

## Protective effect of Concurrent Administration of Mesna and Galbanum Oil on Histological Structure of Rat Placenta against Cyclophosphamide Toxicity

Mohammadi T<sup>\*1</sup>, Khaksary Mahabadi M<sup>2</sup>, Najaf-ZadeVarzi H<sup>2</sup>, Rezai Z<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

\* *Corresponding author.* Tel: +986133331045 Fax: +986133331045 E-mail: t.mohammadi@scu.ac.ir

Received: Dec 19, 2015

Accepted: May 17, 2016

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Cyclophosphamide is one of the common drugs used for cancer treatment. Cyclophosphamide affects the placenta and it is teratogenic in pregnant women. The purpose of this study was to evaluate the protective effects of Mesna and Galbanum essential oil concurrent administration against cyclophosphamide toxicity in rat placenta tissue.

**Methods:** 22 pregnant female rats were randomly divided into 3 groups: (1) control (normal saline, n=7 rats), (2) cyclophosphamide (15mg/kg, n=7 rats), (3) cyclophosphamide (15mg/kg), Mesna (100mg/kg) and Galbanum (200mg/kg, n=8 rats). Medications were administered intraperitoneally on the 13th day of pregnancy. Then, rats were sacrificed on the 20<sup>th</sup> day of pregnancy. The placenta was separated and fixed after macroscopic evaluation. 5  $\mu$ m tissue sections were prepared, stained and studied by light microscopy.

**Results:** Cyclophosphamide reduced the placental weight, thickness and the length of the small and large diameters. Histologically, it reduced the thickness of the labyrinth and basal layers, caused necrosis and congestion in these layers, reduced giant cells numbers and caused their nuclear shrinkage ( $p<0.05$ ). Mesna and Galbanum oil had no effect on placental morphometry rather than cyclophosphamide ( $p>0.05$ ) but histologically it could increase the labyrinth and basal layers thickness and also the giant cells numbers ( $p<0.05$ ). It could also prevent nuclear shrinkage, giant cells and spongiotrophoblasts necrosis in the basal layer and reduce congestion in the labyrinth layer ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Mesna and Galbanum oil preserved the placenta of pregnant rat against toxic effects of cyclophosphamide probably by its antioxidant features and free radicals deletion.

**Keywords:** Cyclophosphamide; Galbanum Oil; Mesna; Morphometry; Histology; Placenta; Rat.

# اثر محافظتی تجویز همزمان مسنا و اسانس باریجه بر ساختار بافت شناسی جفت موش صحرایی در برابر سمیت سیکلوفسفامید

طیبه محمدی<sup>۱\*</sup>، محمود خاکساری مهابادی<sup>۲</sup>، حسین نجف‌زاده ورزی<sup>۲</sup>، زهرا رضائی<sup>۱</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۶۱۳۳۳۱۰۴۵. فاکس: ۰۶۱۳۳۳۱۰۴۵. پست الکترونیک: t.mohammadi@scu.ac.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** سیکلوفسفامید یکی از داروهای رایج در درمان سرطان است. سیکلوفسفامید روی جفت اثر سوء می‌گذارد و در زنان آبستن، ناهنجاری‌ها را ایجاد می‌کند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات محافظتی تجویز همزمان مسنا و اسانس باریجه در برابر سمیت سیکلوفسفامید در جفت موش صحرایی بود.

**روش کار:** ۲۲ سر موش صحرایی ماده آبستن به طور اتفاقی در ۳ گروه تقسیم شدند: (۱) کنترل (سرم فیزیولوژی) (تعداد ۷ موش)، (۲) سیکلوفسفامید (۱۵mg/kg) (تعداد ۷ موش) و (۳) سیکلوفسفامید (۱۵mg/kg)، مسنا (۱۰۰mg/kg) و باریجه (۲۰۰mg/kg) (تعداد ۸ موش). داروها در روز سیزدهم آبستنی به صورت داخل صفاقی تجویز و موش‌ها در روز بیستم آبستنی آسان‌کشی شدند. جفت‌ها جدا و پس از مطالعه میکروسکوپی فیکس شدند. مقاطع بافتی ۵ میکرومتری آماده، رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

**یافته‌ها:** سیکلوفسفامید وزن، ضخامت و طول قطرهای کوچک و بزرگ جفت را کاهش داد. از نظر بافت شناسی، ضخامت لایه‌های لایبرنت و بازال را کاهش داد و موجب نکروز و پرخونی در این لایه‌ها شد. تعداد سلول‌های غول‌پیکر را کاهش داد و باعث جمع‌شدگی هسته آنها شد ( $p < 0/05$ ). تجویز مسنا و اسانس باریجه روی مورفومتری جفت نسبت به گروه سیکلوفسفامید اثری نداشت ( $p > 0/05$ ), اما در سطح بافتی توانست ضخامت ناحیه بازال و تعداد سلول‌های غول‌پیکر را افزایش دهد ( $p < 0/05$ ). همچنین توانست مانع از جمع‌شدگی هسته، نکروز سلول‌های غول‌پیکر و اسپانزیوتروفوبلاست در لایه بازال شود و پرخونی در ناحیه لایبرنت را کاهش دهد ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** تجویز مسنا و اسانس باریجه بافت جفت موش صحرایی آبستن را در برابر اثرات توکسیک سیکلوفسفامید محافظت می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** سیکلوفسفامید، باریجه، مسنا، مورفومتری، بافت شناسی، جفت، موش صحرایی

دریافت: ۹۴/۰۹/۲۸ پذیرش: ۹۵/۰۲/۲۸

## 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 [۱]. سیکلوفسفامید دارویی پرمصرف در درمان سرطان است و در رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم اختلال ایجاد می‌کند [۲].

