Effect of Carbamazepine drug on formation of decidual tissue in femal of *Mus musculus*

تأثير عقار الكاربامازبين على تكوين النسيج الساقطى فى أنثى الفئران البيضاء

شيماء مالك[1] أكرم يوسف ياسر[2] نهلة عبد الرضا البكري[3]
[1]قسم علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة [2] كلية طب الأسنان
جامعة كربلاء [3] كلية التربية ابن الهيثم جامعة بغداد
بحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

الخلاصة

يعد غرس الكيسة الاريمية واحدة من العمليات الحساسة فى حياة الجنين النامى.لذا فأن هذه المرحلة الحرجة ممكن ان تكون تحت التهديد من العديد من العقاقير ذات التأثير الضار ومنها عقار الكاربامازبين والذى تتناوله كثير من الامهات لعلاج حالات الصرع .لذلك تم عمل تلك الدراسة الحالية لمعرفة تأثير هذا العقار على عملية الغرس وخاصة فى اليومين السابع والتاسع من الحمل.وقد استخدم فى هذه التجربة 169 أنثى حامل من الفئران البيضاء وبمعدل اوزان25 غم .قسمت الفئران الى مجموعتين مجموعة تحكم جرعت وعن طريق الفم بمحلول الملح الفسيولوجى واخرى مجموعة معاملة جرعت وعن طريق الفم بعقار الكاربامازبين بتركيز 15ملغم / كغم .تم عمل مقاطع نسجية من اجزاء ارحام الفئران الحاوية على الجنين بعد تثبيتها بمحلول بوين وقطعت مقاطع البارافين بسماكة تتراوح ما بين (5-8) مايكرون ولونت المقاطع بملون الهيموتوكسلين والايوسين وبملون الكروم الثلاثى.
أظهرت نتائج البحث عدم وجود تأثير لعقار الكاربامازبين على الغرس وتكوين النسيج الساقطى المصاحب لها . وكان ذلك بتطابق نتائج مجموعتى التحكم والمعاملة وكان ذلك جليا بغرس الكيسة الاريمية وتكوين النسيج الساقطى وبأنتشارغزيرللاوعية الدموية فى مكان الغرس . دللت هذه النتائج على حصول النجاح فى الحمل فى المرحلة الاولى منه .

ABSTRACT

Implantation of blastocyst is considered as a sensitive process in the life of growing embryo. Thus this critical period could be under threat from the harmful effect of many drugs ,among them is the carbamazepine which is used by many women for a treatment of epilepsy .
The present experiment was designed to study the effect of this drug on the process of implantation ;especially during the days 7 and 9 of pregnancy. For those purpose 169 pregnant albino mice, of 25 gm weight for each one, were used .The mice were divided into control group given orally normal saline, and treated group given orally carbamazepine with concentration of 15 mg\kg. Samples from pregnant uteri containing the embryos were used. They were first fixed in Boun's solution and 5-8 um paraffin sections were cut to be stained with H and E and one step trichrome stains.
The results from control group and treated group have demonstrated that there was no effect of the drug on the process of implantation and the formation of decidual tissue which accompanied the implantation. Both control group and treated groups were showing the same results.
In addition to that the blood vessels were well developed at the site of implantation. All these results were signs of success of early period of pregnancy.

المقدمة

تتميز فترة الحمل بأنها من الفترات الحرجة التي تتعرض فيها الأم الحامل إلى العديد من التأثيرات, واشد ما تكون عليه هذه التأثيرات هي في الفترة المسماة بالفترة الجنينية Embryonic period , والتي تمتد في الإنسان من مرحلة البيضة المخصبة لغاية الأسبوع الثامن من الحمل. وخلال الفترة الجنينية تحدث عملية فى غاية الاهمية الا وهى غرس الكيسة الاريمية . الغرس هو عملية تفاعل فسلجي بين الكيس الارومي Blastocyst وبطانة الرحم Endometrium وتشتمل على تغيرات في بطانة الرحم تختلف حسب نوع التسخيد Placentation. ويعقب ذلك انطمار الكيسة الاريمية فى داخل بطانة الرحم ,وخلال الغرس تتحفز الخلايا السدوية لبطانة الرحم Endometrial Stromal Cells لتكوين النسيج الساقطي Decidualtissue . و توصف التغيرات التي تحدث في السدى عند حدوث التفاعل الساقطي بأنها تغيرات تحت تأثيري هرمون البروجسترون اولا والاستروجين ثانيا [1].

