

بررسی اثرات تراتوژنیک لورازپام در مورفوژنز و ارکانوژنز کام سخت جنین موش صحرایی (RAT)

معصومه فغانی^۱، زهرا نادیا شریفی^۲، دکتر ناصر سلسبیلی^۳

چکیده

لورازپام دارویی آرام بخش از گروه بنزودیازپین ها می باشد. نظر به اینکه بنزودیازپین ها روی رسپتورهای گاما آمینوبوتریک اسید اثر کرده و موجب تجمع یون کلسیم و کاهش کلی دریافت می گردند. لذا تغییر یونهای فوق در ساختار تکاملی کام که استخوانسازی داخل غشایی دارد تأثیر گذار است.

اثر لورازپام در تکامل و مورفوژنز کام سخت بصورت *in vivo* در جنین ۹ تا ۱۷ روزه *Whistar* Rat با مقادیر 2.4 mg/kg/day همراه با گروه شاهد و کنترل بصورت روشهای مورفومتری و هیستولوژی و هیستوشیمیایی بررسی شد. در این مطالعه پس از انجام سریال سکشن با ضخامت ۵ میکرون در مقطع فرونتال آنها را با چهار روش رنگ آمیزی و مورد مطالعه قرار دادیم، نتایج به شرح ذیل است:

۱. در مراحل ابتدایی (روز ۹-۱۴) تغییر چندانی از لحاظ وزن و قد و موارد مورفومتری و هیستولوژی در جنین های مورد آزمایش دیده نشد.
 ۲. در جنین های ۱۴-۱۷ روزه 4 mg/kg تغییرات وزن و قد کاملاً مشخص بود ($P < 0.05$) و ناهنجاری اندام ها در تمام جنین ها مخصوصاً در دستها و مفاصل، چشم و گوش و فرم بدن دیده شد.
 ۳. در بررسی هیستولوژی و هیستوشیمی از جنین های بدست آمده مواد بین سلولی (عمدتاً کلسیم و پروتئین و کلاژن و الاستین) در نواحی که استخوانی گردید از شدت رنگ پذیری بیشتری برخوردار بود. زبان به کام سخت اتصال داشت که در ایجاد ناهنجاری صورت مؤثر است. گردن شکل نگرفته بود و پوست ناحیه شانه به قسمت پایین صورت متصل بود.
- نتایج حاصله نشانگر این مطلب است که تجویز لورازپام در نیمه دوم زندگی جنین موجب تسریع در سنتز پروتئین می شود و اثر آن روی جنین کاملاً تراتوژنیک می باشد و قابل برگشت نیست.

واژه های کلیدی: لورازپام، تراتوژنیک، کام سخت، هیستوشیمیایی

۱. عضو هیات علمی دانشگاه آزاد تنکابن

۲. عضو هیات علمی دانشگاه آزاد تهران

۳. عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

در مرحله جنینی ابتدا یک حفره دهانی بینی اولیه وجود دارد. در پستان داران، کام در هفته های ۶ تا ۱۰ شکل می گیرد و حفره های بینی و دهان را از هم جدا می کند. کام در ابتدا سه قسمت دارد: یک زائیده کامی سیانی و یک جفت زائیده کامی طرفی، زائیده کامی میانی کام اولیه و زائیده کامی، طرفی، کام ثانوی را می سازند. قطعات کامی در خط وسط به یکدیگر و در جلو به کام اولیه متصل می شوند. چون اتصال قطعات کامی اهمیت کلینیکی دارد به همین جهت تحقیقات زیادی در مورد آن انجام شده است و اثرات داروهای مختلف در تکامل کام بخصوص در استخوانسازی و شکل گیری کام سخت مورد بررسی قرار گرفته است. لورازپام یک داروی آرام بخش و از گروه بنزودیازپین ها می باشد. که امروزه مصرف آن در کشور ما افزایش یافته است. لذا ما بر آن شدیم تا اثر این دارو را روی تکامل کام سخت در جنین *Rat* بررسی کرده و به سئوالات زیر پاسخ دهیم:

۱. اثر دوزهای مختلف لورازپام در تکامل کام سخت چگونه است.
۲. آیا لورازپام می تواند موجب تسریع و یا تأخیر در تمایز سلولی و تکامل طبیعی کام گردد؟
۳. اثر لورازپام روی کام سخت تراژونیک است یا خیر؟

مواد و روش ها

در این تحقیق اثر لورازپام با دوز $mg/kg/day$ ۲ و ۴ بر روی جنین های موش صحرایی ۹ تا ۱۷ روزه مورد آزمایش قرار گرفت. موش های بالغ (سه ماهه) و با وزن بین ۲۵۰-۳۰۰ گرم جهت تهیه

جنین استفاده شد. موشهای ماده بعد از باروری جدا و در چهار گروه تقسیم بندی شدند. گروه اول (شاهد): هیچگونه دارویی دریافت نکردند.