همچنین به عنوان یک داروی مهارکننده ایمنی برای جلوگیری از رد پیوند بیماران [۳] و درمان برخی از بیماری‌های پوستی، بویژه خودایمنی و اختلال در سیستم ایمنی مفید است [۴]. سیکلوفسفامید از جفت عبور می‌کند [۵]. جفت نقش بسیار مهمی در رشد و نمو جنین ایفا می‌کند، متابولیسم و انتقال انواع مواد غذایی و مواد زائد، انتقال الکترولیت‌ها و تبادل

گازهای تنفسی، تولید انواع هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌ها و اتصال جنین به دیواره رحم از مهم‌ترین وظایف جفت محسوب می‌شود [۶]. مطالعه نجف زاده و خاکساری نشان داد که تجویز سیکلوفسفامید باعث ایجاد ناهنجاری‌های مختلف اسکلتی از جمله شکاف کام، نقایص اندام‌ها و اگزسفال‌ها در جنین موش صحرایی می‌شود [۷]. مطالعات دیگر نشان دادند که تجویز سیکلوفسفامید در دوران بارداری موجب تاخیر در رشد جنین، کاهش وزن جفت، کاهش طول بند ناف و تغییرات هیستوپاتولوژیک در جفت می‌شود [۹،۸].

سیکلوفسفامید از جمله داروهای سیتوتوکسیک است که در کبد تحت تاثیر آنزیم‌های کبدی به متابولیت‌های فعال خود یعنی فسفر آمیدموستارد و آکروئین تبدیل می‌شود. فسفر آمیدموستارد 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 و پمپ‌های یونی ترکیب شده و باعث اکسیداسیون مستقیم و غیرفعال کردن یا مهار عملکرد عادی آن‌ها [۱۰] و در نتیجه راه‌اندازی آپوپتوز شود [۲]. بر همین اساس قرار گرفتن در معرض سیکلوفسفامید تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش داده و سهم عمده‌ی تراژدن بودن این دارو به مکانیسم ایجاد استرس اکسیداتیو برمی‌گردد [۱۱]. 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 [۱۲]. از جمله این داروها مسنا می‌باشد. برخی از عوارض سیکلوفسفامید از قبیل سمیت دستگاه ادراری به وسیله داروهای دارای گروه تیول از جمله سدیم ۲-مرکاپتواتان سولفانات (مسنا) کاهش می‌یابد [۱۳].

مسنا برای کاهش اثرات توکسیک سیکلوفسفامید در بیماران مبتلا به سرطان و اختلال در سیستم ایمنی استفاده می‌شود [۱۴]. همچنین در کاهش ناهنجاری‌های جنینی ناشی از سیکلوفسفامید در موش صحرایی موثر است [۱۵]. مسنا برای پیشگیری از التهابات خونریزی‌دهنده مثانه به میزان ۲۰ درصد مقدار مصرف داروی ضدسرطان هم‌زمان به صورت وریدی تزریق می‌شود [۱۶] و در پیشگیری از سیستمیت هموراژیک ناشی از سیکلوفسفامید در موش صحرایی نیز مفید می‌باشد [۱۷].

باریجه گیاهی از خانواده چتریان بوده و در ایران و مناطق مختلف دارای اسامی مختلفی است، در زبان فرانسوی و انگلیسی به آن *Galbanum*<sup>۱</sup> می‌گویند و نام علمی آن *Ferula gummosa Boiss*<sup>۲</sup> می‌باشد [۱۸]. این گیاه دارویی سنتی ایرانی، به صورت جداگانه یا همراه با داروهای دیگر برای درمان صرع و تشنج، تقویت حافظه [۱۹]، ترمیم زخم‌ها و عفونت‌های پوستی، روماتیسم، کاهش تنش‌های روحی و روانی [۲۰] و نیز کاهش قند خون، کاهش التهاب، ضد عفونی و برطرف کردن ضعف معده و درمان بیماری‌های عصبی توصیه شده است [۱۸]. مطالعات صورت گرفته درباره این گیاه، اهمیت فعالیت بیولوژیکی ترکیبات ترپنی آن را نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد پتانسیل بالایی در اتصال به رادیکال‌های آزاد اکسیژن (گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۳</sup>) و سپس ترکیبات هیدروکربنی داشته باشد [۲۰]. بنابراین اگر چه در حال حاضر اثرات مطلوب باریجه و مسنا پذیرفته شده است ولی تاکنون پیرامون نقش حفاظتی تجویز هم‌زمان این دو روی پارامترهای بافت جفت بعد از درمان با سیکلوفسفامید بررسی صورت نگرفته است، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی تجویز هم‌زمان مسنا و اسانس باریجه بر روی تغییرات بافت‌شناسی

<sup>۱</sup> Galbanum

<sup>۲</sup> Ferula gummosa Boiss

<sup>۳</sup> Reactive Oxygen Species(ROS)

جفت موش صحرایی تیمار شده با سیکلوفسفامید انجام گرفت.

## روش کار

### حیوانات و گروه‌های مورد مطالعه

این مطالعه تجربی بر روی ۲۲ مدل حیوانی از موش‌های صحرایی بالغ نژاد ویستار مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور انجام گردید. موش‌های صحرایی ماده و نر ۱۰-۱۲ هفته‌ای با میانگین وزنی  $20 \pm 20$  گرم در قفس‌های سیمی و تحت شرایط نوری (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) در دمای اتاق ( $23 \pm 2$ ) درجه سانتی‌گراد) و رطوبت ثابت ( $50 \pm 10$  درصد) برای دو هفته قبل از شروع انجام آزمایش به طور جداگانه نگهداری شده و تغذیه آن‌ها از آب لوله کشی شهری و غذای فشرده ساخت کارخانه خوراک دام پارس تهران به طور منظم و روزانه داده شد. کلیه مراحل کار با توجه به اصول اخلاقی پژوهش بر روی حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران انجام گرفت. 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 اتفاقی در ۳ گروه تقسیم شدند. گروه اول (کنترل: تعداد ۷ موش) در روز سیزده آبستنی هم حجم سیکلوفسفامید، سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی تجویز شد. گروه دوم (سیکلوفسفامید: تعداد ۷ موش) در روز سیزده آبستنی سیکلوفسفامید (باکستر آلمان) به میزان ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تجویز شد [۲۰]. گروه سوم (تعداد ۸ موش) مانند گروه دوم سیکلوفسفامید، به همراه مسنا (باکستر آلمان) با

دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن [۱۷] و اسانس باریجه (باریج اسانس کاشان- ایران) با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن [۲۱] به صورت داخل صفاقی تجویز شد.

