

اثر حفاظتی مسنا در برابر سمیت ناشی از سیکلوفسفامید بر هیستومورفومتری جفت موش صحرایی

زهرا رضائی^۱، طیبه محمدی^{۲*}، محمود خاکساری مهابادی^۳، حسین نجف‌زاده‌ورزی^۴ و بابک محمدیان^۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۵

چکیده

سیکلوفسفامید دارویی رایج در شیمی درمانی است اما عوارض جانبی سمی داشته و از داروهای مختلف برای جلوگیری این اثرات جانبی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات محافظتی مسنا در برابر سمیت ناشی از سیکلوفسفامید در بافت جفت موش صحرایی می‌باشد. ۱۵ سر موش صحرایی آبستن به طور تصادفی در ۳ گروه قرار گرفتند: ۱) کنترل (سرم فیزیولوژی)، ۲) سیکلوفسفامید (۱۵mg/kg)، ۳) سیکلوفسفامید (۱۵mg/kg) و مسنا (۱۰۰mg/kg). داروها روز سیزدهم آبستنی تجویز و موش‌ها در روز بیستم آبستنی آسان‌کشی شدند. جفت‌ها جدا و در محلول فیکساتیو غوطه‌ور شدند. از جفت‌ها مقاطع ۵ میکرومتری تهیه و پس از رنگ‌آمیزی عمومی و اختصاصی با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. سیکلوفسفامید وزن و طول قطرهای جفت را کاهش داد. در سطح بافتی، موجب کاهش ضخامت لایه‌های لابیرنت و بازال، نکروز و پرخونی آن‌ها، کاهش تعداد سلول‌های غول‌پیکر و جمع‌شدگی هسته‌ی آن‌ها شد ($P < 0.05$). مسنا روی مورفومتری جفت نسبت به گروه سیکلوفسفامید اثر معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$) اما در سطح بافتی به طور معنی‌داری توانست ضخامت نواحی لابیرنت و بازال و تعداد سلول‌های غول‌پیکر را افزایش دهد ($P < 0.05$). همچنین توانست مانع از جمع‌شدگی هسته و نکروز سلول‌های غول‌پیکر و اسپانژیوتروفوبلاست در لایه‌ی بازال شود و پرخونی در ناحیه‌ی لابیرنت را کاهش دهد ($P < 0.05$). گروه‌های سولفیدریل مسنا احتمالاً با آکروئین (عامل اصلی سمیت سیکلوفسفامید) واکنش داده و آن را به ترکیبات غیرسمی تبدیل می‌کنند. مسنا بدین طریق ممکن است بافت جفت موش صحرایی را در برابر اثرات سمی سیکلوفسفامید محافظت کند.

کلمات کلیدی: مسنا، سیکلوفسفامید، هیستومورفومتری، جفت، موش صحرایی

مقدمه

با توجه به شیوع سرطان و نیاز به درمان این بیماری، امروزه انواع مختلفی از داروهای شیمی‌درمانی مانند سیکلوفسفامید، سیس‌پلاتین، وین‌کریستین و وین‌بلاستین استفاده می‌شود (Ghosh et al. 2002, Shalet and Howell 2001). سیکلوفسفامید دارویی پرمصرف در درمان سرطان است، در رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم اختلال ایجاد می‌کند (Khaksary Mahabady et al. 2011).

همچنین به عنوان یک داروی مهارکننده‌ی ایمنی برای جلوگیری از رد پیوند بیماران (Baumann and Preiss 2001) و درمان برخی از بیماری‌های پوستی، به ویژه خودایمنی و اختلال در سیستم ایمنی مفید است (Shreder et al. 2010). سیکلوفسفامید از جفت عبور می‌کند (Leal et al. 2003). جفت، نقش بسیار مهمی در رشد و نمو جنین ایفا می‌کند، متابولیسم و

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: t.mohammadi@scu.ac.ir

^{۲*} استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۳ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۴ استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۵ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

سیستم ایمنی استفاده می‌شود (Hardman and Limbird 2001). همچنین در کاهش ناهنجاری‌های جنینی ناشی از سیکلوفسفامید در موش صحرایی مؤثر است (Slot and Hales 1986). مرکاپتواتان سولفانات برای پیش‌گیری از التهابات خونریزی‌دهنده‌ی مثانه به میزان ۲۰ درصد مقدار مصرف داروی ضدسرطان هم زمان تزریق وریدی می‌شود (شهرزاد و غازیانی ۱۳۸۳) و در پیش‌گیری از سمیت هموراژیک ناشی از سیکلوفسفامید در موش صحرایی نیز مؤثر می‌باشد (Menetrey et al. 1999).

با توجه به مطالعات انجام شده در رابطه با اثرات مسنا در پیش‌گیری از برخی عوارض ناشی از سیکلوفسفامید، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی این دارو در برابر سمیت ناشی از سیکلوفسفامید بر بافت جفت موش صحرایی انجام گرفت.