گروه دوم (کنترل): موشهایی که آب مقطر و داروی *Tween 80* دریافت کردند.

گروه سوم (آزمایشی اول): موشهایی که آب مقطر و *Tween80* و لورازپام به میزان $2 mg/kg/day$ دریافت می کردند.

گروه چهارم (آزمایشی دوم): موشهایی که آب مقطر و *Tween80* و لورازپام به میزان $4 mg/kg/day$ دریافت می کردند.

به گروههای دوم تا چهارم، تزریق از روز ۷ حاملگی تا روز ۱۷ به طریق داخل صفاقی انجام شد. شریان کاروتید موشهای هر چهار گروه در روزهای ۹-۱۱-۱۴-۱۷ حاملگی تحت بیهوشی عمومی قطع و بعد از باز کردن جدار شکم، رحم به همراه جنین های موجود بیرون آورده شد. ابتدا جنین ها فیکس شدند و سپس شمارش آنها صورت گرفت و از لوله رحم خارج گردید. ۱۸۱ جنین در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه گیری طول سری - دم (*crown - rump Length*) و قطر سر (*Biparital*) بر حسب میلی متر و وزن بر حسب گرم انجام شد. طول CR و قطر سر توسط کولیس و وزن بوسیله ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۱ اندازه گیری شد.

جنین ها توسط استرپتومیکروسکوپ بررسی شدند و برای انجام مراحل بعدی، سر جنین از تنه جدا گردید. بعد از طی مراحل آماده سازی و تهیه مقاطع به روش سریال سکشن، لام تهیه گردید و

نمونه ها به چهار روش هماتوکسیلین - اتوزین ، تولوئیدن بلو ، تری کروم ماسون و پارالدئید فوشین رنگ آمیزی شدند .

تغییرات وزن ، CR ، BP در جنین های ۹ تا ۱۴ روزه در چهار گروه شاهد ، کنترل ، آزمایش اول و دوم مقایسه گردید و با استفاده از آزمون T -Test و آنالیز واریانس بین داده های آماری بصورت یکطرفه و مقایسه ای انجام شد .

یافته های پژوهش

در جنین های ۱۴ روزه بدن جنین به شکل C و اندامهای فوقانی و تحتانی کاملاً مشخص بود ، پنجه ها هنوز شکل نهایی خود را پیدا نکرده و انگشتان به هم چسبیده بودند . پوزه شکل گرفته و مجرای خارجی گوش و چشم در وضعیت طبیعی بود .

از نظر میکروسکوپی دیواره میانی بینی قابل مشاهده بود ، کام اولیه به دیواره میانی بینی چسبندگی داشت . زبان در پشت کام اولیه و بین دو زائده کامی قرار داشت . زواید کامی بصورت دو برجستگی در سطوح داخلی ماگزایلا دیده شد که قسمتهای قدامی آن بصورت افقی و مزانشیم آن فشرده بود و عروق خونی فراوانی داشت . قسمتهای خلفی زواید کامی عمودی بوده و در دو طرف زبان قرار داشت .

در رنگ آمیزی تری کروم ماسون تمایز سلولهای خونی در رأس سپتوم بینی و زواید کامی دیده شد ولی در زواید کامی هیچ اثری از تجمع فیبرهای کلاژن دیده نشد .

نتایج روز ۱۷ در نمونه های شاهد و کنترل: وضعیت ظاهری بدن به شکل C ، دستها و پاها در وضعیت عادی ، کف دستها و پاها روبروی یکدیگر قرار

داشت . چرخش دم طبیعی و در ناحیه میانی بود ، در ناحیه صورت ، چین نازولاکریمال تکمیل و پوزه شکل عادی داشت . کام سخت در این نمونه ها تشکیل و از قدام به خلف از ضخامت آن کم می شد . زبان در قدام حفره دهان بود ، استخوان سازی داخل غشایی در قاعده زواید کامی مشاهده نشد . کام سخت و سپتوم میانی بینی به هم چسبندگی داشتند ، در رنگ آمیزی پارالدئید فوشین در محل اتصال تیغه بینی به پارالدئید فوشین در محل اتصال تیغه بینی به زواید کامی به میزان کم فیبرهای الاستیک وجود داشت .

