

مطالعه اثر فنی توئین بر روی استخوان ران در موش صحرایی

• دکتر ایران رشیدی

♥ مهین طاهری مقدم

فنی توئین یکی از مؤثرترین داروهایی است که در درمان صرع بکار می‌رود. از طرفی مشاهده شده است که مصرف طولانی‌مدت فنی توئین می‌تواند موجب کاهش سطح سرمی کلسیم گردد. از این رو، بر آن شدیم تا در این تحقیق اثر فنی توئین را بر روی استخوان‌های ران تعدادی موش صحرایی بررسی کنیم. بهمین منظور، تعدادی موش صحرایی انتخاب و به ۶ گروه ده‌تایی تقسیم شدند و سپس فنی توئین با دوزهای متفاوت در داخل صفاق آنها تزریق گردید و بعد از ۴۱ روز از تمام گروه‌ها خون‌گیری و میزان کلسیم، فسفر و آلکالین فسفاتاز سرم اندازه‌گیری شد. سپس حیوانات، تشریح و استخوان‌های آنها جدا گردید و طول و قطر استخوان ران راست آنها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و در آخر از این استخوان‌ها لام تهیه شد تا بررسی‌های پاتولوژیک بر روی آنها انجام شود. بر اساس نتایج بدست آمده میزان کلسیم و فسفر کاهش، و آلکالین فسفاتاز سرم افزایش داشت و افزایش مختصری در قطر استخوان و کاهش مختصری در طول استخوان مشاهده گردید که این افزایش معنی‌دار نبود؛ اما استخوان‌ها از نظر میکروسکوپی دارای تیغه‌های استخوانی نازک‌تر شده بودند که این اثر وابسته به دوز دارو می‌باشد و فعالیت استئوکلاست‌ها نیز افزایش داشت که این اثر نیز وابسته به دوز دارو می‌باشد. لذا بر اساس نتایج حاصله می‌توان گفت مصرف فنی توئین موجب استئومالاسی و افزایش احتمالی شکستگی استخوان می‌گردد که این موضوع نیاز به مطالعه بیشتر بر روی مدل‌های انسانی دارد.

واژه‌های کلیدی: فنی توئین؛ استخوان؛ استئومالاسی؛ موش صحرایی.

- متخصص پاتولوژی - گروه پاتولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز
- ♥ کارشناس ارشد بافت شناسی - گروه پاتولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

مقدمه

بیماری صرع یکی از اختلالات مغزی است که با فراوانی بالایی در جامعه بشری مشاهده می‌شود. جهت درمان و پیشگیری از این بیماری، بیمار ناچار است که یک یا چند داروی ضد صرع را برای مدتی طولانی و گاهی تا آخر عمر مصرف کند. از جمله می‌توان فنی‌توئین را نام برد که در سال ۱۹۳۸ در جلوگیری از تشنج مؤثر شناخته شد (۱). از عوارض دارویی این دارو می‌توان نیستاگموس، آتاکسی، آریتمی قلبی، کاهش فشارخون، هیپرپلازی لثه و در بعضی افراد هیرسوتیسم را نام برد (۲). همچنین این ماده باعث اختلال در متابولیسم ویتامین D می‌گردد و کمپلکس‌های غیرطبیعی با کلسیم نیز ایجاد می‌کند (۳). به همین علت ممکن است بتواند در استخوان‌سازی و بافت استخوانی تغییراتی مانند استئوپروز و کاهش توده استخوانی ایجاد کند که در ظاهر قابل تشخیص نباشد (۴).

از این رو بر آن شدیم که اثر فنی‌توئین را بر بافت استخوانی در موش صحرایی مورد مطالعه قرار دهیم تا در صورت به دست آمدن نتایج مطلوب و مورد قبول بودن عوارض جانبی آن، تحقیقات بر روی مدل انسانی انجام شود و ترتیبی اتخاذ شود که علیرغم کنترل بیماری، عوارض سوء دارو موجب بروز آسیب‌های شدید دیگر نشود.

روش پژوهش

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر و ماده استفاده شد. این حیوانات در طول آزمایش در شرایط مناسبی از نقطه نظر درجه حرارت 25°C و همچنین ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند؛ حیوانات در طول این مدت با آب تصفیه شده شهر و غذای فشرده شده تغذیه شدند.