ان اهمية النسيج الساقطى تأتى من دوره فى تغذية الجنينفى المراحل المبكرة من الحمل قبل تكوين المشيمة بسبب تراكم الكلايكوجين Glycogen في خلاياه [2, 3] وكذلك له دور مهم فى الحد من الانغراس الزائد للكيسة الاريمية فى الرحم [4] , ويلعب دورا فى حماية الجنين من الجهاز المناعى للام [5]

تعد عملية الغرس من الاحداث المهمة في الحمل والخطوة الرئيسية التي تؤسس لتكوين المشيمة placenta ونجاح الحمل [6] وهذا يعنى انها حاسمة لمستقبل التكوين الجنيني[7] .ان عملية الغرس في الفئران تحدث فى اليوم الخامس والنصف من الحمل. ونظرا لحساسية موقف الحامل خلال فترة الغرس لذا كان من المفروض ان تبتعد الحامل عن كل ما يسبب الضرر للجنين . وهذه المسببات اوجزها علم الاجنة بما يسمى Teratogen وهي ذات انواع متعددة ومنها العقاقير التي تضطر الام الحامل الى تناولها ومن هذه العقاقير هو عقار الكاربامازبين (Carbamazepine (CBZالذي يعطى لعلاج الصرع Epilepsy يتداخل عقار الكاربامازبين مع السيلات العصبية Nerve impulses في الدماغ و المسؤولة عن الصرع والالم , وبما ان(CBZ) متعادل كيمائياً وهو ذائب في الدهون فهذا يمكنه من المرور بسهولة خلال حاجز دم الدماغ (blood – brain barrier) وبقية الاغشية في الجسم [8] .

اظهر عقارالـ (CBZ) خصائص مضادة للأختلاج في الجرذان والفئران مع الحث الكهربائي والكيميائي للصرع , يظهر نشاطه من خلال تقليل الاستجابات المشبكيةSynaptic responses المتعددة , إذ يخفض بصورة كبيرة الالم المحث بواسطة تنبيه عصب تحت الحجاج Infraorbital nerve في الجرذان , كما و يخفض الوسع المهادي Thalamic potential والبصلي bulbar والمنعكسات المشبكية , ويؤثر هذا العقار(CBZ) على فولتية قنوات الصوديوم voltage –dependent sodium channel في الخلايا [9]

ويرتبط حوالي 75% من الكاربامازبين مع بروتينات البلازما , وان درجة ارتباطه بالبروتين تختلف قليلاً بأختلاف الانواع , وهو يتأيض في الكبد Liver بواسطة عملية الاكسدة Oxidation قبل ان يطرح في الادرار إذ إنّ الايض الرئيسي للعقار هو Carbamazepine – 10,11-epoxide, وان حوالي1% فقط من الجرعة المعطاة تطرح بشكل غير متأيض[10] .

أشارت بعض الدراسات الى زيادة ايض عقارالكاربامازبين خلال مدّة الحمل ,إذ يعبرهذا العقار الى المشيمة ويصل الى الجنين خلال المدّة الجنينية ويزول بسرعة بعد الولادة[11].

وضعت هذه الدراسة لمعرفة تأثير عقار الكاربامازبين على غرس الكيسة الاريمية و تكوين النسيج الساقطى .

المواد وطرائق العمل

العقار المستخدم

استخدم في هذه الدراسة عقار Carbamazepine تم انتاجه في سويسرا من قبل شركة نوفارتس Novartis pharma AG, Basle, Switzer land والذي يستخدم كعلاج مضاد للصرع Antiepileptic والمادةالفعالة 5H-dibemzo [b,f] azepine- 5- carboxamide [12] و كل قرص يحتوي 200 ملغم.

تضمنت التجربة استخدام 169 انثى فأر ابيض من الضرب Balb/c, اختيرت الفئران بعمر (2.5-3) شهر كان معدل اوزانها (25)غم, وكانت بحالة صحية جيدة, وضعت الحيوانات تحت ظروف مختبرية ملائمة من حيث درجة الحرارة والتهوية والاضاءة , قسمت الفئران الى مجموعتين وكالاتي:

اولاً: مجموعة التحكم : شملت (65) انثى حامل جرعت المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal Saline (Nacl 0.9% .