### مطالعه ماکروسکوپی

روز بیستم آبستنی تمام موش‌های مورد مطالعه با رعایت ملاحظات اخلاقی با کلروفورم آسان‌کشی شدند. پس از باز کردن محوطه شکمی و برش شاخ رحم، جفت‌ها به همراه جنین‌ها خارج و علاوه بر بررسی‌های دقیق ظاهری، به‌طور 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 از ترازوی دیجیتالی (Japan, GR-120, A&D) و برای اندازه‌گیری قطر و ضخامت از کولیس (Mitutoyo, Kanagawa, Japan) استفاده گردید.

### مطالعه میکروسکوپی

جهت مطالعات میکروسکوپی از هر موش صحرایی ماده در همه گروه‌ها، ۵ نمونه جفت از قسمت وسط شاخ رحم در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد، فرمالین نمونه‌ها تعویض و جهت تهیه مقاطع بافتی به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل گردید. در آزمایشگاه بطور تصادفی از هر گروه ۵ بلوک تهیه و با استفاده از روش‌های متداول تهیه مقاطع بافتی، از هر بلوک ۳ برش به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین<sup>۱</sup> (H&E) و پریودیک اسید شیف<sup>۲</sup> (PAS) قرار گرفت. مقاطع توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51) مورد مطالعه بافت‌شناسی قرار گرفتند و تصاویر بافت‌شناسی توسط دوربین دیجیتال (Olympus DP71) اخذ شد. مطالعات هیستومتری شامل اندازه‌گیری ضخامت ناحیه بازالی و لایبرنت و همچنین ناحیه دسیدوا در همه گروه‌ها به طور

<sup>1</sup> Hematoxylin & Eosin (H&E)

<sup>2</sup> Periodic Acid Schiff (PAS)

میلی‌متر بود. در گروهی که سیکلوفسفامید را با دوز ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند، از نظر مورفولوژی اندازه جفت کوچک و به رنگ قرمز تیره دیده شد و میانگین وزن، طول قطر کوچک و بزرگ و ضخامت جفت در این گروه به ترتیب  $0.1 \pm 0.04$  گرم،  $9.25 \pm 0.27$ ،  $11.37 \pm 0.32$  و  $2.81 \pm 0.12$  میلی‌متر بود که در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود ( $p < 0.05$ ) (جدول ۱). در گروه سوم با تجویز مسنا و باریجه به همراه سیکلوفسفامید میانگین وزن، طول قطر کوچک و بزرگ و ضخامت جفت در این گروه به ترتیب  $0.1 \pm 0.039$  گرم،  $9.35 \pm 0.17$ ،  $11.83 \pm 0.16$  و  $3.42 \pm 0.12$  میلی‌متر بود. جفت‌ها در این گروه از نظر اندازه و رنگ مشابه گروه شاهد بودند. اما تجویز مسنا و باریجه به همراه سیکلوفسفامید نتوانست از بروز تغییرات مورفومترکی ناشی از سیکلوفسفامید به‌طور معنی‌داری پیشگیری کند.

تصادفی در ۵ میدان دید میکروسکوپی با عدسی شیئی  $4 \times$  و  $10 \times$ ، و شمارش سلول‌های غول‌پیکر با عدسی شیئی  $10 \times$  و  $40 \times$  بود که با کمک نرم‌افزار Image J انجام شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج با استفاده از SPSS-16 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.

### یافته‌ها

#### یافته‌های مورفولوژی و مورفومتري

جفت‌ها در گروه شاهد کاملاً سالم و به رنگ قرمز روشن بوده و هیچ‌گونه ناهنجاری نداشتند. میانگین وزن، طول قطر کوچک، بزرگ و ضخامت جفت‌ها در گروه شاهد به ترتیب  $0.1 \pm 0.05$  گرم،  $11.02 \pm 0.23$ ،  $14.15 \pm 0.26$  و  $3.62 \pm 0.22$

جدول ۱. مقایسه میانگین وزن، قطر کوچک، قطر بزرگ و ضخامت جفت در گروه‌های کنترل، دریافت‌کننده سیکلوفسفامید، سیکلوفسفامید و باریجه.

سیکلوفسفامید + مسنا + باریجه	سیکلوفسفامید	شاهد	پارامترها / گروه‌ها
a $0.39 \pm 0.01$	a $0.1 \pm 0.04$	bc $0.1 \pm 0.05$	وزن جفت (گرم)
a $9.35 \pm 0.17$	a $9.25 \pm 0.27$	bc $11.02 \pm 0.23$	قطر کوچک (میلی‌متر)
ab $11.83 \pm 0.16$	a $11.37 \pm 0.32$	bc $14.15 \pm 0.26$	قطر بزرگ (میلی‌متر)
ab $3.42 \pm 0.12$	a $2.81 \pm 0.12$	bc $3.62 \pm 0.22$	ضخامت (میلی‌متر)

a نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها در پارامترهای موجود در جدول است ( $p < 0.05$ )

b نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه سیکلوفسفامید و سایر گروه‌ها در پارامترهای موجود در جدول است ( $p < 0.05$ )

c نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه سیکلوفسفامید + مسنا + باریجه و سایر گروه‌ها در پارامترهای موجود در جدول است ( $p < 0.05$ )

میکرومتر محاسبه شد. میانگین فوق در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید بود ( $p < 0.05$ ). اما نسبت به گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید + مسنا اختلاف معنی‌داری نشان‌دهنده ( $p = 0.21$ )؛ بدین معنی که

