶)

نمای تصویری از برش سازیتال (sagittal) اندام فوقانی مفصل آرچ در تصویر مشخص است. عکس از جنین گروه کنترل، عضله تریپس مجزا و کاملاً به ناحیه اولکرانون (olecranon) چسبیده‌اند. استخوان سازی در بازو (humerus) ادامه یافته ولی به ناحیه سوپراکنڈیلار ترسیده است.

Mag : $\times 83$

Stain : H & E

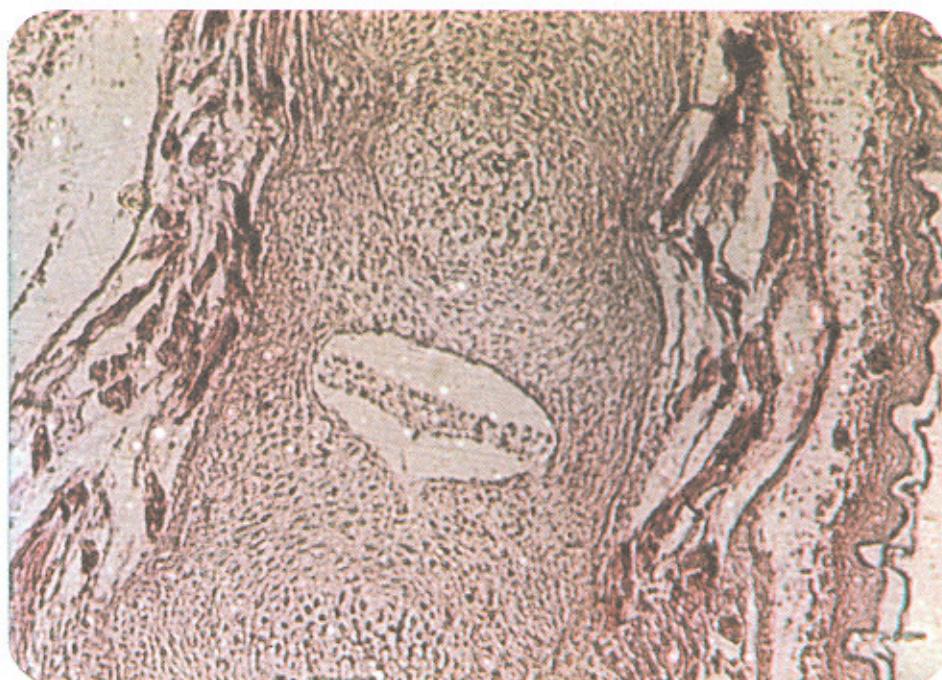


شکل (۷)

نمای تصویری از ناحیه دمی موش تحت آزمایش از گروه 200 mg/kg/day طریقه کرونال. grade II, III annulus Fibrosis تشكیل شده، اما هنوز تشکیل نشده است. سلولهای غضروفی مهره در سلولهای غضروفی می‌باشند.