ثانياً : مجموعة المعاملة : شملت (104) انثى حامل جرعت عن طريق الفم عقار الكاربامازبينcarbamazepine بتركيز 15ملغم/ كغم من وزن الجسم ابتداءً من اليوم الذي تظهر فيه السدادة المهبلية Vaginal plugحيث اعتبر اليوم الذي لوحظ فيه السدادة المهبلية هو اليوم صفر من الحمل واليوم الذي يليه هو اليوم الاول من الحمل [13, 14]إذ جرعت مجموعة لمدة سبعة ايام واخرى لمدة تسعة ايام .

استخدمت مادة الكلوروفورم المخدرة لقتل الاناث الحوامل من مجموعة التحكم ومجموعة المعاملة فى اليومين السابع و التاسع من الحمل . تم وضع قطع من الارحام الحاوية على الاجزاء التى حصل فيها الغرس فى مثبت بوين المائي Aqueous Bouins وبقيت فيه لمدة (12-24) ساعة.

تم تحضير المقاطع النسجية بسماكة (5-8) مايكرون لونت بالملونات الاتية:

1. الهيموتوكسلين والايوسين لتوضيح البنيان النسجي العام .
2. Gomoris one step trichrome ملون الكروم الثلاثى ذو الخطوة الواحدة لاستظهار الالياف الغراوية.

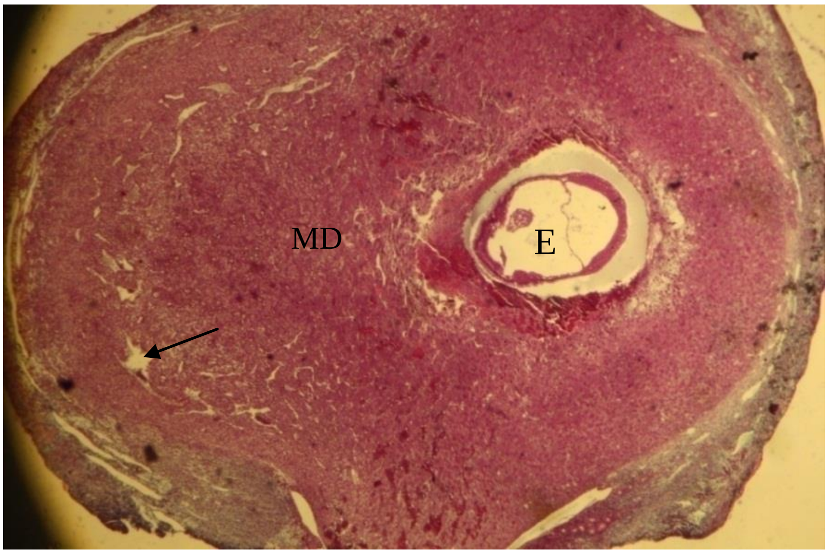
النتائج

اليوم السابع من الحمل:

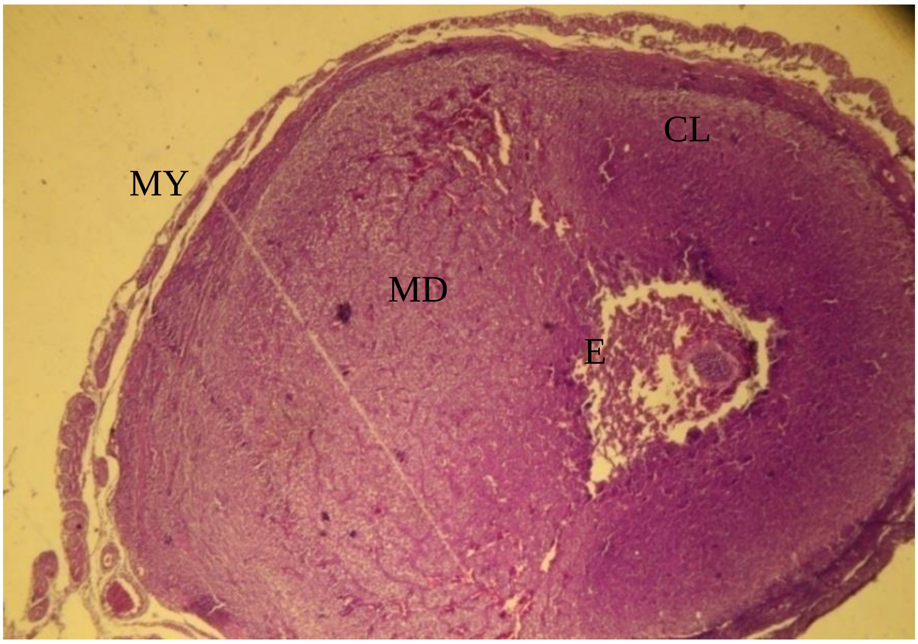
تم تحديد مكان الغرس للكيسة الاريمية في بطانة الرحم والتى تمثل البدايات الاولى للجنين فى فئران مجموعة التحكم لليوم السابع بوجود انتفاخات عقدية تشبه خرز المسبحةBeaded appearance على طول قرنى الرحم .