مواد و روش کار

۱۵ سر موش صحرایی ماده و بالغ نژاد ویستار ۱۰-۱۲ هفته‌ای با میانگین وزنی 20 ± 200 گرم و ۵ سر موش صحرایی نر بالغ با همان نژاد و سن در قفس‌های سیمی و تحت شرایط نوری (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) در دمای اتاق (23 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد) و رطوبت ثابت (50 ± 10 درصد) برای حداقل یک هفته قبل از شروع انجام آزمایش به طور جداگانه نگهداری شدند و به غذا و آب به طور آزاد دسترسی داشتند. برای عمل جفت‌گیری، هر سه سر موش ماده با یک سر موش نر برای مدت ۱۲ ساعت در یک قفس نگهداری شدند و روز بعد جهت تأیید آبستنی موش‌های ماده از نظر وجود پلاک واژنی بررسی شدند. وجود پلاک واژنی به عنوان روز صفر آبستنی در نظر گرفته شد.

بعد از تأیید آبستنی همه‌ی موش‌های ماده، به طور تصادفی در ۳ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول (کنترل) در روز سیزده آبستنی هم‌حجم سیکلوفسفامید، سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی تجویز شد. گروه دوم (سیکلوفسفامید) در روز سیزده آبستنی

انتقال انواع مواد غذایی و مواد زائد، انتقال الکترولیت‌ها و تبادل گازهای تنفسی، تولید انواع هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌ها و اتصال جنین به دیواره‌ی رحم از مهم‌ترین وظایف جفت محسوب می‌شود (Emmanouil-Nikoloussi et al. 2008). تغییرات رشد و نمو و سقط جنین با اثر توکسیک تراژن‌ها روی جفت، محیط رحمی و در نهایت تعامل مادر و جنین از طریق جفت مرتبط است (Ishikawa et al. 2006). تجویز سیکلوفسفامید در دوران بارداری موجب تأخیر در رشد جنین، کاهش وزن جفت، کاهش طول بند ناف (De Lucia and Azoubel 2005) و تغییرات هیستوپاتولوژیک در جفت (Padmanabhan and Singh 1984) می‌شود. برای پیش‌گیری از عوارض و ناهنجاری‌های ناشی از سیکلوفسفامید، همراه آن از داروهای دیگر استفاده می‌کنند تا شاید بتوانند نقش حفاظتی داشته و تولید رادیکال‌های آزاد را کاهش دهند (محمدی و همکاران ۱۳۹۲).

برخی از عوارض سیکلوفسفامید از قبیل سمیت دستگاه ادراری به وسیله‌ی داروهای دارای گروه تیول از جمله سدیم ۲-مرکاپتواتان سولفانات (مسنا) بدون تأثیر در اثربخشی سیکلوفسفامید کاهش می‌یابد (Vieira et al. 2003).

مسنا (Mesna) یک متابولیت آلکیل‌کننده‌ی غیرفعال با شکل تیواتری است که وارد جریان خون می‌شود و فوراً به مسنا دی‌سولفید غیرفعال تبدیل می‌شود. دی‌مسنا در کلیه ترشح و فیلتر می‌شود و تحت تأثیر آنزیم‌های تیول-ترانسفراز و گلوکاتایون ردوکتاز احیا شده و به مسنا تبدیل می‌شود (Links and Lewis 1999). وزن ملکولی مسنا ۱۶۴/۱۸ کیلودالتون بوده و در گروه B داروهای مصرفی در زمان حاملگی قرار دارد. مسنا در پیش‌گیری از سمیت هموراژیک و سمیت کلیوی در بیماران تحت درمان با ایفوسفامید و سیکلوفسفامید مصرف می‌شود (منجمی ۱۳۸۱).

مسنا برای کاهش اثرات توکسیک سیکلوفسفامید در بیماران از جمله بیماران مبتلا به سرطان و اختلال در

در هر لام ۵ میدان دید میکروسکوپی به طور تصادفی با عدسی شیئی ۴× و ۱۰× و شمارش سلول‌های غول‌پیکر با عدسی شیئی ۱۰× و ۴۰× بود که با کمک نرم‌افزار Image J انجام شد.

نتایج با استفاده از نسخه‌ی شماره‌ی ۱۶ نرم‌افزار SPSS به صورت (میانگین \pm انحراف معیار) گزارش شد و توسط آزمون آماری ANOVA و پس آزمون LSD مورد ارزیابی قرار گرفت و تفاوت‌های با $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مورفولوژی و مورفومتری

جفت‌ها در گروه کنترل کاملاً سالم و به رنگ قرمز روشن بوده و هیچ‌گونه ناهنجاری نداشتند. در گروهی که سیکلوفسفامید را با دوز ۱۵ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن دریافت کردند از نظر مورفولوژی اندازه‌ی جفت کوچک و به رنگ قرمز تیره دیده شد و از لحاظ مورفومتری تجویز ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن سیکلوفسفامید موجب کاهش معنی‌دار وزن، ضخامت و طول قطر کوچک و بزرگ جفت نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/05$) (جدول ۱).