Mag : $\times 211$

Stain : H & E

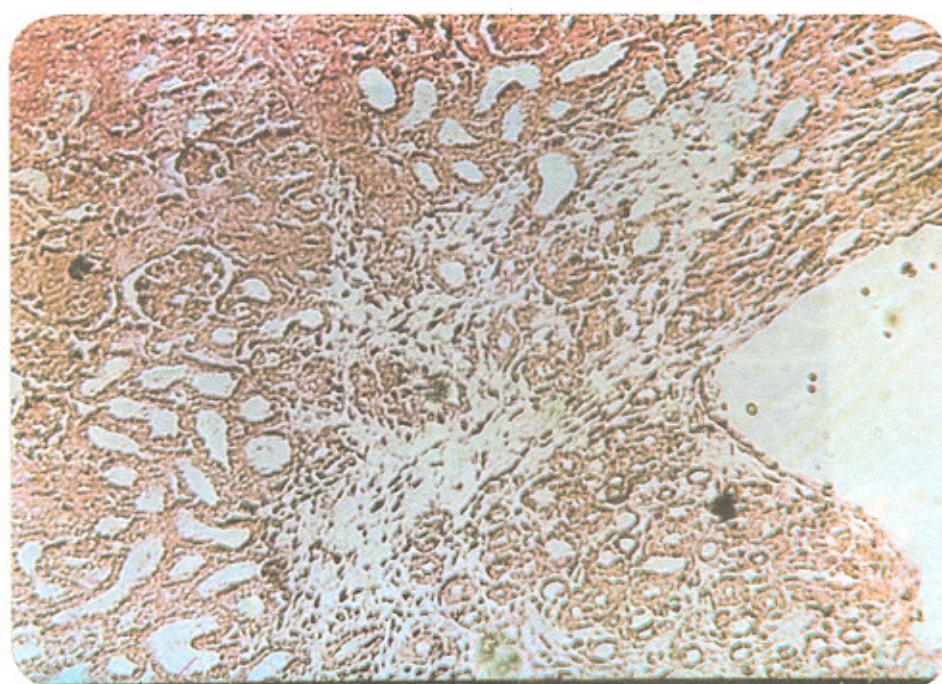
**شکل (۸)**

نمای عرضی از مقطع کلیه جنین تحت آزمایش در گروه 200 mg/kg/day نواحی قشری پرخون بوده و اتساع گلومرول‌ها و فعالیت بیسرا آنها مشخص است.

کالیس گشاد شده است (بیشتر از نرمال) در نواحی مرکزی، مجاری جمع کننده متسع می‌باشند.

Mag : $\times 330$

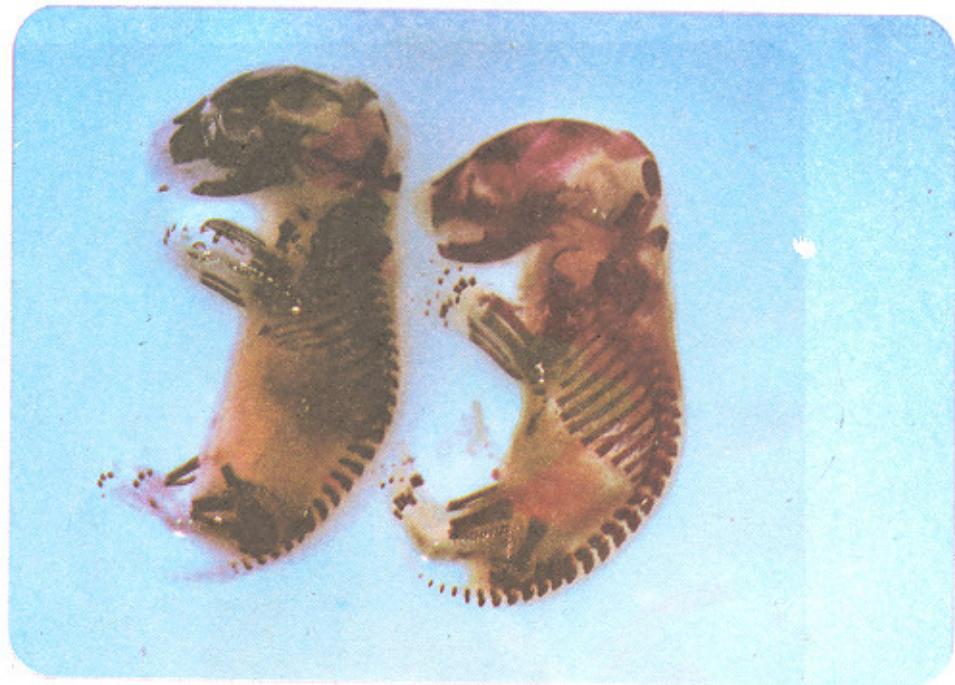
Stain : H & E



شکل (۹)

نمای نیمرخ چپ از موش کنترل (سمت راست) و موش تحت آزمایش از گروه 200 mg/kg/day . به تعداد مهره‌ها، وضعیت فک، مراکز استخوان سازی در مفاصل دست و پا و صورت و ناحیه دمی توجه شود که حاکی از تأخیر رشد در نمونه مورد آزمایش می‌باشد.
Mag : $\times 5$

