

اثرات ترانوتژنیک دگزامتازون و هیدروکورتیزون بر روی جنین مرغ

دکتر سیدناصر استاد^۱، دکتر محمد عبداللهی^۲، دکتر محمد اکبری^۳، دکتر حسن مرزبان^۴، دکتر نیلوفر باب المراد^۵

۱- استادیار گروه داروشناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲- دانشیار گروه داروشناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- استادیار گروه جنین‌شناسی دانشکده پزشکی تهران ۴- گروه سم‌شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

سابقه و هدف: دگزامتازون و هیدروکورتیزون از خانواده هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی بوده و در محدوده وسیعی کاربرد دارند. این دو دارو اثرات زیستی مشابهی داشته ولی بدلیل کنتیک متفاوت آنها، میزان ناهنجاری‌زایی آن هم‌ارز قدرت اثر فارماکولوژیک آن نمی‌باشد. در این مطالعه اثر این داروها با تزریق به داخل مایع آمنیوتیک جنین مرغ سه روزه در ابتدای شروع اندامزایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: پس از ۷۰ روز از انکوباسیون، جنینها از داخل تخم خارج گردیدند و اثرات ناهنجاری‌زایی شامل سمیت رویانی، جنینی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: دگزامتازون با مقدار مصرف 4×10^{-4} mg و هیدروکورتیزون با دوز 2×10^{-1} mg باعث ایجاد ناهنجاری در جنین مرغ گردیدند. هر دو دارو در پارامترهای مورد بررسی واسکلت جنین‌ها تغییرات چشمگیری ایجاد نمودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که در دوزهای مشابه دگزامتازون در ایجاد ناهنجاری، نسبت به هیدروکورتیزون، ۵۰۰ بار قویتر است.

واژه‌های کلیدی: دگزامتازون، هیدروکورتیزون، ناهنجاری‌زایی، جنین مرغ، سمیت.

مقدمه

دگزامتازون و هیدروکورتیزون از خانواده هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی بوده که خاصیت ضدالتهابی دارند (۱و۲). فعالیت گلوکوکورتیکوئیدی بسیار شدید ترکیب صنایع دگزامتازون که فعالیت مینرالوکورتیکوئیدی آن تقریباً صفر است این ماده را بصورت اختصاصی در مواردی که نیاز به یک کورتیکواستروئید ضد التهابی است شـاخص مـسی نماید (۲). لااقل ۹۵٪ فعالیت گلوکوکورتیکوئیدی ترشحات فوق کلیه ناشی از هیدروکورتیزون است (۲). مشخص شده است که اثر

ضدالتهابی دگزامتازون در مقایسه با هیدروکورتیزون حدود ۲۵ برابر است (۲). دگزامتازون در موش باعث ایجاد شکاف کام (۳)، ناهنجاریهای جنینی در موشهای سوری، صحرائی و خرگوش و همچنین افزایش جنینهای مرده در موش صحرائی و خرگوش می‌شود (۴). هیدروکورتیزون نیز باعث تأخیر رشد در جنین مرغ (۵)، شکاف کام در موش (۳) و افزایش مرگ‌ومیر در جنینهای موش و خرگوش می‌شود (۶). بررسی ناهنجاری‌زایی داروها تأثیر بسیار خوبی بر نحوه درست مصرف و دوز

دگزامتازون در 4×10^{-4} mg برای هر تخم مرغ اثرات ناهنجاری زائی قابل توجهی نسبت به کل داشته است ($p < 0.01$) و اثر مشابهی نیز در مقدار مصرف حدود ۵۰۰ برابر دگزامتازون، از هیدروکورتیزون مشاهده شد. مقادیر مصرف بین 4×10^{-7} mg تا 4×10^{-5} mg میلیگرم از دگزامتازون اثر ناهنجاری زائی نداشت و این محدوده برای هیدروکورتیزون 8×10^{-2} mg تا 4×10^{-5} mg میلیگرم بود. نارسائی‌های مشاهده شده اسکلتی شامل موارد زیر می‌باشد:

- دفرمیتی استخوان که در ستون مهره‌ها و استخوانهای دراز و کوتاه دست و پا مشاهده شد.
- عدم وجود قسمتی تا تمام استخوانهای ناحیه کمری، خاجی، مهره و جمجمه.
- کوچک بودن استخوانهای اسکلتی بدین معنی که بعضی استخوانها وجود دارند ولی ناقص هستند.
- نرم بودن و بی‌حالت بودن استخوانها نسبت به حالت طبیعی
- کاهش در تعداد دنده‌ها.
- کوچکی استخوانهای لگنچه.
- وجود اختلال در تکامل استخوان که استخوانها حالت فیبرمانند دارند که در استخوانهای ستون فقرات دیده شد.

بحث

تسجویز محدود و وسیعی از مقادیر دو داروی هیدروکورتیزون و دگزامتازون بترتیب نشان داد که در مقادیر مصرف 2×10^{-1} mg و 4×10^{-4} mg برای هر جنین مرغ باعث ایجاد ناهنجاری گردیده است. گلوکوکورتیکوئیدها بر روند افزایش نیترژن و هیدروکسی پرولین در کل بدن مرغ اثر گذاشته و آنرا کاهش می‌دهند. از این رو وزن متوسط مرطوب و خشک جنین با این داروها کاهش یافت که می‌تواند دلیل کندی روند رشد جنین‌ها باشد. این داروها در بیوسنتز RNA ایجاد تغییراتی می‌نمایند که این امر می‌تواند توجیهی برای اثر تخریبی بر

مورد استفاده از آنها دارد. ناهنجاری‌هایی برخی از داروها بستگی به مقدار مصرف داروها دارد و برخی دیگر با هر دوزی ناهنجاری‌ها هستند. استفاده از این داروها بجای همدیگر بسیار رایج است و معیار تجویز معمولاً مقدار قدرت (Potency) دارو می‌باشد. در این مطالعه سعی شده تا قدرت اثر این دارو در ایجاد سمیت جنینی در جنین سه روزه مرغ بررسی گردد.

مواد و روشها

برای هر مقدار مصرف انتخابی از داروها تعداد ۲۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار از نژاد آرین (تهیه شده از شرکت ایران جوجه) مورد استفاده قرار گرفت. هیدروکورتیزون و دگزامتازون (Sigma) بوسیله فسفات دی سدیم در محلول سالیین نرمال به غلظت‌های مختلف در شرایط استریل رسیده و سپس توسط سرنگ انسولین با متد خاص تزریق در تخم مرغ (۷) در حجم‌های ۰/۵ میلی‌لیتر در روز سوم انکوباسیون به روش کور (روش خاصی در تزریق داخل تخم مرغ با استفاده از سایز و پوسته می‌باشد) تزریق شدند. به تخم مرغ‌هایی که دسته کنترل محسوب می‌شدند بمیزان 0.5° از ماده حامل تزریق شد. در روز ۲۰ انکوباسیون تخم مرغ‌ها باز شدند و پرده دور جنین‌ها به آرامی برداشته شد و جنینها بیرون آورده شدند. سپس جنینها وزن شدند و نارسائی‌های اسکلتی و اندامی آنها بررسی گردید. پارامترهای مورد بررسی عبارت بودند از: طول نوک تا خلف سر (Cranial ramp)، طول نوک (Length of beak)، قد (RCL)، قطر سر (BPD) و وزن (Weight). برای بررسی اسکلت داخلی، نمونه‌ها توسط مستد آلزارین رد-اس (Alizarin Red -S) رنگ آمیزی شدند. داده‌ها با استفاده از تست Newman-keuls و تست Fisher-Exact مقایسه گردیدند.