جفت گروه دریافت‌کننده‌ی سیکلوفسفامید و مسنا از نظر اندازه تقریباً مشابه گروه کنترل بود ولی از نظر رنگ در برخی نواحی دارای لکه‌های تیره‌تر بود و پرخون‌تر به نظر می‌رسید. بین میانگین وزن، ضخامت و طول قطر کوچک جفت در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی سیکلوفسفامید و سیکلوفسفامید و مسنا اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($P > 0/05$) و مسنا تنها روی طول قطر بزرگ جفت تا حدودی مؤثر بود که این هم به سطح معنی‌داری نرسید ($P > 0/05$) (جدول ۱). تجویز مسنا به همراه سیکلوفسفامید نتوانست از بروز تغییرات مورفومتریکی ناشی از سیکلوفسفامید پیش‌گیری کند.

سیکلوفسفامید (Boxter آلمان) به میزان ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (Slott and Hales 1987). گروه سوم مانند گروه دوم سیکلوفسفامید، به همراه مسنا (Boxter آلمان) با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد (Menetrey et al. 1999).

روز بیستم آبستنی تمام موش‌های مورد مطالعه با رعایت ملاحظات اخلاقی با کلروفورم آسان‌کشی شدند. پس از باز کردن محوطه‌ی شکمی و برش شاخ رحم، جفت‌ها به همراه جنین‌ها خارج و علاوه بر بررسی‌های دقیق ظاهری، به طور تصادفی از هر گروه ۵ نمونه جفت از نظر پارامترهای ماکروسکوپی شامل تغییرات وزن، قطر و ضخامت جفت‌ها مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت. جهت توزین جفت از ترازوی دیجیتال (GR-120, A & D, Japan) و برای اندازه‌گیری قطر و ضخامت جفت از کولیس (Mitutoyo, Kanagawa, Japan) استفاده گردید.

جهت مطالعات میکروسکوپی از هر موش صحرایی ماده در همه‌ی گروه‌ها، ۵ نمونه جفت از قسمت وسط شاخ رحم در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد فرمالین نمونه‌ها تعویض و جهت تهیه‌ی مقاطع بافتی به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل گردید. در آزمایشگاه به طور تصادفی از هر گروه ۵ بلوک تهیه و با استفاده از روش‌های متداول تهیه‌ی مقاطع بافتی، از هر بلوک ۳ برش به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) و پریودیک اسید شیف (PAS) قرار گرفت. مقاطع توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51) مورد مطالعه‌ی بافت‌شناسی قرار گرفتند و تصاویر بافت‌شناسی توسط دوربین دیجیتال (Olympus DP71) اخذ شد. مطالعات هیستومتری شامل اندازه‌گیری ضخامت ناحیه‌ی بازالی و لایبرنت و همچنین ناحیه‌ی دسیدوا که در همه‌ی گروه‌ها از هر نمونه ۳ لام و

جدول ۱: مقایسه میانگین \pm انحراف معیار وزن، قطر کوچک، قطر بزرگ و ضخامت جفت در گروه‌های کنترل، دریافت‌کننده

سیکلوفسفامید و سیکلوفسفامید + مسنا

گروه‌ها	کنترل	سیکلوفسفامید	سیکلوفسفامید + مسنا
وزن جفت (گرم)	۰/۵۰ \pm ۰/۰۱ ^b	۰/۴۰ \pm ۰/۰۱ ^a	۰/۳۸ \pm ۰/۰۲ ^a
قطر کوچک (میلی‌متر)	۱۱/۰۲ \pm ۰/۲۳ ^b	۹/۲۵ \pm ۰/۲۷ ^a	۹/۴۶ \pm ۰/۲۴ ^a
قطر بزرگ (میلی‌متر)	۱۴/۱۵ \pm ۰/۲۶ ^b	۱۱/۳۷ \pm ۰/۳۲ ^a	۱۲/۱۷ \pm ۰/۳۲ ^{ab}
ضخامت (میلی‌متر)	۳/۶۲ \pm ۰/۲۲ ^b	۲/۸۱ \pm ۰/۱۲ ^a	۲/۹۲ \pm ۰/۱۵ ^a

- حروف غیرمشابه در هر ردیف افقی بیان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

نتایج هیستولوژی و هیستومتری

دسیدوا در مقایسه با گروه کنترل بود ($P < 0/05$) (جدول ۲).

تجویز هم‌زمان مسنا با سیکلوفسفامید موجب پیش‌گیری از تغییرات ناشی از اثر سیکلوفسفامید شامل اندازه و تعداد سلول‌های غول‌پیکر، نکروز سلول‌های اسپانژیوتروفوبلاستی و کاهش پرخونی در ناحیه‌ی بازال نسبت به گروه سیکلوفسفامید شد (تصویر ۴ قسمت ۳). همچنین به طور معنی‌داری موجب افزایش ضخامت لایه‌ی بازالی (تصویر ۴)، افزایش ضخامت لایه‌ی لایرنت (تصویر ۱) و نیز کاهش ضخامت لایه‌ی دسیدوا در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سیکلوفسفامید شد (تصویر ۳) ($P < 0/05$).