موش‌ها پس از توزین و شماره‌گذاری به صورت تصادفی به ۶ گروه ده تایی تقسیم شدند و به شرح ذیل تحت تجویز دارو و سرم فیزیولوژی از طریق داخل صفاقی و به مدت ۴۱ روز قرار گرفتند.

گروه A: دریافت کننده سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر برای هر ۱۰۰ گرم وزن.

گروه B: دریافت کننده فنی‌توئین به میزان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

گروه C: دریافت کننده فنی‌توئین به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

گروه D: دریافت کننده فنی‌توئین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

گروه E: دریافت کننده فنی‌توئین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

گروه F: دریافت کننده فنی‌توئین به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

پس از پایان مدت تجویز دارو، از قلب حیوانات خون‌گیری شد و پارامترهای مورد نظر مانند کلسیم فسفر و آلکالین فسفاتاز خون اندازه‌گیری شد.

پس از خون‌گیری، حیوان مورد تشریح قرار گرفته و استخوان‌های دست و پا جدا و پاک‌سازی گردید؛ سپس توسط کولیس طول و قطر استخوان ران راست موش‌ها جداگانه اندازه‌گیری شد و در ظرف حاوی فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند و از آنها برش‌های ۶-۴ میکرونی تهیه و به روش H&E رنگ‌آمیزی گردیدند.

یافته‌ها

نتایج حاصله از بررسی‌های سرم خون نشان می‌دهد که میزان کلسیم و فسفر سرم خون موش‌ها با افزایش دوزهای فنی توئین، نسبت به گروه شاهد (A) کاهش داشته و این کاهش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$) که نتایج حاصل در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است.

همچنین، میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز سرم خون موش‌ها نیز با افزایش دوزهای فنی توئین نسبت به گروه

جدول ۱: مقایسه نتایج میزان کلسیم سرم خون موش‌های صحرایی دریافت‌کننده دوزهای مختلف فنی توئین با گروه کنترل

خطای استاندارد	میانگین	تعداد نمونه	کد	گروه
۰/۱۴	۸/۷۲	۱۰	A	دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر برای هر ۱۰۰ گرم وزن به مدت ۴۱ روز
۰/۱۳	۷/۸۳	۱۰	B	دریافت‌کننده ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۰۹	۷/۲۶	۱۰	C	دریافت‌کننده ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۱۷	۶/۵۲	۱۰	D	دریافت‌کننده ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۱۳	۵/۸۷	۱۰	E	دریافت‌کننده ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۲۹	۵/۴۷	۱۰	F	دریافت‌کننده ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز

جدول ۲: مقایسه نتایج میزان سرم خون موش‌های صحرایی دریافت‌کننده دوزهای مختلف فنی توئین با گروه کنترل

خطای استاندارد	میانگین	تعداد نمونه	کد	گروه
۰/۲۰	۵/۵۹	۱۰	A	دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر برای هر ۱۰۰ گرم وزن به مدت ۴۱ روز
۰/۲۶	۴/۶۷	۱۰	B	دریافت‌کننده ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۲۲	۴/۶۱	۱۰	C	دریافت‌کننده ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۱۹	۴/۲۰	۱۰	D	دریافت‌کننده ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۱۴	۴/۱۵	۱۰	E	دریافت‌کننده ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۰/۲۳	۳/۷۸	۱۰	F	دریافت‌کننده ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز

جدول ۳: مقایسه نتایج سطح آنکالین فسفاتاز سرم خون موش‌های صحرایی دریافت‌کننده دوزهای مختلف فنی توئین با گروه کنترل

خطای استاندارد	میانگین	تعداد نمونه	کد	گروه
۱/۸۸	۴/۷۹	۱۰	A	دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر برای هر ۱۰۰ گرم وزن به مدت ۴۱ روز
۴/۶۶	۹/۰۶	۱۰	B	دریافت‌کننده ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۵/۳۰	۹۹	۱۰	C	دریافت‌کننده ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۳/۹۷	۱۰۰/۷۱	۱۰	D	دریافت‌کننده ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۱۰/۶۲	۱۴۸/۰۳	۱۰	E	دریافت‌کننده ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز
۱۰/۰۸	۱۵۱/۲۷	۱۰	F	دریافت‌کننده ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فنی توئین به مدت ۴۱ روز