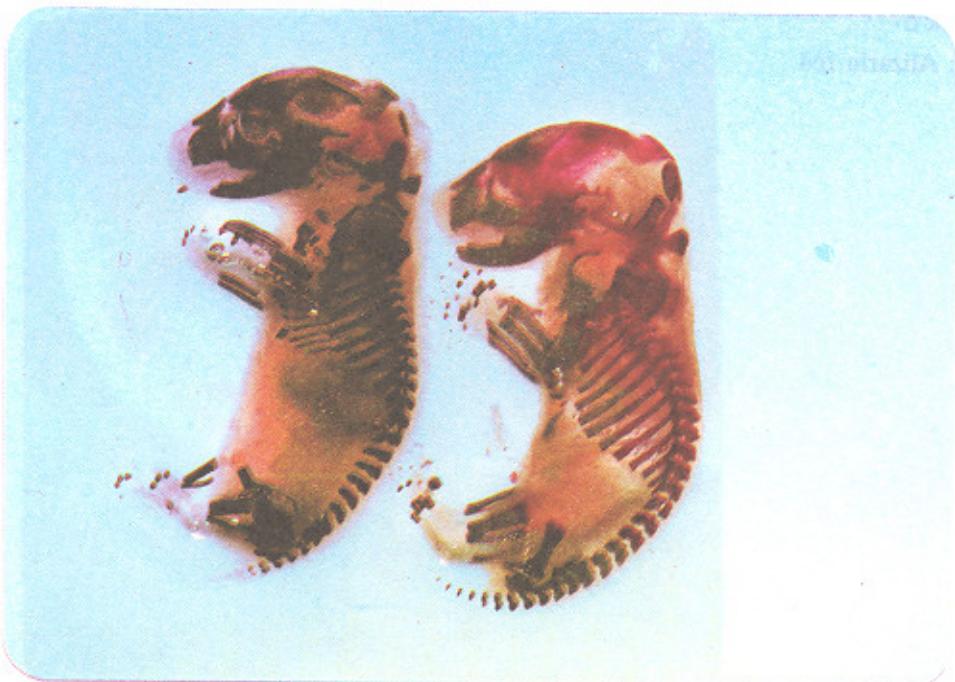
Stain : Alizarin red

**شکل (۱۰)**

گروه کنترل (سمت چپ)، موش تحت آزمایش از گروه 50 mg/kg/day (سمت راست)
با توجه به شکل اختلاف زیادی در تکامل وارگانورژن اندامها و سرو صورت دیده نمی‌شد.

Mag : $\times 5$

Stain : Alizarin red



شکل (۱۱)

نمای نیمرخ از سر و صورت جنین ۱۸ روزه موش تحت آزمایش، 50 mg/kg/day در مقایسه با شکل گروه کنترل، حفره اریتال تکمیل نگردیده، زائد زایگوما رشد کمتری دارد و استخوان پاریتال به تمپورال بطور کامل مفصل نگردیده و گسترش آن کامل نیست.

Mag : $\times 40$

Stain : Alizarin



شکل (۱۲)

نمای نیمرخ از ناحیه سر در جنین موش ۱۸ روزه گروه آزمایش 200 mg/kg/day زائد زایگوماتیک و استخوان پاریتال از رشد کمتری برخوردارند و میزان کلسیم آن نیز کاهش بیشتری را نشان می‌دهد. استخوانهای ناحیه گردن و پس‌سری از دانسیته کلسیمی کمتری برخوردارند.

Mag : $\times 50$

Stain : Alizarin red



هر بند انگشت کمتر است.

Mag : $\times 40$

Stain : Alizarin red

شکل (۱۳)

نمای رخ از انداخت فوکانی جنین ۱۸ روزه گروه تحت آزمایش ۵ مراکز استخوانسازی درناحیه ساعد و متاکارپ و تنہ انگشتان دیده میشود که نسبت به گروه کنترل، دانسیته کلسیم در تنہ



REFERENCES

- 1) Zeldis JB, Friedman LS, Isselbacher AJ: Ranitidine : A new H₂ - receptor antagonist. N Engl J Med. 309, 136-8, 1983.
- 2) Higashida N, Kamada S, Sakanoue M : Teratogenicity study on ranitidine Hcl in rats. J. Toxicol. Sci. Supple. 1 : 101, 1983.
- 3) Kamada S, Sakanoue M, Takeuchi M, Shimps K, Tanabe T : Effects of IV administration of ranitidine Hcl to the pregnant rats in organogenesis period. J. Toicol. Sci. Suppl. 1: 29, 1984.
- 4) Dawson, A A. 123, 1926.
- 5) Hodgson E, Levi PE : A Textbook of modern toxicology, Newyork Elsevier, 1987.
- 6) JM & Wise LD : A teratogens in casarwtt L, Doull J : General principles of toxicology (226) Macmillan comeany New York, 7 : 229 ,1987.
- 7) Farrar HC, Blumer JL : Fetal effects of maternal drug exposure. An Rev, Pharmacol. Toxicol. 37: 525, 1991.
- 8) Bradshaw J, Erittain RT, Clitherow JW, Daly MJ, Jack D, Price BJ, Stables : Ranitidine (AH 19065), A new potent, selective histamine H₂ - receptor antagonist. Brit. J. Pharamcol, 66 : 464, 1979.
- 9) Wilson J G, Walkay J : Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals Teratology principles and techniques. 1965
10. Abdollahi M : Principles of Teratology, 1st edition, Published by Abdollahi M. pp : 110 - 113, 1993.