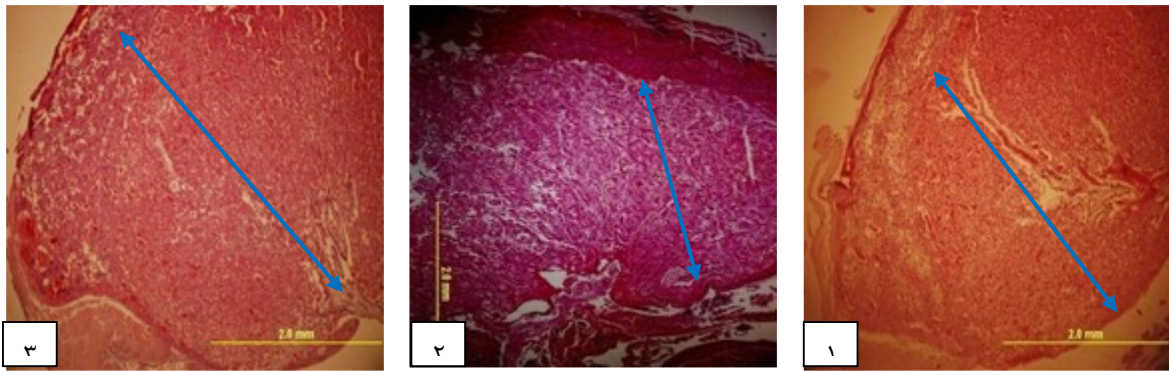
مطالعه‌ی بافت‌شناسی مقاطع جفت در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد، در گروه دریافت‌کننده‌ی سیکلوفسفامید تغییرات گسترده‌ای شامل جمع‌شدگی و کوچک شدن هسته‌های سلول‌های غول‌پیکر، نکروز شدید سلول‌های اسپانژیوتروفوبلاستی به صورت کوچک و تیره شدن هسته‌ی این سلول‌ها همراه با پرخونی (تصویر ۳ قسمت ۲)، پرخونی لایه‌ی لایرنتی، کوچک شدن سلول‌های تروفوبلاستی در ناحیه‌ی لایرنتی، همچنین نکروز سلول‌های تشکیل‌دهنده‌ی دسیدوا نسبت به گروه کنترل قابل مشاهده بود (تصویر ۳ قسمت ۲) و تغییرات هیستومتری شامل کاهش معنی‌دار ضخامت لایه‌های لایرنت، بازال و تعداد سلول‌های غول‌پیکر و افزایش ضخامت لایه‌ی

جدول ۲: مقایسه میانگین \pm انحراف معیار ضخامت لایه‌های لایرنت، بازالی و دسیدوا و تعداد سلول‌های غول‌پیکر جفت در گروه-

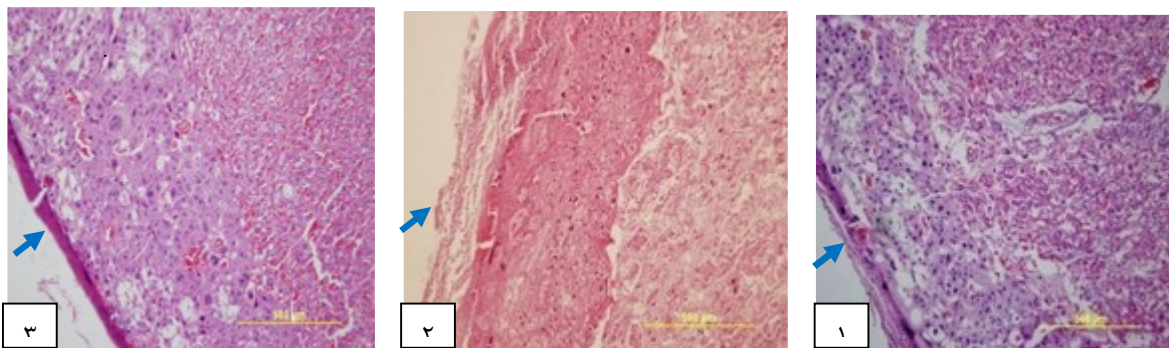
های کنترل، دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و سیکلوفسفامید + مسنا

گروه‌ها	کنترل	سیکلوفسفامید	سیکلوفسفامید + مسنا
ضخامت لایه لایرنت (میکرومتر)	۴۵۶/۱۴ \pm ۱۵/۶۳ ^b	۳۸۵/۷۳ \pm ۳۹/۸۱ ^a	۴۸۳/۷۶ \pm ۲۳/۲۸ ^b
ضخامت لایه اتصال (میکرومتر)	۹۶/۰۴ \pm ۳/۱۰ ^b	۷۲/۸ \pm ۳/۲۹ ^a	۱۲۰/۷۸ \pm ۵/۹ ^c
ضخامت لایه دسیدوا (میکرومتر)	۲۸/۸ \pm ۲/۵۱ ^a	۴۳/۱۲ \pm ۴/۸۲ ^b	۲۵/۰۲ \pm ۲/۵۲ ^a
تعداد سلول‌های غول‌پیکر	۵/۶۰ \pm ۰/۵۴ ^b	۲/۴۵ \pm ۰/۱۷ ^a	۷/۷۹ \pm ۰/۶۶ ^c