#### یافته‌های هیستولوژی و هیستومتري

میانگین ضخامت ناحیه لایبرنت جفت‌ها در گروه شاهد و گروه‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و سیکلوفسفامید + باریجه و مسنا به ترتیب  $15.63 \pm 1.45$ ،  $39.81 \pm 3.85$  و  $12.52 \pm 1.43$

تجویز باریجه و مسنا به همراه سیکلوفسفامید در کاهش عوارض ناشی از سمیت سیکلوفسفامید بطور معنی داری موثر نبود. میانگین تعداد سلول‌های غول‌پیکر جفت‌ها در گروه شاهد و گروه‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و سیکلوفسفامید+ باریجه و مسنا نیز به ترتیب  $5/6 \pm 0/54$ ،  $2/45 \pm 0/17$  و  $7/73 \pm 0/84$  محاسبه شد. میانگین تعداد سلول‌های غول‌پیکر در گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه سیکلوفسفامید بود ( $p < 0/05$ ). تجویز باریجه و مسنا به همراه سیکلوفسفامید موجب شد که تعداد این سلول‌ها نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر شود ( $p < 0/05$ ) (جدول ۲). نتایج سایر پارامترها در جدول ۲ نشان داده شده است.

تغییرات هیستومتری ایجاد شده در بافت جفت گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید شامل کاهش معنی‌دار ضخامت لایه لایبرنت (تصویر ۱-۲)، کاهش معنی‌دار ضخامت لایه بازالی (تصویر ۲-۲) و تعداد سلول‌های غول‌پیکر و افزایش ضخامت لایه دسیدوا (تصویر ۳-۲) در مقایسه با گروه شاهد بود ( $p < 0/05$ ) (جدول ۲). مطالعه بافت‌شناسی مقاطع جفت در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد جفت در گروه دریافت‌کننده

سیکلوفسفامید تغییرات گسترده‌ای شامل جمع‌شدگی و کوچک شدن هسته سلول‌های غول‌پیکر، نکروز شدید سیتوپلاسم سلول‌های اسپانژیوتروفوبلاستی و کوچک و تیره شدن هسته این سلول‌ها همراه با پرخونی (تصویر ۴-۲)، پرخونی لایه لایبرنتی، کوچک شدن سلول‌های تروفوبلاستی در ناحیه لایبرنتی و افزایش ضخامت LIM (تصویر ۵-۲)، هم‌چنین نکروز سلول‌های تشکیل‌دهنده دسیدوا نسبت به گروه کنترل قابل مشاهده بود (تصویر ۴-۲).

تجویز هم‌زمان مسنا و باریجه موجب پیشگیری از تغییرات ناشی از اثر سیکلوفسفامید شامل اندازه و تعداد سلول‌های غول‌پیکر، کاهش نکروز سلول‌های اسپانژیوتروفوبلاستی و پرخونی در ناحیه بازال نسبت به گروه سیکلوفسفامید شد (تصویر ۴-۳). مسنا و باریجه به طور معنی‌داری موجب افزایش ضخامت لایه بازالی (تصویر ۴)، و ضخامت لایه دسیدوا در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید شد (تصویر ۳) ( $p < 0/05$ ). اما افزایش ضخامت لایه لایبرنت در این گروه نسبت به گروه شاهد به حد معنی‌داری نرسید ( $p = 0/21$ ) (تصویر ۱).

جدول ۲. مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار ضخامت لایه‌های لایبرنت، بازالی و دسیدوا و تعداد سلول‌های غول‌پیکر جفت در گروه‌های شاهد،

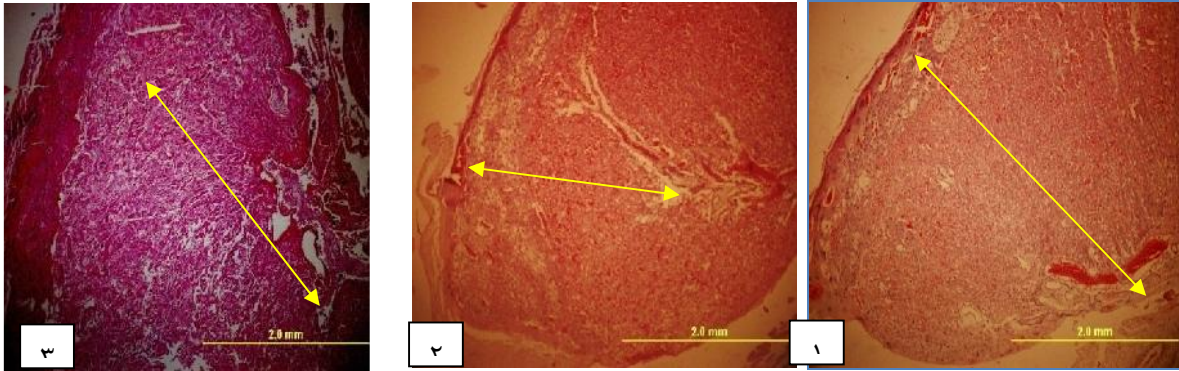
دریافت‌کننده سیکلوفسفامید، سیکلوفسفامید و باریجه

پارامترها / گروه‌ها	شاهد	سیکلوفسفامید	سیکلوفسفامید + مسنا + باریجه
ضخامت لایه لایبرنت (میکرومتر)	b 456/14 ± 15/63	a 385/73 ± 39/81	b 413/4 ± 12/52
ضخامت لایه اتصال (میکرومتر)	b 96/04 ± 3/10	a 72/8 ± 3/29	b 92/7 ± 6/01
ضخامت لایه دسیدوا (میکرومتر)	b 28/8 ± 2/51	a 43/12 ± 4/82	ab 26/6 ± 2/25
تعداد سلول‌های غول‌پیکر	bc 5/60 ± 0/54	ac 2/45 ± 0/17	ab 7/73 ± 0/84