در رنگ آمیزی تولوئیدن در ناحیه اتصال تیغه بینی و زواید کامی هیچگونه اثری از ماتریکس حاوی کندروئیتین سولفات دیده نشد .

در رنگ آمیزی ترم کروم ماسون هیچگونه تغییری از نظر افزایش کلاژن در زواید کامی دیده نشد .

نتایج روز ۱۷ در نمونه های ترانژن: در نمونه های $2mg$ تغییر خاصی از نظر تکامل و ارگانوژنز با نمونه های شاهد و کنترل دیده نشد جز اینکه پرده های چشمی باز نشده بود ، لاله گوش و سوراخ خارجی گوش بسته تر بود و از نظر وزن و CR نسبت به نمونه های شاهد و کنترل سنگین تر بودند . جنین هایی که دارو به میزان $4mg$ دریافت کرده بودند از نظر وزن و CR افزایش واضحی نسبت به جنین های $2mg$ و کنترل و شاهد نشان می دادند . در این جنین ها بدن به شکل C نبود ، دستها و پاها به فرم غیر عادی و چرخش اندام تحتانی بیش از اندازه بود . کف دستها به طرف بدن و دم در ناحیه میانی بدن واقع نبود . فتق ناحیه شکمی کاملاً واضح

جدول ۲. توزیع فراوانی جنین های ۱۴ و ۱۷ روزه مورد آزمایش

جنین	فراوانی		جنین های ۱۴ روزه		جنین های ۱۷ روزه	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
شاهد	۱۲	۲۷/۲	۱۳	۲۷/۶		
کنترل	۱۴	۳۱/۸	۱۲	۲۵/۵		
آزمایش ۱	۱۰	۲۲/۷	۱۰	۲۱/۲		
آزمایش ۲	۸	۱۸/۱	۱۱	۲۳/۴		
جمع	۴۴	۱۰۰	۴۷	۱۰۰		

بحث و نتیجه گیری

بر اساس مشاهدات این تحقیق که روی جنین های ۹ تا ۱۷ روزه با استفاده از لورازپام به میزان 24 mg/kg/day انجام شد در روزهای ۱۱ و ۹ هنوز کام شکل نگرفته بود ولی در روز ۱۴ کام اولیه وجود داشت. در روز هفدهم کام سخت تشکیل شده و از قدام به خلف باریکتر می شد. تجمع عروق خونی در زواید کامی در قسمتهای قدامی بیشتر بود که می توان پرخونی را به عنوان یک عامل مکانیکی جهت بالا بردن زواید کامی و تأمین کننده انرژی لازم برای اینکار به حساب آورد [7].

در محل یکی شدن غشا پایه، در زایده کامی و نیز در محل اتصال سپتوم میانی بینی به زایده های کامی سلولهای کشیده با سیتوپلاسم اسیدوفیل و فشرده و هسته هیپرکروماتین و با دانسیته بالا دیده شد که این موارد در مراحل مرگ سلولی دیده می شود و موافق نظریات کارسون و ریپالو در سال ۱۹۹۳ و هیوارد در سال ۱۹۶۹ می باشد. یعنی در اثر مرگ سلولی در ناحیه اتصال کام، دو لایه از دو طرف به هم می پیوندند. با توجه به نتایج، ماتریکس بین سلولی نقش عمده ای در اتصال و یکی شدن زواید کامی با یکدیگر و تیغه میانی بینی دارد و این امر با برداشته

شدن رشته های الاستیک از غشاء صورت می گیرد [4].

در مطالعات میکروسکوپی با رنگ آمیزی پارالدئید فوشین هیچ دلیلی مبنی بر ممتد بودن غشاء پایه بعد از سیتولیز سلولهای اپی تلیوم بدست نیامد که فاربمانب نیز این امر را تایید می کند [1]. بر اساس رنگ آمیزی تری کروم ماسون در تایید نظرات فرگوسن و پایان نامه انصار، تجمع الیاف کلاژن در طول محور قدامی خلفی زواید کامی مشاهده نگردید. افزایش الیاف کلاژن در قسمتهای دیده شد که در استخوانی شدن داخل غشایی ماکزیلا نقش داشت.