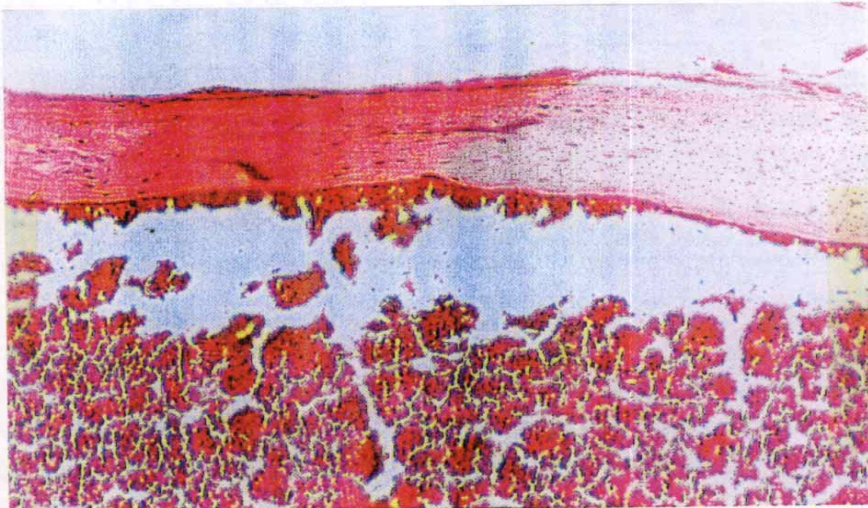


تصویر ۱: نمای میکروسکوپی بافت استخوان ران راست موش صحرایی گروه کنترل (H&E × 200)

شاهد (A) افزایش داشته ($P < 0.01$) که نتایج حاصل در جدول شماره ۳ آورده شده است.

از نظر ماکروسکوپی، افزایش مختصری در قطر استخوان‌ها و کاهش مختصری در طول استخوان‌ها مشاهده گردید که نسبت به گروه شاهد (A) تغییرات معنی‌داری نداشت.

اما از نظر میکروسکوپی، لام تهیه شده از گروه کنترل (A) دارای تیغه‌های استخوانی نرمال با فعالیت استخوان‌سازی بوده و فیروز زیرپوست نیز مشاهده نشد. ولی با افزایش دوزهای فنی توئین، تیغه‌های استئوئیدی نازک گردیده و تعداد استئوکلاست‌ها نیز افزایش یافتند و مقداری نیز فیروز زیر پوست مشاهده می‌گردد. (شکل‌های ۱ و ۲).



تصویر ۲: نمای میکروسکوپی بافت استخوان ران موش صحرائی دریافت کننده فنی توئین به میزان ۱۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۴۱ روز (H&E x 100)

بحث

صرع یکی از شایع‌ترین اختلالات عصبی در انسان است. طبق مطالعات آماری، از هر ۲۰۰ نفر از افراد جامعه یک نفر و از هر ۲۰۰ کودک، سه نفر مبتلا به صرع می‌باشند. از طرفی بیماران صرعی غالباً مجبورند که برای مدت طولانی و یا تا آخر عمر از داروهای ضد صرع مصرف نمایند. (۵) لذا با توجه به عوارض جانبی داروهای ضد صرع و طول مدت درمان، باید ترتیبی اتخاذ شود که علیرغم کنترل بیماری، عوارض سوء دارو موجب بروز آسیب‌های شدید دیگر نشود.

فنی توئین که یکی از داروهای لازم برای درمان صرع می‌باشد، اولین بار در سال ۱۹۰۸ توسط بیتز ساخته شد و در سال ۱۹۳۸ توسط مریت و پوتمن اثر ضد تشنج آن مشخص گردید (۶). در سه دهه اخیر، محققین به بررسی آثار ناشی از کاربرد طولانی مدت دوز بالای آن پرداخته‌اند (۷). در مطالعه اخیر، این دارو در دوزهای بین ۱۵۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بکار برده شد که همین میزان، باعث افزایش سطح آکالین فسفاتاز سرم گردید (جدول شماره ۱) و این افزایش منجر به فعال شدن بیشتر استئوکلاست‌ها و تخریب بیشتر بافت استخوانی گردید. (شکل شماره ۱) از طرف دیگر، این عوامل باعث نازک شدن تیغه‌های استخوانی و کاهش در توده استخوانی گردیده است که در نهایت این تغییرات می‌تواند موجب افزایش احتمال شکستگی استخوان گردد.