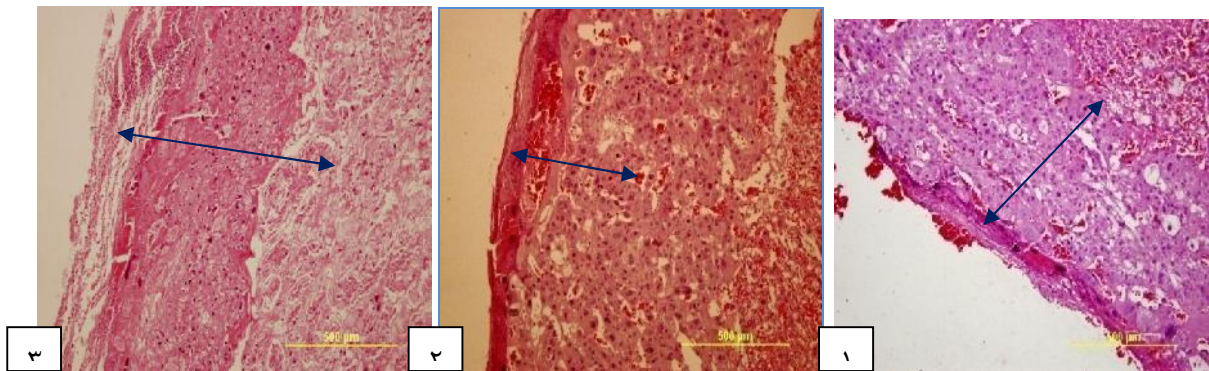
a نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها در پارامترهای موجود در جدول است ( $p < 0/05$ )

b نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه سیکلوفسفامید و سایر گروه‌ها در پارامترهای موجود در جدول است ( $p < 0/05$ )

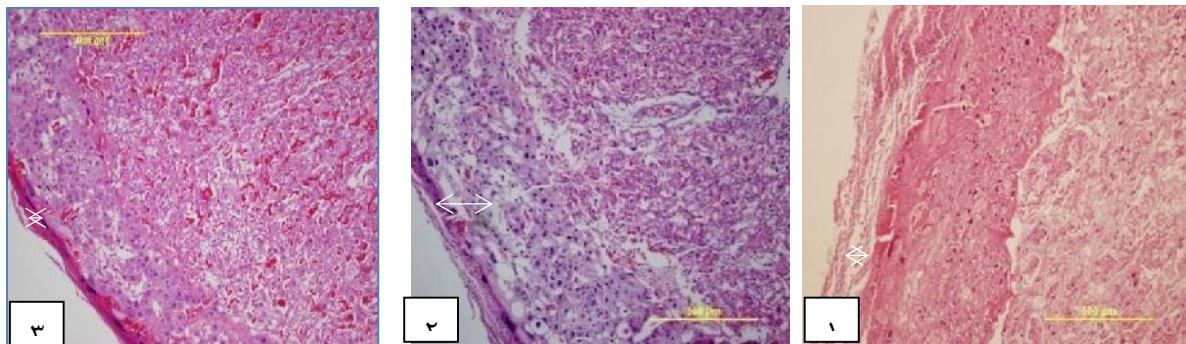
c نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه سیکلوفسفامید+مسنا+باریجه و سایر گروه‌ها در پارامترهای موجود در جدول است ( $p < 0/05$ )



تصویر ۱. ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در این تصویر کاهش ضخامت لایه لایبرنت (پیکان زرد رنگ) در گروه سیکلوفسفامید (۲) نسبت به گروه کنترل (۱) و گروه سیکلوفسفامید + مسنا + اسانس باریجه (۳) مشاهده می‌شود (H&E, ۴×)

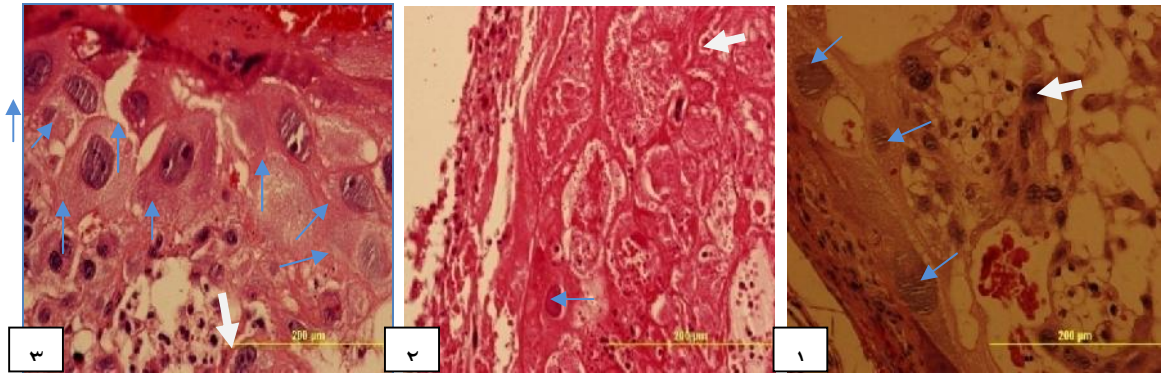


تصویر ۲. ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در این تصویر کاهش مشخص لایه بازالی (پیکان مشکی رنگ) در گروه سیکلوفسفامید (۲) نسبت به گروه کنترل (۱) و گروه سیکلوفسفامید + مسنا + اسانس باریجه (۳) مشاهده می‌شود (H&E, ۱۰×)