یافته‌ها

همانطوریکه در جدول (۱) مشاهده می‌شود

جدول ۱. مقایسه تأثیر دو داروی دکزامتازون و هیدروکورتیزون بر روی جنین ۳ روزه مرغ در مقایسه با کنترل در فاکتورهای مورد بررسی

وزن	قطر سر	قد	طول نوک	طول نوک تا خلف	
۱۷/۳۰۲±۰/۹۱۶	۱/۵۶۳±۰/۰۲۷	۸/۰۳۵±۰/۱۳۷	۱/۲۱۸±۰/۱۵۱	۳/۳۷۵±۰/۱۸۱	کنترل (۱)
۱۶/۸۸۰±۰/۸۰۸	۱/۵۶۶±۰/۰۳۹	۸/۱۸۴±۰/۲۷۹	۱/۱۰۳±۰/۰۵۹	۳/۴۳۵±۰/۱۱۴	Dex۴×۱۰ ^{-۷} mg
۱۷/۴۵۸±۲/۵۵	۱/۵۵۶±۰/۰۴	۸/۲۱۰±۰/۴۶۹	۱/۰۸۴±۰/۰۴۷	۳/۳۷۱±۰/۱۰۵	Dex۴×۱۰ ^{-۵} mg
۳/۱۱۶±۱/۵۹۱*	۱/۱۲±۰/۲۵۷*	۴/۸۶۸±۱/۱۰۴*	۰/۶۹۳±۰/۱۶۱*	۲/۰۷۸±۰/۴۷*	Dex۴×۱۰ ^{-۴} mg
۱۸/۷۵۰±۱/۵۹۱	۱/۵۶۸±۰/۰۴۹	۸/۳۵۱±۰/۳۱۲	۱/۲۵۶±۰/۰۷۷	۳/۴۲۰±۰/۱	Dex۴×۱۰ ^{-۶} mg
۱۶/۲۴۵±۰/۸۵۳	۱/۵۷۷±۰/۰۵۸	۸/۱۸۸±۰/۲۱۴	۱/۱۵۹±۰/۰۳۹	۳/۳۳۰±۰/۰۵۶	Dex۴×۱۰ ^{-۵} mg
۱۷/۴۸۰±۰/۸۵۳	۱/۵۶۳±۰/۰۲۹	۸/۳۵۲±۰/۳۸	۱/۱۴۳±۰/۰۷۱	۳/۳۷۸±۰/۱۰۲	Dex۴×۱۰ ^{-۴} mg
۱۷/۴۸۰±۰/۸۵۳	۱/۵۷۸±۰/۰۲۶	۸/۰۱۰±۰/۲۰۶	۱/۲۲۵±۰/۱۴۶	۳/۳۶۶±۰/۱۶۸	کنترل (۲)
۱۶/۷۱۰±۰/۸۸۳	۱/۵۷۲±۰/۰۲۶	۸/۰۸۶±۰/۲۳۸	۱/۱۱۳±۰/۰۵۳	۳/۳۹۹±۰/۱۲۷	Hyd۴×۱۰ ^{-۲} mg
۱۷/۵۴۲±۲/۳۸۰	۱/۵۳۷±۰/۰۵۲	۸/۱۹۷±۰/۵۱۴	۱/۰۸۷±۰/۰۵	۳/۳۸۸±۰/۰۹۶	Hyd۴×۱۰ ^{-۲} mg
۶/۲۲۹±۳/۰۶۸*	۱/۲۵۸±۰/۲۲۱*	۵/۶۹۰±۱/۰۵۶*	۰/۷۷۲±۰/۱۰۸*	۲/۳۲۹±۰/۳۶۴*	Hyd۴×۱۰ ^{-۱} mg