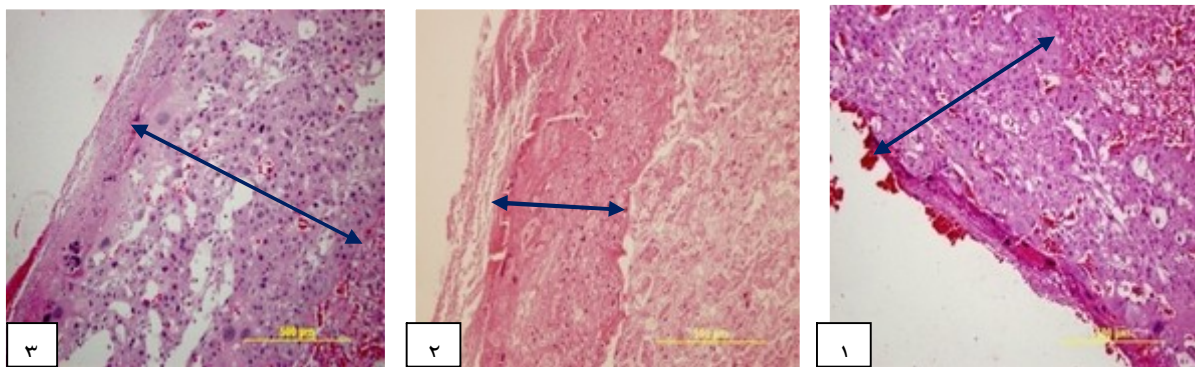
- حروف غیرمشابه در هر ردیف افقی بیان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.



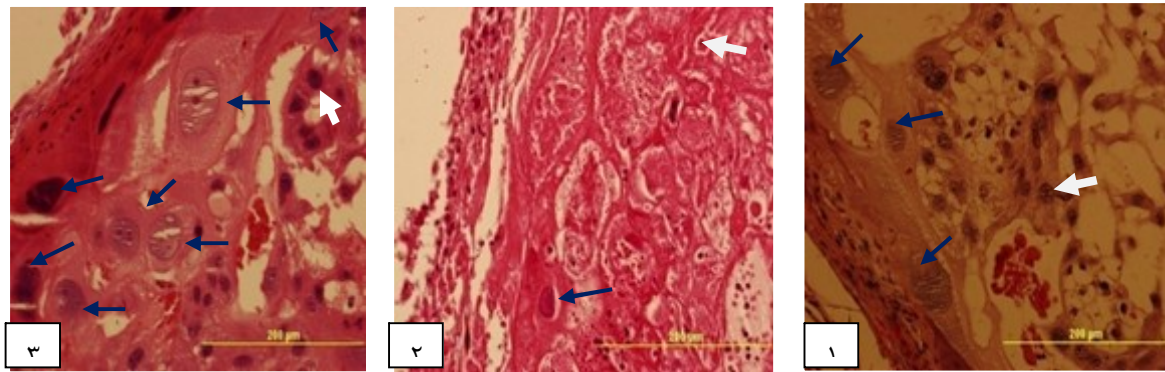
تصویر ۱: ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در این تصویر کاهش ضخامت لایه‌ی لایرننت (پیکان) در گروه سیکلوفسفامید (۲) نسبت به گروه کنترل (۱)، گروه سیکلوفسفامید + مسنا (۳) مشاهده می‌شود (H&E، ۴×).



تصویر ۲: ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در این تصویر افزایش مشخص دسیدوا (پیکان) در گروه سیکلوفسفامید (۲) نسبت به کنترل (۱)، سیکلوفسفامید + مسنا (۳) دیده می‌شود (H&E، ۱۰×).



تصویر ۳: ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در این تصویر کاهش مشخص لایه بازالی (پیکان) در گروه سیکلوفسفامید (۲) نسبت به کنترل (۱)، سیکلوفسفامید + مسنا (۳) دیده می‌شود (H&E، ۱۰×).



تصویر ۴: ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. سلول‌های اسپانژیوتروفوبلاست (پیکان سفید رنگ). در این تصویر افزایش تعداد سلول‌های غول‌پیکر (پیکان آبی رنگ) گروه کنترل (۱)، سیکلوفسفامید + مسنا (۳) نسبت به گروه سیکلوفسفامید (۲) مشاهده می‌شود ($\times 40$, H&E).

بحث

راه‌اندازی آپوپتوز شود (Oraby et al. 2010). بر همین اساس، قرار گرفتن در معرض سیکلوفسفامید تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش داده و سهم عمده‌ی تراتوژن بودن این دارو به مکانیسم ایجاد استرس اکسیداتیو برمی‌گردد (Chahoud et al. 2002, Das et al. 2002, Fantel 2009, Park et al. 1996).