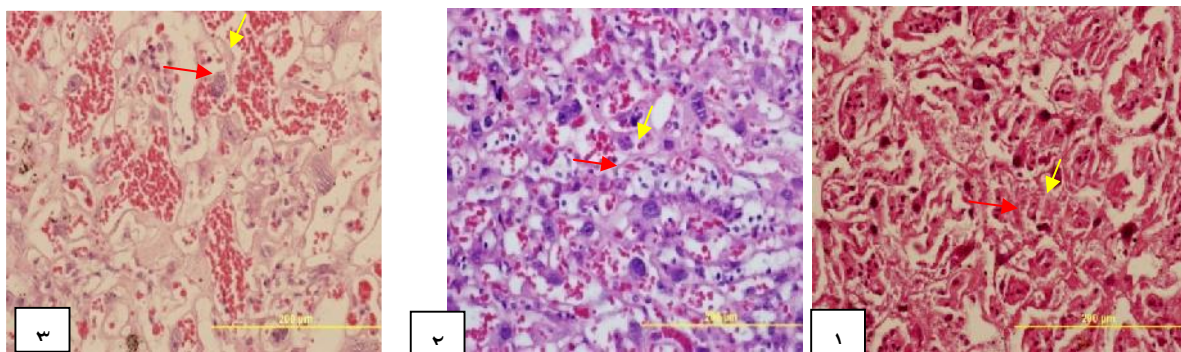


تصویر ۳. ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. در این تصویر افزایش مشخص دسیدوا (پیکان سفید رنگ) در گروه سیکلوفسفامید (۲) نسبت به گروه کنترل (۱) و گروه سیکلوفسفامید + مسنا + اسانس باریجه (۳) مشاهده می‌شود (H&E, ۱۰×)





تصویر ۴. ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. سلول‌های اسپانزیوتروفوبلاست (پیکان سفید رنگ). در این تصویر افزایش تعداد سلول‌های گول‌پیکر (پیکان آبی رنگ) گروه کنترل (۱) و سیکلوفسفامید+مسنا+اسانس باریجه (۳) نسبت به گروه سیکلوفسفامید (۲) مشاهده می‌شود. (H&E، ۴۰×)



تصویر ۵. ساختار میکروسکوپی جفت در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. سلول‌های تروفوبلاست (پیکان قرمز رنگ). در این تصویر افزایش ضخامت LIM جفت (پیکان زرد رنگ) در گروه سیکلوفسفامید (۲) نسبت به گروه‌های کنترل (۱) و سیکلوفسفامید + مسنا + اسانس باریجه (۳) مشاهده می‌شود. (H&E، ۴۰×)

### بحث

نتایج هیستومورفومتری و هیستومورفولوژی مطالعه حاضر حاکی از آسیب توکسیک جفت در گروه سیکلوفسفامید است. تجویز سیکلوفسفامید با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم در موش صحرایی می‌تواند باعث تغییرات قابل توجهی در ساختار جفت شود. در این مطالعه تجویز سیکلوفسفامید موجب کاهش وزن، طول قطر و ضخامت جفت نسبت به گروه کنترل شد. کاهش وزن و قطر جفت متعاقب تیمار با سیکلوفسفامید قبلاً توسط دلوسیا<sup>۱</sup> و همکاران، و کیم<sup>۲</sup> و همکاران گزارش شده که با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

تجویز سیکلوفسفامید موجب کاهش معنی‌دار ضخامت ناحیه لایرننت و بازال نسبت به گروه شاهد نیز شد که با پرخونی و آسیب‌های سلولی همراه بود. کاهش ضخامت و پرخونی در ناحیه لایرننت در تبدلات بین مادر و جنین می‌تواند موثر باشد. این یافته‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد که شکل‌گیری غیرطبیعی عروق در ناحیه لایرننت ممکن است باعث کاهش ظرفیت عملکردی سد تروفوبلاستی شود که با یافته‌های منفرد و همکاران و کوسیف<sup>۳</sup> و همکاران همخوانی دارد [۲۳، ۲۲]. علاوه بر این، تیمار با سیکلوفسفامید موجب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های گول‌پیکر و افزایش معنی‌دار ضخامت نواحی دسیدوا و LIM نسبت به گروه شاهد شد که با پرخونی شدید و آسیب‌های سلولی هم‌چون نکروز

<sup>1</sup> Delucia

<sup>2</sup> Kim

<sup>3</sup> Kosif



همراه بود. سلول‌های غول‌پیکر در تعدادی از فرایندهای مهم برای یک بارداری موفق از جمله لانه‌گزینی، تغییرات دسیدوای مادری و ترشح هورمون‌هایی که تکامل جفت را کنترل می‌کنند، دخالت دارد [۲۴]. به نظر می‌رسد که سلول‌های غول‌پیکر جریان خون مادری را در جفت کنترل می‌کنند [۲۵] و پتانسیل رگ‌زایی آن‌ها در تشکیل موفقیت آمیز جفت مهم است [۲۶]. نتایج مشابهی توسط حسینی و همکاران، مبنی بر کاهش سلول‌های غول‌پیکر گزارش شده است [۲۷]. ضخامت LIM نیز یک پارامتر مهم در فیزیولوژی جفت محسوب می‌شود [۲۸] که در مطالعه حاضر در گروه سیکلوفسفامید میزان آن افزایش یافت و موجب افزایش فاصله خونی بین مادر و جنین شد و در نتیجه منجر به کاهش تبادلات مواد غذایی از گردش خون مادر به گردش خون جنین می‌شود [۲۹].

سمیت سیکلوفسفامید روی اندام‌های مختلف بارها توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته است [۱۱]. در همه این مطالعات، به نقش استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در ایجاد اثرات ژنوتوکسیک سیکلوفسفامید اشاره شده است. به نظر می‌رسد تجویز سیکلوفسفامید سمیت بالایی در بافت جفت را موجب می‌شود که ناشی از القای استرس اکسیداتیو و ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن بوده و با نکرور، آپوپتوز و مرگ سلولی همراه است [۳۰، ۱۱]. یافته‌ها در گروه دریافت‌کننده مسنا و باریجه نشان داد که تجویز همزمان مسنا و اسانس باریجه با سیکلوفسفامید اگر چه روی مورفومتری بافت تاثیر معنی‌داری نداشت، اما در سطح بافتی موجب افزایش معنی‌دار ضخامت لایه لابیرنت، لایه بازال، تعداد و اندازه سلول‌های غول‌پیکر و کاهش ضخامت لایه دسیدوا و پرخونی نسبت به جفت حیوانات گروه سیکلوفسفامید شد.

