



بررسی اثر تک دوز تراتوزنیک والپروئیک اسید بر غلظت روی موجود در پلاسما در موشهای صحرایی ماده

مرتضی ابوذری پور^{۱*}، دکتر محمد بربرستانی^۲، دکتر پریچهر پاسبخش^۳، دکتر شهریار غریب‌زاده^۴

چکیده

- **مقدمه:** والپروئیک اسید داروی ضد صرع و ضد تشنج شناخته شده‌ای است که ناهنجاری‌های بالقبه آن در ایجاد نقایص لوله عصبی به اثبات رسیده است و در صورت تماس با این دارو در طی هفته‌های اول بارداری بروز نقایص فوق ۲-۱٪ افزایش می‌یابد. میل ترکیبی این دارو در اتصال به روی و بروز بالای نقایص لوله عصبی در مناطقی از جهان که مبتلا به نقصان روی هستند موجب گردید برای تعیین مکانیسم احتمالی والپروئیک اسید در ایجاد این نقایص به بررسی اثر این دارو بر غلظت پلاسمایی روی در رت‌های ماده پردازیم.
- **مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی از دو گروه استفاده شد. هر گروه شامل ۶ موش صحرایی ماده از نژاد آلبینو با وزن ۲۵۰ گرم بود که تحت شرایط یکسان محیطی و تغذیه‌ای قرار داشتند و به روش تصادفی انتخاب شده بودند. تک دوز تراتوزنیک والپروئیک اسید را با دوز ۳۵۰ mg/kg به روش داخل صفاقی به رت‌های گروه تجربی تزریق کرده و رت‌های گروه کنترل نیز نرمال سالین را با دوز ۴ ml/kg دریافت کردند. غلظت روی پلاسما توسط دستگاه جذب اتمی سنجیده شد و مقایسه توسط روش آماری t-test صورت گرفت، سپس برای تأیید نتایج از تست من ویتنی‌یو استفاده شد.
- **یافته‌ها:** میانگین روی پلاسما در گروه تجربی (۲۷/۹۶±۲/۲۳)، پایین‌تر از گروه کنترل (۴۲/۲±۰/۵۷۹) بود (p=۰/۰۰۰ و t=۱۵/۱۴).
- **نتیجه‌گیری:** والپروئیک اسید موجب کاهش سطح روی در پلاسما می‌گردد که این را می‌توان به عنوان یکی از مکانیسم‌های ایجاد کننده نقایص لوله عصبی توسط والپروئیک اسید دانست.
- **واژه‌های کلیدی:** والپروئیک اسید، نقایص لوله عصبی، روی، پلاسما

*- کارشناس ارشد آناتومی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، خیابان پاسداران، سندیج، مؤلف مسؤول

۲- دانشیار آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دانشیار آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- استادیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

بروز نقایص لولۀ عصبی نیز حدود ۱/۳ مورد در هر ۱۰۰۰ تولد زنده گزارش شده است (۶).

دو فرم نسبتاً شایع نقایص لولۀ عصبی اسپینابیفیدا (Spinabifida) و انسفالی (Encephaly) هستند که به ترتیب ناشی از نقص در بسته شدن نوروپور خلفی و قدامی لولۀ عصبی در دوره رویانی می‌باشند.

برای درک مکانیسم اثر تراژونیک والپروئیک اسید مطالعات متنوعی صورت گرفته است، در مطالعه‌ای در رت‌های تحت درمان طولانی با والپروئیک اسید (VPA) سطح روی و سلنیوم پلازما کاهش یافته بود (۷)، به علاوه با تحقیقات متعددی معلوم گشت که (VPA) بسهولت با روی باند می‌گردد (۸) لذا مصرف والپروئیک اسید موجب کاهش روی می‌گردد که خود بسیار ناهنجاری‌زا می‌باشد. ناهنجاری‌هایی که همراه با مصرف والپروات و کمبود روی (Zn) در هنگام تولید مثل گزارش شده است شامل نقایص لولۀ عصبی، تکامل ناقص دنده‌ها، کوچکی چانه (Micrognathia)، چسبیدگی یا فقدان انگشتان و کاهش وزن مغز می‌باشد (۹).