النتائج النسجية

أظهرت المقاطع النسجية لمكان الغرس في اليوم السابع من الحمل في كلتا مجموعتي التحكم والمعاملة نتائج متشابهة من حيث تكوين النسيج الساقطي في الحمل الطبيعي (شكل 2,1) وكان ذلك متمثلا بتحور خلايا السدى لبطانة الرحم, والتي معظمها خلايا مولدة للالياف fibroblasts, وتمايزها إلى خلايا النسيج الساقطي وكان هذا التغيير واضحا خلال هذا اليوم في المنطقة المساريقية لبطانة الرحم.لقد ظهر النسيج الساقطي في هذه المنطقة على شكل خلايا كبيرة كثيرة العدد مكتنزة ومتراصة ونتيجة لذلك فقد انعدم وجود الفسح ما بين الخلايا وانتشر وجود الجيوب الدموية على المنطقة القريبة من الكيسة الاريمية المغرسة وبين المقطع النسجي لهذا اليوم كذلك امتداد الجيوب الدموية إلى المثلث المساريقي الرحمي (شكل 1) .



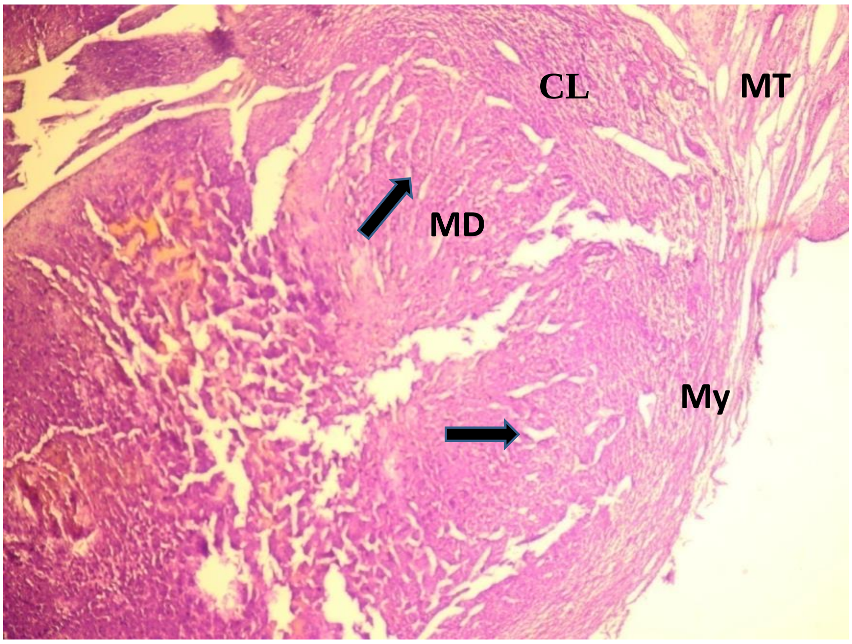
شكل رقم 1: مقطع مستعرض من جنين فأر عمر 7 يوم من الحمل في مجموعة التحكم ، لاحظ الجنين (E) , وهو محاط بالنسيج الساقطي (MD) , السهم ← يشير الى الجيوب الدموية في النسيج الساقطي المساريقي ملون الكوموري الثلاثي الالوان ، 4X .