مسنا دی‌سولفید غیرفعال تبدیل می‌شود. دی‌مسنا در کلیه ترشح و فیلتر می‌شود و تحت تاثیر آنزیم‌های تیول‌ترانسفراز و گلو‌تاتیون ردوکتاز احیا شده و به مسنا تبدیل می‌شود [۳۱]. 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 [۷].

ویرا<sup>۱</sup> و همکاران در مطالعه‌ای تاثیر 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 [۱۳]. نجف‌زاده و همکاران 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 کف و نقص در اندام‌های انتهایی بدن و کاهش معنی‌دار وزن و طول بدن جنین می‌گردد و تجویز مسنا به همراه سیکلوفسفامید توانست درصد بروز هیدروسفالی، اگزنسفالی، شکاف کام و امفالوسل را کاهش دهد و به طور معنی‌داری مانع از کاهش وزن و طول بدن ناشی از سیکلوفسفامید گردد [۷].

هالز<sup>۲</sup> و همکاران 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 را به طور معنی‌داری کاهش دهد که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر قابل مقایسه است. همچنین تغییرات در گروه

مسنا یک متابولیت آلکیله‌کننده غیرفعال با شکل تیواتری است که وارد جریان خون می‌شود و فوراً به

<sup>1</sup> Vieira

<sup>2</sup> Hales

کافتین را نیز کاهش داد. در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان می‌دهد که اسانس باریجه ناهنجاری‌های بافت جفت ناشی از سیکلوفسفامید را کاهش داد [۲۱]. احتمالاً باریجه با اثر آنتی‌اکسیدانی خود و مسنا با پیوند با آکروئین و تبدیل آن به متابولیت بی‌خطر می‌تواند از جفت در برابر آسیب‌های هیستومورفولوژیکی ناشی از سیکلوفسفامید تا حدودی محافظت کند.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که احتمالاً مسنا و اسانس باریجه در محافظت از جفت در برابر اثرات سمی ناشی از سیکلوفسفامید موثرند، با این حال درک بهتر این فرایند نیازمند مطالعات تکمیلی بیشتری است و پیشنهاد می‌شود برای درک بهتر مکانیسم اثر باریجه و مسنا این تحقیق با روش‌های ایمنوهیستوشیمی و ایمنوسیتوشیمی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر، حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست‌شناسی جانوری گرایش بافت‌شناسی و جنین‌شناسی زهرا رضایی می‌باشد و هزینه‌های انجام این مطالعه از محل اعتبارات گرنت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز تامین شده که بدین وسیله از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه قدردانی می‌گردد.

مسنا و باریجه را شاید بتوان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی باریجه نیز مرتبط دانست [۲۰]. گیاهان دارویی به خصوص گیاهان غنی از پلی‌فنول‌ها و به طور عمده فلاونوئیدها و اسیدفنولیک خواص آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق اهدای هیدروژن و ظرفیت‌های فلزی به عنوان عوامل بالقوه شیمیوپروتکتیو ارائه می‌دهند [۳۲]. ترکیبات فنولی اثرات محافظتی خود را با مهار گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی میزبان نشان داده‌اند [۳۳]. باریجه نیز از جمله این گیاهان به شمار می‌آید که در آن ترکیبات ترپنوئیدی مانند *آلفا پینن*<sup>۱</sup>، *بتا پینن*<sup>۲</sup>، *۳-کارن*<sup>۳</sup>، *آلفا تورجن*<sup>۴</sup> و *سابینن*<sup>۵</sup> بسیار فراوانند [۳۴، ۲۰].

ترکیبات ترپنوئیدی باریجه پتانسیل بالایی در اتصال به رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ترکیبات هیدروکربنی دارد. این ترکیبات می‌تواند به عنوان اهداکننده‌های خوب الکترون و اتم هیدروژن عمل کنند و قادر به جلوگیری از واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد شود و گونه‌های فعال اکسیژن را به محصولات پایدار و با ثبات تبدیل کند [۳۵].

مطالعه رشیدی و همکاران نشان داد که تجویز اسانس باریجه نه تنها در جنین موش صحرایی ترانوژن نبود بلکه ناهنجاری شکاف کام ناشی از

<sup>1</sup> -Pinene

<sup>2</sup> -Pinene

<sup>3</sup> 3-Carene

<sup>4</sup> -Thurjene

<sup>5</sup> Sabinene

### References

- 1- Ghosh D, Das UB, Ghosh S, Mallick M, Debnath J. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem Toxicol*. 2002 Aug; 25(3): 281-292.
- 2- Oraby HAS, Hassan AAM, Maaty NAFA. Effect of cyclophosphamide on transcription of SOD1 mRNA and GPX1 mRNA in mice liver and brain tissues. *J Appl Biosci*. 2010 Feb; 29: 1736-1742.
- 3- Baumann F, Preiss R. Cyclophosphamide and related anticancer drugs. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001 Nov; 764(1): 173-192.
- 4- Shreder OV, Shreder ED, Durnev AD, Seredenin SB. Association of genotoxic and teratogenic effects induced by cyclophosphamide and their modification with afobazole. *Gig Sanit*. 2011 Sep-Oct; (5):64-8.