طبق گزارش Sever & Emmanule به دلیل بروز بالای این آنومالی‌ها در مناطقی از جهان که نقصان روی وجود دارد به نظر می‌رسد بین نقایص لولۀ عصبی و نقصان روی مادری

والپروئیک اسید یک داروی ضد تشنج و ضد صرع است که در درمان حملات ساده یا کمپلکس صرع، حملات چندگانه صرع از جمله صرع کوچک و حملات میوکلونیک مصرف می‌گردد (۱).

مکانیسم دقیق ضد تشنجی این دارو ناشناخته است ولی ممکن است سطح نوروترانسمیتر گابا را در مغز افزایش دهد. از دیگر مکانیسم‌های احتمالی آن می‌توان اثر بر روی گیرنده‌های پس سیناپسی برای تقلید یا افزایش اثر مهاری گابا، مهار آنزیمی که موجب کاتابولیز گابا می‌گردد، اثر بر روی پمپ پتاسیم و یا اثر مستقیم بر روی ثبات غشاء سلولی را ذکر کرد (۲).

تقریباً ۹۰٪ از این دارو به پروتئینهای پلازما متصل می‌شود، سپس در کبد متابولیزه شده و متابولیت غیر فعال آن از طریق ادرار دفع می‌گردد، البته مقادیر جزئی از آن ممکن است از راه مدفوع دفع گردد.

تراژون بودن اسیدوالپروئیک که یکی از بارزترین اثراتش شامل نقایص لولۀ عصبی در انسان است، ثابت گردیده است (۳).

طبق آمار ایالات متحده آمریکا از زنان مبتلا به صرع حدود یک میلیون نفر هر ساله باردار می‌شوند (۴) که از بین آنها ۷۰۰-۱۰۰۰ نفر والپروئیک اسید دریافت می‌دارند (۵).

بالای نقایص لولۀ عصبی در مناطقی از جهان که مادران مبتلا به نقصان روی هستند و نیز نتایج حاصل از تحقیقات متعدد در مورد رابطه والپروئیک اسید و روی موجب گردید بسیاری کشف مکانیسم احتمالی والپروئیک اسید به بررسی سطح روی (Zinc) پلاسما پردازیم.

مواد و روشها

در این تحقیق از موشهای صحرایی نژاد آلبینو (Albino) استفاده شد. این حیوانات که به روش کاملاً تصادفی انتخاب شده بودند، در محیطی با درجه حرارت ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبتی به میزان ۶۰-۵۰ درصد با سیکل روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. تغذیه موشها از غذای آماده شده و استاندارد شرکت پارس و از آب لوله کشی شهری بود.

موشهای انتخاب شده دارای وزن ۲۵۰ گرم بودند، که در ۲ گروه ۶ تایی درون قفسهای مخصوص نگهداری می شدند.

گروه اول گروه کنترل بوده نرمال سالین را با دوز (۴ ml/kg) و گروه دوم گروه تجربی بوده والپروئیک اسید را با دوز ۳۵۰ mg/kg به روش داخل صفاقی دریافت می کردند.

۲۴ ساعت پس از تزریقات، موشها به روش گردن زدن ساکریفای^۱ شده، خون لازم برای تهیه پلاسما درون

رابطه ای وجود داشته باشد. به علاوه گزارش نقایص لولۀ عصبی در نوزادانی که مادرانشان مبتلا به آکرودرماتیت انتروپاتییک (Acrodermatitis enteropathica) بوده اند رابطه بین این نقایص و روی را بیشتر توجیه می نماید (۱۰).

با توجه به نتایج این دو محقق، قبول هر دو یافته ناهنجاری زایی و عوارض جانبی والپروئیک اسید و همچنین کمبود روی ایمن فرضیه را حمایت می کند که مشکلات ناشی از تجویز والپروئیک اسید ممکن است از طریق تغییر در سطح روی پلاسما حادث شده باشد.