Dex: Dexamethasone Hyd: Hydrocortisone

* Significant at p<0.01, در بقیه موارد p<0.05

این مکانیسم ممکن است در مورد جنین مرغ نیز صادق باشد. هیدروکورتیزون می تواند میزان گلوکوکورتیکوئیدها، گلوکوکورتیکوئیدها را پراکسیداز، گلوکوکورتیکوئیدها و سوپراکسید دیسموتاز را بمیزان ۷۰-۶۰ درصد در جوجه ۱۵ روزه کاهش دهد (۱۲). در صورتیکه این اتفاق در جنین مرغ نیز بیافتد احتمال ناهنجاریهای مربوط به کاهش آنزیمهای متابولیزه کننده افزایش می یابد. گلوکوکورتیکوئیدها باعث تحریک فعالیت استئوکلاستهای استخوان می شوند (۷). استئوکلاستها با دخالت در تجزیه و تغییر شکل استخوانها نقش مهمی در شکل بندی اسکلتی دارند. بنابراین ناهنجاریهای این دو ترکیب ناشی از نقش وسیع گلوکوکورتیکوئیدها در متابولیسم و ساخت و ساز اندامهای مختلف بدن می باشد.

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می دهد که دگزامتازون در مقدار مصرف ۴×۱۰^{-۴} mg برای هر تخم مرغ و هیدروکورتیزون در مقدار مصرف ۲×۱۰^{-۱} mg برای هر تخم مرغ باعث ناهنجاریهای گردیده است که با آنالیز آماری این اثر بر روی اندامهای خارجی و اسکلت

جمعیت، سلولی جنین و کاهش تعداد سلولها و در نتیجه اختلال در سیکل رشد باشد (۸). اثر هیدروکورتیزون در سرکوب فعالیت میتوزی سلولهای در حال رشد و تمایز اندامها ثابت شده است (۴) که دلیلی بر کاهش پارامترهای اندازه گیری می باشد. رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی هم واسطه ضدالتهابی و هم واسطه عمل تراژونیک گسلوکوکورتیکوئیدهاست (۹). گلوکوکورتیکوئیدها از آزادسازی آراشیدونیک اسید و پروستاگلاندینها ممانعت بعمل می آورند که دلیلی برای حضور یک مسیر ژنتیکی و بیوشیمیایی برای عمل تراژونیک آنها است (۱۰). هیدروکورتیزون تشکیل و تمایز مراکز استخوانی (کلونی هائی که تشکیل مراکز پیش استخوانی را می دهند) را کاهش می دهد و این امر ممکن است عامل ایجاد دفورمیتی، آپلازی، استئومالاسی، دیسپلازی فیبروز و دیگر نقایص استخوانی در جنین باشد. هیدروکورتیزون رل اساسی را در رشد غده فوق کلیوی جنین و تشدید عدم پاسخدهی آن ایجاد می کند و همین مسئله ایجاد تأخیر در رشد گوسفند و متعاقب آن زایمان دیررس می نماید (۱۱).

مدت زمان بیشتری را در مجاورت سلولهای جنینی قرار می‌گیرد. نکته دیگر اینکه در انسان درصد اتصال به پروتئین‌های پلاسمای هیدروکورتیزون ۹۵-۷۵ درصد و در دگزامتازون ۷۱-۶۵ درصد می‌باشد. زرده و آلبومین تخم مرغ نیز حاوی پروتئین‌های مشابه می‌باشد (۱۳). بنابراین احتمال تفاوت غلظت داروی آزاد بنفع دگزامتازون وجود دارد که خود می‌تواند عامل دیگری بر افزایش اثر دگزامتازون باشد. با توجه به وجود تشابهات فارماکوکینتیکی بین محیط جنین مرغ و انسان، احتمال وقوع ناهنجاری در جنین انسان با توجه به تفاوت اثر بین دگزامتازون و هیدروکورتیزون مشابه نتایج این مطالعه، در دوره حاملگی نیز وجود دارد و بنابراین انتخاب مقدار مصرف هم ارز بر اساس قدرت اثر فارماکولوژیکی منطقی بنظر نمی‌رسد.