- 5- Shreder OV, Shreder ED, Durnev AD, Seredenin SB. Clinical-parasitological response to treatment with quinine associated to doxycycline in uncomplicated falciparum malaria. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Sep; 36(6): 751-754.
- 6- Emmanouil-Nikoloussi EN, Nikoloussis E, Likartsis C, Goula C. Placenta blood barrier and retinoids: Histological and immunohistochemical (HSPs) study in Balb/C mice placenta. *Reprod Toxicol.* 2008; 26(1): 61.
- 7- Najafzadeh H, Mahabadi MK. A comparison study of the effects of echinacea purpurea ethanolic extract and mesna on cyclophosphamide-induced macroscopic fetal defects in rats. *Iran J Med Sci.* 2009 Dec; 12(1): 61-66.
- 8- DeLucia MBI, Azoubel R. Cyclophosphamide effects on the epithelial covering of rats fetus's tongue: A morphometric study. *Int J Morphol.* 2005; 23(2): 105-109.
- 9- Padmanabhan R, Singh S. Histopathological changes of placenta induced by cyclophosphamide in rats. *Congen Anomal.* 1984 May; 24(1): 1-8.
- 10- Senthilkumar S, Yogeta SK, Subashini R, Devaki T. Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chem-biolo int.* 2006 Mar; 160(3): 252-260.
- 11- Park D, Jeon JH, Shin S, Joo SS, Kang DH, Moon SH, et al. Green tea extract increases cyclophosphamide-induced teratogenesis by modulating the expression of cytochrome P-450 mRNA. *Rep Toxicol.* 2009 Jan; 27(1): 79-84.
- 12- Mohammadi F, Nikzad H, Taghizadeh M, Moravegi SA. The effect of dietary pumpkin seed extract on testicular and serum biochemical parameters of adult rats treated with cyclophosphamide. *Fayz J.* 1392 Sep; 17(5): 438-446.
- 13- Vieira MM, Brito GAC, Belarmino-Filho JN, Macedo FYB, Nery EA, Cunha FQ, et al. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. *Int j urol.* 2003 Nov; 10(11): 595-602.
- 14- Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 10<sup>th</sup> ed. USA: McGraw-Hill, 2001.
- 15- Slott VL, Hales BF. Sodium 2-mercaptoethane sulfonate protection against cyclophosphamide-induced teratogenicity in rats. *Toxicol appl pharmacol.* 1986 Jan; 82(1): 80-86.
- 16- Shahraz S, Ghaziani T. *Iran Farma, a comprehensive textbook of toxic drugs,* 2<sup>th</sup> ed. Tehran: Tymourzadeh Institute, 1383:194-197. (Full text in Persian)
- 17- Menetrey D, Bon K, Michiels JF, Lanteri-Minet M. The uroprotection of mesna on cyclophosphamide cystitis in rats. *Sciences de la Vie.* 1999 Jun; 322(6): 505-515.
- 18- Mir Haidar H. *Plant Sciences (plants used in prevention and treatment of diseases),* 6<sup>th</sup> ed. Tehran: Publications office of Islamic culture, 1998: 197-199. (Full text in Persian)
- 19- Adhami HR, Fitz V, Lubich A, Kaehlig H, Zehl M, Krenn L. Acetylcholinesterase inhibitors from galbanum, the oleo gum-resin of *Ferula gummosa* Boiss. *Phytochem Lett.* 2014 Sep; 10: 132-137.
- 20- Slott VL, Hales BF. Enhancement of the embryotoxicity of acrolein, but not phosphoramidate mustard, by glutathione depletion in rat embryos in vitro. *Biochem pharmacol.* 1987 Jun; 36(12): 2019-2025.
- 21- Rashidi F, Khaksary-Mahabady M, Ranjbar R, Najafzadeh-Varzi H. The Effects of essential oil of galbanum on caffeine induced-cleft palate in rat embryos. *Zahedan J Res Med Sci.* 2014 Feb; 16(2): 37-41.
- 22- Monfared AL, Salati AP. The effects of *Carthamus tinctorius* L. on placental histomorphology and survival of the neonates in mice. *Avicenna J of Phytomed.* 2012 Jan; 26(2): 841-850.
- 23- Kosif R, Akta G, Öztekin A. Microscopic examination of placenta of rats prenatally exposed to *Aloe barbadensis*: a preliminary study. *Int J of Morphol.* 2008; 26(2): 275-281.
- 24- Ogren L, Talamantes F. Prolactins of pregnancy and their cellular source. *Int Rev Cytol.* 1988; 112: 1-65.
- 25- Dong YL, Vegiraju S, Chauhan M, Yallampalli C. Expression of calcitonin gene-related peptide receptor components, calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1, in the rat placenta during pregnancy and their cellular localization. *Mol Hum Reprod.* 2000 Aug; 9: 481-490.

- 26- Gagiotti S, Scavone C, Bevilacqua E. Participation of the mouse implanting.trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod.* 2000 Feb; 62: 260-268.
- 27- Hosseini E, Monfared AL, Moloudizargari M, Aghajanshakeri S, Tolooghaddam S, Rahmatigavari S, et al. Histological and morphological characteristics of placenta in the rats administrated with Glycyrrhiza glabra extract. *Res Opinions in Animal and Vet Sci.* 2013; 3(2): 60-63.
- 28- Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod.* 2004 Jun; 70: 1806-1813.
- 29- Masashi H, Chisato T, Masao N, Yasue O. Quantitative investigations of placental terminal villi in maternal diabetes mellitus by scanning and transmission electron microscopy. *Tohoku J Exp Med.*1992 Aug; 167: 247-257.
- 30- Ghaffarie T, Johari H, Najafian M, Kargar H. Effect of hydroalcoholic extract of cinnamon on the pituitary-gonadal axis in adult male rats under chemotherapy by cyclophosphamide. *Zahedan J of Res in Med Sci.*2014 Mar; 16(3): 16-20.
- 31- Links M, Lewis C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1999 Mar; 57(3): 293-308.
- 32- Song J, Liu L, Li L, Liu J, Song E, Song Y. Protective effects of lipoic acid and mesna on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mice. *Cell Biochem Funct.* 2014 May; 32(2): 125-132.
- 33- Grzegorzcyk I, Matkowski A, Wysoki ska H. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chem.* 2007 Dec; 104(2): 536-541.
- 34- Subapriya R, Kumaraguruparan R, Abraham SK, Nagini S. Protective effects of ethanolic neem leaf extract on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Drug chem toxicol.*2004 Feb; 27(1): 15-26.
- 35- Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Eslami B. Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of *ferula gummosa* boiss. *Grasas y Aceites.* 2010 Apr; 61(3): 244-250.
- 36- Vanzyl RL, Seatlholo ST, VanVuuren SF, Viljoen AM. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *J essent oil res.* 2006 Jul; 18: 129-133.