کاهش سطح روی در پلاسما نیز با مکانیسم های مختلف می تواند ایجاد کننده نقایص جنینی باشد.

مطالعات نشان داده اند که کمبود روی در حیوانات موجب از بین رفتن اتصال تیمیدین به DNA می گردد و کمبود روی ممکن است به عنوان یک واسطه موجب تخریب بیوسنتز DNA گردد، از طرفی در سال ۱۹۶۳، Liberman و همکارانش گزارش کردند که چندین آنزیم مورد نیاز جهت سنتز اسید نوکلئیک در میکروارگانیسم ها به روی نیازمند است (۱۱).

مجهول بودن مکانیسم اثر والپروئیک اسید در ایجاد نقایص لولۀ عصبی، ریسک بالای این نقایص، بروز

1- Sacrifice

نموده و میزان جذب ناشی از آن توسط دستگاه جذب اتمی اندازه گیری می‌شد.

چنانچه این میزان با جذب خوانده شده توسط بلانک یکی بود، ظروف مورد استفاده قرار می‌گرفت، در غیر این صورت شستشو تکرار می‌شد.

تهیه منحنی استاندارد روی: پس از آماده سازی ظروف و وسایل لازم، با استفاده از یک گرم پودر روی، استاندارد ۱۰۰۰ ppm روی با کمک آب دیونیزه و اسید کلریدریک ساخته شد. به کمک این استاندارد، استانداردهای کاری ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ ساخته شدند. آب دیونیزه دو بار تقطیر شده به عنوان بلانک انتخاب گردید.

هر کدام از استانداردها سه بار و هر بار ۵ میکرو لیتر بطور جداگانه به داخل کوره دستگاه جذب اتمی تزریق می‌گشت. در صورتی که اختلاف سه پیک (Peak) حاصله بیشتر یا مساوی ۱۰٪ بود برای بار چهارم یا پنجم تزریق تکرار می‌شد. پس از اندازه گیریهای مکرر مشخص شد که منحنی کالیبراسیون روی تنها در محدوده حداکثر تا ۴۰ ppb خطی می‌باشد.

قبل از تزریق استانداردها به داخل کوره برنامه پنج سیکل حرارتی به دستگاه داده می‌شد. این پنج سیکل حرارتی شامل: خشک کردن، خاکستر کردن، تمییزه کردن نمونه و پاک کردن و سرد کردن کوره گرافیتی

لوله‌های آزمایش جمع آوری شده و توسط دستگاه سانتریفوز پلاسما آن جدا گردید. پلاسما توسط Samplerهای اپندروف جدا شد و درون کاپ‌های اپندروف ریخته شد و تا زمان آزمایش بعدی در درجه حرارت منهای ۷۲ درجه سلسیوس نگاهداری گشت.

در این تحقیق برای مقایسه نتایج از روش آماری t-test استفاده شد، سپس برای مقایسه میانگین‌ها از تست من‌ویتنی یواستفاده گردید.

روش اندازه گیری روی: اندازه گیری روی در پلاسما به روش Henkin و همکارانش (۱۲) و توسط دستگاه جذب اتمی بدون شعله با مدل شیمادزو صورت گرفت. تمامی ظروف مورد استفاده قبلاً به دقت شسته شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۲ درصد اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) قرار می‌گرفت، جهت پاک شدن مقادیر احتمالی روی ظرف‌ها به مدت چندین ساعت در آب دیونیزه و نهایتاً در ظرف حاوی محلول اسیدنیتریک ۰/۲ درصد قرار می‌گرفتند. پس از این عمل ظروف ۵ بار توسط آب دیونیزه شستشو داده می‌شدند.

در خاتمه جهت کسب اطمینان کامل مبنی بر اینکه هیچ گونه آلودگی در ظروف شستشو داده شده وجود ندارد، پس از آخرین شستشو مقداری آب دیونیزه وارد هر کدام از ظروف

و نوع افزایش درجه حرارت
Step/Ramp آمده است.