از سوی دیگر ضخامت سلولهای اپی تلیال در ناحیه اتصال دو زایده کامی نیز یکباره کاهش یافته و سلولها غشاء پایه نیز بسیار باریک می گردد و در نتیجه سلولهای مزانشیمی با تکثیر خود به ناحیه هجوم می آورند و طبق مشاهدات ما، با کاهش اپی تلیوم در محل اتصال نظریه تکثیر سلولهای مزانشیمی آقایان *Jelinek, Dostal* در سال ۱۹۷۴ و ۱۹۷۳ تایید می شود.

References

- 1-Albert I. fbrman :Electron Microscope study of palate in mouse . Embryous Development Biology ,1968 18:93-116.
- 2-Anderson Hf., Mathissen :Histochemistry of the early development of the human face and masal cavity with special reference of the movment and fusion of the palatine proces .Alta ,Anat .1967 68:473-508.
- 3-Carson Dn . A., and Ribeblo JM.,: Appoptosis and disease .Lancet 1993 ,34,1252.
- 4-Ferguson MWJ., palatl shelf elevation in the wistar rat fetus .J.Anat ,1978 125(3): 555-557.
- 5-Henry Dw.,Burwinkle Jw.,klutman Ne. : Determination of sedative and amnestic doses of lorzepam in children .chin - pharm .1991,10(8):625-629.
- 6-Kennet L.,Becker :Principals and parctice of endocrinology and metabolism .Published by J.Blippincot company philadelphia 1st Edition,1991 ,page 474-477.
- 7-Little :vital morphological study of normal palatal closure in A/jax mice ,90 page typed thesis in michigan university ,school of density, 1963.
- 8-Tuker JC.:Benzodiazepines and developing rat:a critical review .Neutosci - Biobehave _ Rev,1985 ,9(1) :101-111.

می توان از یافته های تحقیق نتیجه گرفت که لورازپام به عنوان یک بنزودیازپین روی رسپتور گامابنزودیازپین A و B اثر کرده و موجب افزایش تجمع یون کلرو فسفات در خون و کاهش میزان کلسیم در خون و متعاقب آن افزایش کلسیم در بافت شده است . تجمع کلسیم و فسفات می تواند در شکل گیری ماتریکس استخوانی اثر بگذارد [6] . و موجب تحریک شکل گیری استخوان بصورت *In vivo* گردد

ثابت شده است که تجمع فسفات در سالهای اول زندگی رشد اسکلتی را تسریع می کند و مکانیسم آن در ارتباط مستقیم با هورمونهای رشد و کلسی تونین می باشد . با توجه به نتایج می توان گفت لورازپام استخوانسازی را تسریع کرده و موجب اختلال و تغییر شکلهای زیاد در سر و صورت می گردد . مطالب فوق گویای آنند که می توان لورازپام را به عنوان داروی مسکن و لی تراژونی دانست که این امر موجب تغییر شکلهای فراوانی در تکامل و بلوغ جسمی جنین می گردد .

Effect of lorazepam on the anatomical development of morphogenesis of the secondary palate in the rat embryo.

Faghani M. ,Nadia sharifi Z. ,Dr. Salsabili N.

Abstract: Lorazepam which is one of GABA argic A.B receptors of the Benzodiazepines compile group was studied in view of morphogenesis, histologically and histochemically with dosage of 2mg, 4mg /kg/day compared with control group. In this study, 350rat embryos (Whistar) of 9 to 17 days of gestation were used. After fixation, they were sectioned serially and stained with Toluidine-blue, H+E, Trichromemasson's, Paraldehyde fushin, in order to find out histochemically the extracellular material exchange and cellular activity.

The results: 1-During stage of 9-14 days of gestation no difference or malformation proved significant morphologically and histochemically between two groups of experiments and control group. 2-in stages of 14-17 days of embryo, specially in 4mg/kg/day experiments lorazepam administrated, significantly morphometric difference was observed in height ($P<0/05$), weight ($P,0.01$) with control group, whereas malformation of limbs specially in hands, joints, eyes, ears, and body formations were observed in all embryo. 3-In histological & histochemical study on bone formation in the palate (primary & secondary) differences in bone growing were significant, the amount of Ca^{++} and phosphates was vigorously more deposited in the region and stained sharply with special days. Deformity of face and head region also appeared because of elastic band formation in hard palate. Formation in protein synthesis in faster growing of hard palate had caused palate undetachment from the tongue. Tongue, was attached to hard palate causing deformity in face and lower jaw and hard palate culminating in head conical and attachment of shoulder skin to lower part of the jaw.

At the end of administration of lorazepam during the second half of the life of embryo, protein synthesis acceleration was proved and its effect on the growth hormon was sole treatagenic.

Keywords : *Larazepam, secondary palate, anatomical*