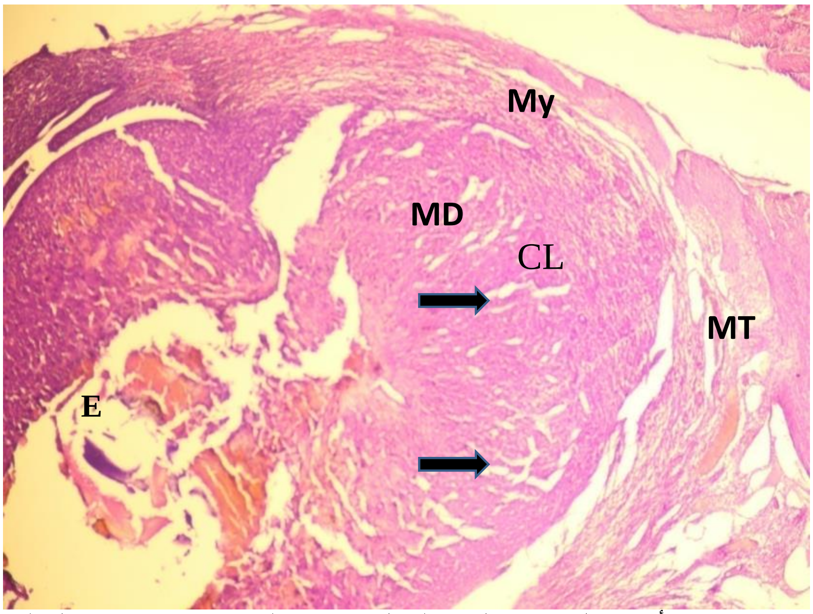
شكل رقم 2 : مقطع مستعرض من رحم فأرة حامل يبين فيه الجنين بعمر 7 يوم من الحمل. مجموعة المعاملة بعقار الكاربامازبين تركيز 15mg/kg , لاحظ وجود طبقة خلوية رقيقة(CL) ما بين الطبقة العضلية للرحم (MY) والنسيج الساقطي(MD) .
ملون الهيموتوكسلين و الايوسين(H& E) ، 4X .

اليوم التاسع من الحمل:

كان النمو واضحا فى النسيج الساقطى وخاصة فى المنطقة المساريقية من بطانة الرحم فى مجاميع السيطرة والمعالجة .ظهر النسيج الساقطى المساريقى فى المنطقة المحصورة ما بين الطبقة العضلية للرحم من جهة والجنين من جهة أخرى وكان المثلث المساريقى الرحمي واضحا في هذا اليوم من الحمل. مثل هذا المثلث الطريق الذي تسلكه الأوعية الدموية المغذية للرحم .شوهد كذلك وفرة في الأوعية الدموية في هذه المنطقة والتي كانت تأخذ مسارا متعرجا ومتوازية مع بعضها البعض (شكل 3 و4) .لقد لوحظ أن مسار هذه الأوعية الدموية هو بأتجاه مستمر مع الأوعية الدموية الكبيرة القادمة من المثلث المساريقى الرحم . لقد مثلت الأوعية الدموية للمثلث المساريقى الرحمي المصدر الأساس المجهز للدم للرحم ككل .أما الجنين فقد كانت الزيادة فى نموه واضحة عن اليوم السابع (شكل 3 و4).



شكل رقم 3: مقطع مستعرض من رحم فأرة بعمر 9 يوم من الحمل من مجموعة المعاملة بعقار الكارباماز بين تركيز 15 mg/kg ،لاحظ النمو الواضح للنسيج الساقطى المساريقى الرحمى (MD) ووفرة الاوعية الدموية فيه واتجاهها الى المثلث المساريقى الرحمى(MT)وكذلك طبقة خلوية رقيقة(CL) ما بين الطبقة العضلية للرحم(MY) والنسيج الساقطى ,السهم يشير الى الاوعية الدموية . ملون الهيموتوكسلين و الايوسين (H & E) ، 40X .



شكل رقم4:مقطع مستعرض من رحم فأرة حامل فى تسعة من الحمل يبين فيه الجنين(E)من مجموعة المعاملة بعقار الكاربامازبين تركيز 15 mg/kg وكذلك النسيج الساقطى(MD) الذى يتجه بمعظمه نحو المثلث المساريقى الرحمى(MT)،لاحظ وجود طبقة خلوية رقيقة(CL) ما بين الطبقة العضلية للرحم (MY) والنسيج الساقطى , السهم يشير الى الاوعية الدموية , ملون الهيموتوكسلين و الايوسين (H & E) ، 40X .

المناقشة

بينت نتائج الدراسة الحالية جملة من الملاحظات حول عملية الغرس وما صاحبها من تكوين للنسيج الساقطى وهل كان هنالك اى تأثير لعقار الكاربامازبين في منع حدوث تكون النسيج الساقطى.