داخلی به اثبات رسیده است. قدرت اثر دگزامتازون ۵۰۰ مرتبه قوی‌تر از هیدروکورتیزون در ایجاد ناهنجاری‌هایی بوده است. البته این اثر در مقایسه با قدرت فارماکودینامیکی آن حدود ۲۵-۲۰ برابر بیشتر است. بررسی فاکتورهای فارماکوکینتیکی در انسان نشان می‌دهد که دگزامتازون دارای نیمه عمر بالا و در حدود ۷۲-۳۶ ساعت است، در صورتیکه هیدروکورتیزون یک داروی کوتاه اثر با نیمه عمر ۱۲-۸ ساعت می‌باشد. علت تفاوت کینتیکی آنها به عمل آنزیمهای متابولیزه کننده برمی‌گردد. در درون تخم مرغ جنین دار نیز آنزیمهای متابولیزه کننده هم در زرده (yolk) و هم در آلبومین وجود دارد (۱۳). اگر آنزیمهای مذکور بهمان طریق در انسان عمل نمایند، تفاوت در سرعت متابولیزه شدن دگزامتازون و هیدروکورتیزون باعث افزایش اثر دگزامتازون بیشتر از میزان اثر فارماکولوژیک آن می‌گردد. زیرا دگزامتازون

References

1. Timothy et al. Drug's fact & comparisons. JB , Lippincott Co. 48th ed, 1994; pp: 235-250.
2. Reynold JEF, Prasad AB. Marthindale the extra pharmacopcia , 31th eds. the pharmaceutical press 1996;
3. Abbott BD, Predew GH, Buckalew AR, Birnbaoum LS. Interactive regulation of Ah and glucocorticoid receptors in the synergistic induction of cleft palate by 2, 3, 7, 8- tetrachlordibenzo-P -dioxin and hydrocortison. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 128:138-150.
4. Pavlik A, Novotna B, Jelinek R. Glucocorticoid receptor mediated teratogenesis and cell proliferation in the limbs and face of the chick embryo teratocarcin Mutagen. 1986; 6(5): 441-450.
5. Bartus F, Loskot J, Matuskova J. Effect of glucocorticoids on total protein and hydroxyproline content in the chick embryo. Folia Pharm 1988; 12: 95-107.
6. Barcellona PS, Compana A, Martino C. Interpecies differences in the embryotoxicity of different corticosteroids. Boll Chim Farm 1980; 119: 391-404.
7. Jelinek R, Peter M. Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. Indian J Exp Biol 1985; 23: 588-595.
8. Likovsky Z, Peterka M, Peterkova R. Drug-induced changes of RNA biosynthesis -A marker of toxic damage to embryonal cell population. Funct Der Morpol 1993; 34: 3-9.

9. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS. Glucocorticoid receptor IB, Mediator of anti-inflammatory and teratogenic function of both glucocorticoids and phenytoin. *Arch Biochem Biophys* 1985; 243(2): 385-390.
10. Gupta C, Katsumata M, Goldman As. H-2 histocompatibility region influence the inhibition of arachidonic acid cascade by dexamethasone and phenytoin in mouse embryonic palates, *J Craniofac Gene Dev Biol* 1985; 5(3): 277-285.
11. Poore KR, Young IR, Canny BJ, Thorburn GD. Studies on the role of Acth in the regulation of adrenal responsiveness and the timing of parturition in the ovine fetus. *J Endocrinol* 1998; 158(2): 161-171.
12. Lee JW, Iwatusur M, Nishigori H. Alternation of activities of hepatic antioxidant defence enzymes in developing chick embryos after glucocorticoid regulation of basal and vitamine D stimulated gene expression. *J Cell Biochem* 1998; 69(2): 154-168.
13. Beltiz HD, Grosch W. Food chemistry translation from the second German edition by Hadziyer D. Springer Verlag , Berline. 1986; pp:403-410.