Kim و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۷/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی در موش صحرائی موجب کاهش وزن جنین و جفت، افزایش جذب جنین‌ها و ناهنجاری‌های جنینی می‌شود. این محققین بیان کردند که قرار گرفتن در معرض سیکلوفسفامید تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ی دیگر علت را به متابولیسم مشتق شده از سیکلوفسفامید یعنی آکروئین مرتبط دانستند و بیان نمودند که آکروئین موجب القای استرس اکسیداتیو شده و منجر به آسیب DNA در سلول‌های سالم و اثر سمی روی اندام هدف می‌شود (Kim et al. 2014). De Lucia و Azoubel در سال ۲۰۰۵ طی مطالعه‌ای بیان نمودند که تجویز داخل صفاقی سیکلوفسفامید در روز دهم آستنی با دوز ۶ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش در مقایسه با گروه کنترل

نتایج هیستومورفولوژی و هیستومورفومتری مطالعه‌ی حاضر حاکی از آسیب جفت در گروه سیکلوفسفامید است. یافته‌های ما نشان داد که تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش صحرائی می‌تواند باعث تغییرات قابل توجهی در ساختار جفت شود. در این مطالعه، سیکلوفسفامید موجب افزایش معنی‌دار در ضخامت نواحی دسیدوا و کاهش معنی‌دار وزن، طول قطر و ضخامت جفت و نواحی لایرنت، بازال و تعداد سلول‌های غول‌پیکر نسبت به گروه کنترل شد که با پرخونی شدید و آسیب‌های سلولی هم‌چون نکروز نیز همراه بود ($P < 0.05$).

سیکلوفسفامید از جمله داروهای سیتوتوکسیک است که در کبد تحت تأثیر آنزیم‌های کبدی به متابولیت‌های فعال خود یعنی فسفرآمیدموستارد و آکروئین تبدیل می‌شود. فسفرآمیدموستارد مسئول خواص ضدسرطانی سیکلوفسفامید است اما آکروئین با تداخل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها و تولید مقدار زیادی رادیکال آزاد اکسیژن دارای خواص موتاژنی است. به این ترتیب می‌تواند به راحتی با ملکول‌های دیگر از جمله آنزیم‌ها، گیرنده‌ها، پمپ‌های یونی ترکیب شده و باعث اکسیداسیون مستقیم و غیرفعال کردن یا مهار عملکرد عادی آن‌ها (Senthilkumar et al. 2006) و در نتیجه

موجب کاهش وزن بدن جنین، کاهش میانگین وزن جفت و کاهش طول بند ناف جنین می‌شود. این محققین بیان نمودند که می‌توان این ناهنجاری‌ها را با تغییر در چرخه‌ی سلولی، بلوکه شدن میتوز و افزایش آپوتوز توضیح داد. تجویز مسنا با سیکلوفسفامید اگرچه روی مورفومتری بافت تأثیر معنی‌داری نداشت، اما در سطح میکروسکوپی موجب افزایش معنی‌دار ضخامت لایه‌ی لایبرنت، لایه‌ی بازال، تعداد و اندازه‌ی سلول‌های غول‌پیکر و کاهش ضخامت لایه‌ی دسیدوا و پرخونی نسبت به جفت حیوانات گروه سیکلوفسفامید شد. گروه‌های سولفیدریل مسنا به طور مستقیم با یک آکروئین دو بانده و متابولیت‌های یوروتوکسیک هیدروکسی-اکسازافسفرین ترکیب شده و آن‌ها را به ترکیبات غیرسمی مناسبی تبدیل می‌کنند (Hensley et al. 1999, Varzi and Mahabadi 2009).

Vieira و همکاران در سال ۲۰۰۳ تأثیر مسنا به همراه دگزامتازون را در کاهش سیستیت هموراژیک ناشی از ایزوفسفامید در موش صحرایی بررسی کردند و نشان دادند که مسنا در ترکیب فوق‌الذکر اثر مفیدی دارد.

Najafzadeh Varzi و Khaksari Mahabadi در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای بیان نمودند که تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز سیزدهم آبستنی موجب بروز ناهنجاری‌های جنینی شامل هیدروسفالی، امفالوسل، شکاف کام، شکاف چشم، براکیوگناتیاو آنومالی‌هایی در ستون مهره‌ها، جناغ سینه و کتف و نقص در اندام‌های انتهایی بدن و کاهش معنی‌دار وزن و طول بدن جنین گردید و تجویز مسنا به همراه سیکلوفسفامید توانست درصد بروز هیدروسفالی، اگزونسفالی، شکاف کام و امفالوسل را کاهش دهد و به

طور معنی‌داری مانع از کاهش وزن و طول بدن ناشی از سیکلوفسفامید گردد. Hales و Slott در سال ۱۹۸۶ مشاهده نمودند که تجویز سیکلوفسفامید در موش صحرایی در روز سیزدهم آبستنی می‌تواند در جنین ناهنجاری‌هایی ایجاد کند و تجویز مسنا در مقایسه با گروه کنترل نه تنها ناهنجاری ایجاد نکرد بلکه توانست ناهنجاری‌های خارج جنینی ناشی از سیکلوفسفامید شامل ناهنجاری‌های اسکلتی، نقص در اندام‌های انتهایی بدن، ادم، هیدروسفالی، امفالوسل و شکاف کام و چشم را به طور معنی‌داری کاهش دهد، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. Song و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان نمودند که ویتامین C و مسنا اثر محافظتی و درمانی قوی علیه التهاب خون‌ریزی دهنده‌ی مثانه ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید را دارند.