می باشد که بطور خلاصه در جدول
(شماره ۱) شرایط دستگاهی هر مرحله
شامل درجه حرارت، زمان، جریان گاز

جدول شماره ۱: سیکل های حرارتی مورد استفاده جهت اندازه گیری نمونه ها و استانداردهای روی

مرحله	درجه حرارت (سلیسیوس)	زمان (ثانیه)	وضعیت دستگاه (Step/Ramp)	جریان گاز (لیتر در دقیقه)
خشک کردن	۱۵۰	۳۰	S	۱/۵
خاکستر کردن	۳۰۰	۲۰	S	۱/۵
اتمیزه کردن	۱۳۰۰	۳	S	۰
پاک کردن	۲۵۰۰	۲	S	۱/۵
سرد کردن	۰	۴۰	S	۱/۵

جدول شماره ۳: غلظت (ppb) روی پلازمای
نمونه های گروه تجربی

شماره نمونه	جذب اتمی (ABS)	غلظت روی
۱	۰/۸۰۹	۲۲/۵۳۸
۲	۰/۷۸۹	۲۹/۴۴۹
۳	۰/۸۰۶	۲۷/۹۷۵
۴	۰/۸۶۴	۲۹/۲۲۴
۵	۰/۸۱۳	۲۸/۵۰۱
۶	۰/۷۸۸	۲۹/۱۰۲

جدول شماره ۴: تغییرات غلظت روی موجود در پلازما
در مقایسه با گروه کنترل

گروه	تعداد	میانگین حسابی	انحراف معیار	میانگین رتبه ای
کنترل	۶	۴۲/۲	۰/۵۷۹	۹/۵
تجربی	۶	۲۷/۹۶	۲/۲۳	۳/۵

$$p=۰/۰۰۴$$

غلظتها با واحد ppb می باشند ولی از آنجایی
که مجبور به رقیق کردن نمونه ها به میزان ۲۰
برابر شدیم برای تعیین غلظت واقعی
(Actual Concentration) هر یک از نمونه ها باید
عدد حاصله را در ۲۰ ضرب نماییم که البته در
مقایسه دو گروه تغییری ایجاد نخواهد کرد.

گاز مورد استفاده در این دستگاه، آرگون با
درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ بود. میزان جریان گاز
۱/۵ لیتر در دقیقه تنظیم شد. لازم به ذکر است که
جهت جلوگیری از به هدر رفتن نمونه، میزان
جریان گاز در مرحله اتمیزه شدن صفر بود. از
لامپ دوتریوم نیز جهت تصحیح زمینه استفاده
می شد. طول موج انتخابی نیز همان طول موج
مربوط به روی یعنی ۲۱۳/۹ نانومتر (nm) بود.

یافته ها

غلظت روی موجود در پلازمای نمونه ها طبق
جدول زیر بدست آمد:

جدول شماره ۲: غلظت (PPb) روی پلازمای نمونه های

شماره نمونه	جذب اتمی (ABS)	غلظت روی
۱	۱/۰۲۷	۴۲/۵۹۳
۲	۱/۰۴۵	۴۱/۵۰۰
۳	۱/۱۷۵	۴۲/۷۲۵
۴	۱/۰۹۶	۴۲/۹۰۰
۵	۱/۱۲۱	۴۱/۷۲۵
۶	۱/۱۲۱	۴۱/۹۷۵