همچنین کاربرد فنی توئین با دوزهای ذکر شده باعث گردید که سطح کلسیم و فسفر سرمی نیز کاهش یابد (جدول‌های ۱ و ۲) از آنجایی که کلسیم و فسفر در حضور ویتامین D جذب می‌شوند، لذا کاهش سطح این دو ماده می‌تواند در اثر کاهش ویتامین D باشد که جهت دستیابی به نتایج قطعی، لازم به اندازه‌گیری سطح ویتامین D سرمی می‌باشد.

کاهش دو ماده فسفر و کلسیم نیز می‌تواند تغییرات ماکروسکوپی موجود در استخوان را توجیه نماید بطوری که بدن‌بال این کاهش، می‌توان کاهش مختصر در طول استخوان را انتظار داشت و بدن‌بال این عارضه نیز در اثر فشار ناشی از وزن حیوان بر روی استخوان‌ها افزایش مختصر قطر استخوان، قابل انتظار به نظر می‌رسد.

پس به طور کلی می‌توان دریافت که با افزایش دوز فنی توئین احتمال استئومالاسی و شکستگی استخوان در فرد بالا می‌رود که برای دستیابی به نتایج قطعی‌تر، نیاز به تحقیقات بر روی مدل انسانی می‌باشد.

Abstract

Study of the Effects of Phenytoin on the Femoral Bones of Rat

Phenytoin is one of the most effective drugs which is used in the treatment of epilepsy – Long – term consumption of phenytoin , on the other hand , causes a reduction in blood calcium. There fore , we decided to study its effects on the bones of rat . Six groups of N. MARI rats were selected and treated with different doses of phenytoin . After 41 days. Blood samples were taken , and levels of blood calcium. Phosphorus and ALP activity were measured. Then, long bones were cleaned , and the length and diameter of right femurs were measured. Finally, a histopathological study was completed . The findings indicated that calcium and phosphorus levels decreased ; whereas , ALP activity increased. Partial increase in the diameter and partial decrease in the length of bones were observed ; however , the length of bones were observed ; however , the variations were not significant in comparison with the control group. Results of histopathology , also revealed that bone osteoids became thinner and the osteoclasts were of more activity in a dose – dependent manner . therefore, phenytoin treatment seems to cause osteomalacia and more fracture in bones.

Key words : Phenytoin ; Bone; Osteomalacia ; Rat.

منابع

- ۱- برترام جی کاتزونگ، ترجمه محمدحسین، باقرزاده، درخشان، فارماکولوژی پایه و بالینی چاپ اول، انتشارات شهر آب ، صص ۴۶۳-۴۵۷، ۱۳۷۲.
- 2 . Hahn Tj & Hendin BA Serum 25 – hydroxy calciferol levels and bone mass in children on chronic anticonvulsant therapy; nengl Jmed. 292:550 – 554, 1975.
- ۳- کلارک، براتر، جانسون، ترجمه اکتای "داروشناسی پزشکی گات" چاپ اول، انتشارات حیان، صص ۲۴۳-۲۳۹، ۱۳۷۲.
- ۴- ارضی اردشیر، گله‌دار فرزانه، بررسی دیدگاه‌های تازه در دارودرمانی اپی‌لپسی. چاپ اول انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ، صص ۵۰-۴۱، ۱۳۷۰.
- 5 . Caspary WF. Inhibition of intestinal calcium transport by diphenylhydantoin in rat duodenum. Naunyn Schmiedeberg s Arch F pharmakol. 274: 146-153,1972.
- 6 . Ohta T. wergeda; J.E & Gruber H.E, Low dose phenytoin is osteogenic agent in the rat; springer – velag New york Inc, P.42 – 47, 1995.
- 7 . Christian C & Rodbro P, Iund M incidence of anticonvulsant osteomalacia and effect of vitamin D: controlled therapeutic trail. Br Med J 4:695 – 698,1973.