در مطالعه‌ی حاضر برای نخستین بار به بررسی اثر مسنا روی بافت جفت و نقش آن در مهار سمیت ناشی از سیکلوفسفامید روی این ارگان پرداخته شد و مشاهده گردید که مسنا به طور معنی‌داری می‌تواند از کاهش ضخامت لایه‌ی لایبرنت و لایه‌ی بازال، تعداد و اندازه‌ی سلول‌های غول‌پیکر و افزایش ضخامت لایه‌ی دسیدوا ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید در جفت پیش‌گیری کند. در مجموع، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که احتمالاً مسنا به خاطر داشتن گروه‌های سولفیدریل، باند شدن مستقیم آن‌ها با آکروئین و تبدیل آن به متابولیت‌های بی-خطر می‌تواند از جفت در برابر آسیب‌های ناشی از سیکلوفسفامید در جفت تا حدودی محافظت کند. با این حال درک بهتر این فرایندها نیازمند مطالعات تکمیلی بیش‌تری است.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه از محل اعتبارات گرنت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده که بدین وسیله از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه قدردانی می‌گردد.

منابع

- mice placentae. *Reproductive Toxicology*, 26(1): 61-61.
- Fantel, A.G. (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology*, 53(3): 196-217.
- Ghosh, D.; Das, U.B.; Ghosh, S.; Mallick, M. and Debnath, J. (2002). Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chemical Toxicology*, 25(3): 281-292.
- Hardman, J.G.; Limbird, L.E. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (2001). 10thed. McGraw-Hill Co, Pp: 333-335.
- Hensley, M.L.; Schuchter, L.; Lindley, C.; Meropol, N.; Cohen, G.; Broder, G. et al. (1999). American society of clinical oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *Journal of Clinical Oncology*, 17(10): 3333-3355.
- Howell, S.J. and Shalet, S.M. (2001). Testicular function following chemotherapy. *Human Reproduction Update*, 7(4): 363-369.
- Ishikawa, H.; Seki, R.; Yokonishi, S.; Yamauchi, T. and Yokoyama, K. (2006). Relationship between fetal weight, placental growth and litter size in mice from mid-to late-gestation. *Reproduction Toxicology*, 21(3): 267-270.
- Khaksary Mahabady, M.; Najafzadeh Varzi, H. and Bakhtiari, E. (2011). The effects of cyclophosphamide, melatonin and carvedilol on neural tube and skeletal system of mice fetuses in prenatal period. *Annals of Anatomy*, 193(5): 459-465.
- Kim, S.H.; Lee, I.C.; Lim, J.H.; Moon, C.; Bae, C.S.; Kim, S.H. et al. (2012). Protective effects of pine bark extract on developmental toxicity of cyclophosphamide in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2): 109-115.
- Kim, S.H.; Lee, I.C.; Baek, H.S.; Moon, C.; Kim, S.H.; Yoo, J.C. et al. (2014). Induction of cytochrome P450 3A1 expression by diallyl disulfide: protective effects against cyclophosphamide-induced embryo-fetal developmental toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 69: 312-319.
- شهرزاد، سعید و غازیانی، طاهره (۱۳۸۳). ایران فارما، درسنامه جامع داروهای سمی ایران، موسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده، نشر طیب، چاپ دوم، صفحات ۱۹۴-۱۹۷.
- محمدی، فروزان؛ نیکزاد، حسین؛ تقی‌زاده، محسن و مروجی، علیرضا (۱۳۹۲). اثر رژیم غذایی حاوی عصاره‌ی تخم کدو بر روی بیضه و پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با سیکلوفسفامید، مجله علمی پژوهشی فیض دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دوره ۱۷، شماره ۵، صفحات ۴۳۸-۴۴۶.
- منجمی، علی (۱۳۸۱). فارماکولوژی پایه و بالینی کاتزونگ ۲۰۰۱، تألیف: برترام کاتزونگ. چاپ اول، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده، نشر طیب، صفحات ۳۱۷ و ۷۵۵.
- Baumann, F. and Preiss, R. (2001). Cyclophosphamide and related anticancer drugs. *Journal of Chromatography. Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*. 764(1): 173-192.
- Chahoud, I.; Kuriyama, S.N. and Paumgarten, F.J. (2002). Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats. *Toxicology*, 179(1): 137-149.
- Das, U.B.; Mallick, M.; Debnath, J.M. and Ghosh, D. (2002). Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian journal of andrology*, 4(3): 201-207.
- De Lucia, M.B.I. and Azoubel, R. (2005). Cyclophosphamide effects on the epithelial covering of rats fetus's tongue. A Morphometric Study. *International Journal Morphology*, 23(2): 105-109.
- Emmanouil-Nikoloussi, E.N.; Nikoloussis, E.; Likartsis, C. and Goula, O.C. (2008). Placenta blood barrier and retinoids: Histological and immunohistochemical (HSPs) study in Balb/C