بحث

تراوتونیسیتی بالقوه والپروئیک اسید با بارزترین اثراتش شامل نقایص لوله عصبی در مقالات متعددی شرح داده شده است (۱۵-۱۳)، اما تا به حال مکانیسم اثر تراوتونیسیتی آن مجهول باقی مانده است. Hurd RW و همکارانش در سال ۱۹۸۱ عنوان کردند که VPA به سهولت با روی باند می‌گردد (۸)، در سال ۱۹۸۴ نیز Daffron JC, Kasarkis EJ بنا تریق دوزهای مختلف والپروئیک اسید ($700 \text{ mg/kg} \times 7 \text{ day}$)، 500 mg/kg ، 100 mg/kg به رت به این نتیجه رسیدند که در مقایسه با گروه کنترل میزان روی پلاسما کاهش قابل توجهی داشته است (۱۶). لازم به ذکر است که، کاهش سطح روی (Zn) پلاسما توسط VPA بوسیله محققین متعددی به اثبات رسیده است (۱۷، ۱۸)، به علاوه با تحقیقات متعددی معلوم گشته است که عوارض جانبی درمان با والپروئیک اسید، آنورکسیا (Anorexia) بانکراتیت (Hyperammonaemia, Pancreatitis) و هپاتوتوکسیسیتی در نقصان روی نیز دیده شده است (۷، ۸). در حیوانات، کاهش سطح روی در پلاسما مادری که توسط محدودیت رژیمی ایجاد گشته است موجب دیس مورفوژنهای بیشتری شده است که اعضاء سیستم‌های مختلف بدن و خصوصاً سیستم عصبی مرکزی را تحت

تأثیر قرار می‌دهد. در موش‌های صحرایی این نقصان روی موجب نقایص لوله عصبی شامل هیدروسفالی، انسفالو و اسپینایفیدا گشته است (۱۹). از آن جایی که روی نقش مهمی در رشد و تکامل دارد و برای تکامل نرمال رویانی یک عنصر ضروری است و در بسیاری از واکنشهای بیوشیمیایی شرکت می‌کند و از اجزاء بیش از ۲۰۰ سیستم آنزیمی است (۲۰)، ما در این تحقیق به بررسی رابطه بین والپروئیک اسید و غلظت روی پلاسما پرداختیم. بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که کاهش سطح روی در پلاسما نمونه‌های گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل می‌تواند مکانیسم اثر احتمالی والپروئیک اسید در ایجاد نقایص لوله عصبی را توجیه نماید. زیرا روی نقش مهمی در تکامل رویانی ایفا می‌نماید، که به تفصیل به آن اشاره شد.

و آیا می‌توان با تجویز روی مکمل از اثرات تراوتونیک والپروئیک اسید ممانعت به عمل آورد؟ شاید با مطالعات دیگر بتوان به این سؤال پاسخ داد.

قدردانی و تشکر: بدینوسیله از سرکار

خانم هوشیاری از گروه آناتومی و جناب آقایان احدی و سوهانکی از گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران سپاسگزاری می‌گردد.

References:

1. Davis. R, Peters.D.H and Mc Taris D.B. Valproic acid a reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. Drug J 1994, 47: 332-372.
۲. اکبرزاده پاشا، حجت‌اله. راهنمای کلینیکی داروها. تهران: بهرام، ۱۳۷۲.
3. Jager-Roman.E, Deichl.A, Jacob.s. Fetal growth major malformations and minor anomalies in infants born to women receiving valproic acid. Pediatr J 1996, 108: 997-1004.