- Leal, O.; Leal, E.A.S.; Borges Junior, F.R.; Paez, M L.T.; Teodósio, S. and Tavares-Neto, J. (2003). Clinical-parasitological response to treatment with quinine associated to doxycycline in uncomplicated falciparum malaria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(6): 751-754.
- Links, M. and Lewis, C. (1999). Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs*; 57(3): 293-308.
- Menétray, D.; Bon, K.; Michiels, J.F. and Lantéri-Minet, M. (1999). The uroprotection of mesna on cyclophosphamide cystitis in rats. Its consequences on behaviour and brain activities. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 322(6): 505-515.
- Najafzadeh Varzi, H. and Khaksari Mahabadi, M.K. (2009). A comparison study of the effects of *Echinacea purpurea* ethanolic extract and mesna on cyclophosphamide-induced macroscopic fetal defects in rats. *Iranian Journal of Medical Sciences*; 12(1):61-6.
- Oraby, H.A.S.; Hassan, A.A.M. and Maaty, N.A.A. (2010). Effect of cyclophosphamide on transcription of SOD1 mRNA and GPX1 mRNA in mice liver and brain tissues. *Journal of Applied Biosciences*, 29: 1736-1742.
- Padmanabhan, R. and Singh, S. (1984). Histopathological changes of placenta induced by cyclophosphamide in rats. *Congenital Anomalies*, 24(1): 1-8.
- Park, D.; Jeon, J.H.; Shin, S.; Joo, S.S.; Kang, D.H.; Moon, S.H. et al. (2009). Green tea extract increases cyclophosphamide-induced teratogenesis by modulating the expression of cytochrome P-450 mRNA. *Reproductive Toxicology*, 27(1): 79-84.
- Senthilkumar, S.; Yogeeta, S.K.; Subashini, R. and Devaki, T. (2006). Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chemico-Biological Interactions*, 160(3): 252-260.
- Shreder, O.V.; Shreder, E.D.; Durnev, A.D. and Seredenin, S.B. (2010). Association of genotoxic and teratogenic effects induced by cyclophosphamide and their modification with afobazol. *Gigiena i Sanitariia*, (5): 64-68.
- Slott, V.L. and Hales, B.F. (1986). Sodium 2-mercaptoethane sulfonate protection against cyclophosphamide-induced teratogenicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82(1): 80-86.
- Slott, V.L. and Hales, B.F. (1987). Enhancement of the embryotoxicity of acrolein, but not phosphoramidate mustard, by glutathione depletion in rat embryos in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 36(12): 2019-2025.
- Song, J.; Liu, L.; Li, L.; Liu, J.; Song, E. and Song, Y. (2014). Protective effects of lipoic acid and mesna on cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. *Cell Biochemistry and Function*, 32(2): 125-132.
- Varzi, H.N.; Mahabadi, M.K. (2009). A comparison study of the effects of *Echinacea purpurea* ethanolic extract and mesna on cyclophosphamide-induced macroscopic fetal defects in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 12(1): 61-66.
- Vieira, M.M.; Brito, G.A.C.; Belarmino-Filho, J.N.; Macedo, F.Y.B.; Nery, E.A.; Cunha, F.Q. et al. (2003). Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. *International Journal of Urology*, 10(11): 595-602.

Mesna protective effect against cyclophosphamide toxicity on histomorphometry of rat placenta

Rezaei, Z.¹; Mohammadi, T.²; Khaksary Mahabadi, M.³; Najafzadeh Varzi, H.⁴ and Mohammadian, B.⁵

Received: 24.04.2016

Accepted: 13.02.2017

Abstract

Cyclophosphamide is a common chemotherapeutic medicine but it has toxic side effects. Different medicines are used to prevent its side effects. The aim of this study is evaluation of the protective effects of Mesna against cyclophosphamide toxicity in rat placenta tissue. Fifteen pregnant rats were randomly divided into 3 groups (1) control (normal saline), (2) cyclophosphamide (15 mg/kg), (3) cyclophosphamide (15mg/kg) and Mesna (100mg/kg). Medicines were administered intraperitoneally on the 13th day of pregnancy. Rats were sacrificed on the 20th day. The placentae were separated and floated in fixative solution. Five μ m placental tissue sections were prepared and after staining generally and specially they were studied by light microscopy. Cyclophosphamide decreased placental weight and diameters ($P<0.05$). Histologically, it induced labyrinth and basal layers thickness reduction ($P<0.05$) their necrosis and congestion, giant cell number reduction ($P<0.05$) and their nuclear shrinkage. Mesna has no effect on placental morphometry rather than cyclophosphamide ($P>0.05$) but histologically, increased labyrinth and basal layers thickness and giant cells number ($P<0.05$). It also prevented nuclear shrinkage and necrosis in giant cells and spongiotrophoblasts in the basal layer and reduce congestion in the labyrinth layer ($P<0.05$). Mesna sulfhydryl groups possibly react with acrolein, the major factor of cyclophosphamide toxicity, and change it to nontoxic compounds. Mesna may protect rat placental tissue against cyclophosphamide toxic effects by this mechanism.

Key words: Mesna, Cyclophosphamide, Histomorphometry, Placenta, Rat

1- MSc Student of Histology and Embryology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Associated Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

5- Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Mohammadi, T., E-mail: t.mohammadi@scu.ac.ir