4. Gary Cunningham F., Norman F, Gant Kenneth J. Williams obstetrics. 20th ed. Mcgraw-hill, 1997:1098-1099.
5. Robert.E: International notes valproic acid and spinabifida. Congenital Anomalies J 1998, 28: 71-80.
6. Garcia-morales-MA, Limon-luque-LM. Periconception use of folic acid in the prevention of neural tube defect. Gynecol Obstet Mex J 1996, 64: 418-421.
7. Hurd.RW, Wilder.BJ. Effects of valproic acid on zinc and selenium status. Neurosci Abstr J 1982, 8: 353.
8. Hurd.RW, Wilder.BJ. Zinc binding by valproic acid. Neurosci Abstr J 1981, 7: 813.
9. Nau.H, Zierr.R. A new model for embryotoxicity testing: teratogenicity and pharmacokinetics of valproic acid following constant rate administration in the mouse. Life Sci J 1981, 29: 2803-14.
10. Sever.LE, Emmanule.I. Is there a connection between maternal zinc deficiency and congenital malformations of the central nervous system. Teratology J 1973, 7: 117-118.
۱۱. منفرد، جان محمد. ارزیابی سمیت کلیوی جنتامایسین با اندازه گیری روی و مس در بزاق و سرم. پایان نامه دوره دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی تهران، ۱۳۷۲.
12. Henkin R.I, Muller C.W and Wolf R.O. Estimation of zinc absorption of parotide salivary flameless atomic absorption spectrophotometry in normal subjects and patients with idiopathic hypigeosia. Lab Clin J 1973, 86: 175.
13. Dalens B, Raynaud EJ, Gaulme J. Teratogenicity of valproic acid. Pediatr J 1973, 97: 332-33.
14. Gomes MR. Possible teratogenicity of valproic acid. Pediatr J 1981, 98: 508-509.
15. Clay SA, McVieR, Chen H. Possible teratogenic effect of valproic acid. Pediatr J 1981, 99: 828.
16. Daffron JC, Kasarkis EJ. Effect of valproic acid on zinc metabolism in the rat. Toxicol Lett J 1984, 23: 321-5.
17. Keen CL, Peters JM, and Hurly LS: The effect of valproic acid on 65zn distribution in the pregnant rat. Nutr J 1989, 119 (4): 607-11.
18. Kusuya T, Hasegawa T. Effect of anti-epileptic drugs on serum zinc and cooper. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1993, 31 (2): 61-5.
19. Hurley LS. Teratogenesis of trace element deficiency. Physiol Rev J 1981, 61: 249-295
20. Dale P lewis. Drug and enviroment factors associated with adverse pregnancy outcomes. Ann Pharmacoter J 1998, 32:1087-1095.
21. Okada A, Aoki Y, Kushima K, Kurihara H, Bialer M, Fujiwara M. Polycomb homologs are involved in teratogenicity of valproic acid in mice. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2004, 70(11):870-9.
- 22- Kultima K, Nystrom AM, Scholz B, Gustafson AL, Dencker L, Stigson M. Valproic acid teratogenicity: a toxicogenomics approach. Environ Health Perspect, 2004, 112(12):1225-35.

The Effect of a Single Teratogenic Dose of Valproic Acid On Plasma Zinc Concentration

Aboozarypour, M., M.sc.^{1*}, Barbarestani, M., Ph.D.², Pasbakhsh, P., Ph.D.³, Gharibzadeh, Sh., Ph.D.⁴.

ABSTRACT

Introduction: Valproic acid (VPA) with good anticonvulsant activity has become accepted as one of the most important antiepileptic drugs. The potential teratogenicity of valproic acid on neural tube in infants born to mothers who have taken this drug has been described. The incidence of neural tube defect following exposure to VPA during the first weeks of pregnancy can increase to 1-2%. For this reason and for a relationship between zinc deficiency and neural tube defects and highest incidences of these abnormalities in areas of the world where human zinc deficiency exists we investigated the effect of VPA on plasma zinc concentration.

Materials & Methods: In this experimental study we selected 12 rats (Albino) randomizely in 2 groups. The rats were in equal environmental and nutritional states. In Control group normal saline 4ml/kg and in experimental group VPA 350mg/kg is injected intra abdominal. All the rats were sacrificed with cervical cutting and plasma prepared. Plasma zinc concentration was measured with flameless atomic absorption method. Quantitative data were presented as a Mean±SD were analyzed by t-test.

Results: Mean plasma zinc in the case group was 27.96 ± 2.23 , and in the control group was 42.2 ± 0.579 ($p=0.000$).

Conclusion: These results indicate that injection of VPA to rats decrease plasma zinc levels, that may be one of the mechanisms in neural tube defect following exposure to VPA.

Key words: Valproic Acid, Neural Tube defect, Zinc, Plasma

1. Master of Anatomy, Kurdistan University of Medical Sciences, Pasdaran Street, Sanandaj, Corresponding Author.

2. Associated Professor of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences.

3. Associated Professor of Anatomy, Tehran University of Medical sciences.

4. Assistant Professor of Physiology, Tehran University of Medical Sciences.