كان من الواضح ومن خلال نتائج البحث الحالى عدم تعارض العقار المستخدم مع عملية الغرس و يعتبر هذا النجاح من العمليات المهمة فى الانتقال بالحمل من مرحلة الى اخرى ونعنى بذلك الانتقال بالحمل من المرحلة الجنينية الى مرحلة لاحقة . لقد كان واضحا من نتائج البحث الحالى ان الخطوات الطبيعية لمرحلة الحمل خلال فترة الغرس قد اخذت مسارها الطبيعى . فقد تم الغرس للكيسة الاريمية وتكون الجنين وصاحب ذلك تكوين النسيج الساقطى وهذا يعنى اشارة مهمة الى نجاح الحمل على الاقل فى هذه الفترة. وهذا يتوافق مع ما توصل اليه عدد من الباحثين خلال تتبعهم لتعريف الحمل الناجحفى الحالة الطبيعية وخلال مراحله المختلفة ومنها نجاح مرحلة الغرس وما يعقبها من تكوين للنسيج الساقطى[16,15]، وحيث أن عملية الغرس فى الفئران كانت قد بدأت خلال اليوم الخامس من الحمل [17] وقد اعقب اتصال الكيسة الاريمية بعملية الغرس واحدة من العمليات المهمة لانجاح الحمل الا وهى عملية تكوين النسيج الساقطى[17, 18] والتى تميزت كما ذكر الباحثون الاخيرون بزيادة عدد خلايا السدى الرحمى واكتنازها وتمايز السايتوبلازم الخاص بها واعقب ذلك تراص هذه الخلايا . وهذا التسلسل فى خطوات تكوين النسيج هو بالضبط ما حصل فى مجاميع التحكم والمعاملة للبحث الحالى. ان زيادة اعداد الخلايا هو نتيجة التأثيرات الهورمونيةالتى اثرت على الخلايا الاصلية وهى الخلايا المولدة للالياف الموجودة فى بطانة الرحم واعقب ذلك تمايز السايتوبلازم الخاص بها , وفى النهاية تتراص هذه الخلايا مع بعضها البعض[19] .ان تمايز هذه الخلايا هو نتيجة اكتساب السايتوبلازم لعضيات سايتوبلازمية منتجة للبروتين مثل الشبكة الاندوبلازمية المحببة وجهاز كولجي والمايتوكوندريا حيث ان الخلايا الساقطية تكون وخلال الحمل مسؤولة عن انتاج كثير من المواد مثل الدهون Lipids و الكلايكوجين Glycogen[21,20] والتى تعتبر مهمة فى ديمومة واستمرار الحمل [22] .

ان تراص خلايا النسيج الساقطى هو لاكتساب الغشاء الخلوى لخلاياه لانواع من الترابط الخلوى مثل الترابط المصمت Tight junction[23,3] والذى يساعد كما ذكر الباحثون الاخيرون على عدم نفاذية النسيج الساقطى وهذا سوف يمنع اية مواد ضارة قادمة من الام من الوصول الى الجنين [24] اضافة الى تموضع النسيج الساقطى كسد بوجه الاندفاع الزائد للجنين وخلاياه الغاذية Trophoblastsوالتى عادة ما تهاجر من الجنين الى نسيج الام ولكن ضمن نظام وعدد محسوب [26,25].

كما لوحظ تميز النسيج الساقطى المسار يقي الرحمي ,كما بينت نتائج البحث الحالى, بكثرة الاوعية والجيوب الدموية وامتدادها مع الأوعية الدموية الأكبر في المثلث المساريقي الرحمي وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحثون[28,27,4] في توصيفهم للتسلسل الطبيعي لخطوات الحمل الطبيعي ومدى حاجة الجنين النامي للامداد الدموي لأجل النمو والانتقال بالحمل من مرحلة إلى أخرى .

References المصادر

1. Sposito , D.R. and Santos , A.R.Jr. (2011) . Histochemical study of early embryo implantation in rats . Int. J. Morphol. 29 (1) : 187- 192.
2. Cross, J.C. and Mickelson, L. (2006). Nutritional influences on implantation and placental development. Nut. Rev. 64: 72–91.
3. Jones, C.J.P.; Carter, A.M.; Aplin, J.D. and Enders, A.C. (2007).Glycosylation at the fetomaternal interface in hemomonochorial placentae from five widely separated species of mammal: is there evidence for convergent evolution? Cells, Tiss. org. 185:269-84.
4. Wooding, P. and Burton, G. (2008). Comparative placentation . Structures, functions and evolution. Berlin, Springer-Verlag, pp. 320-365 .
5. Scott, M.A.; Liu, I.K.; Overstreet, J.W. and Enders, A.C. **(2000).** The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy. J. Rep. Fer. Suppl. :415-21.
6. Deb , K. ; Reese , J. and Paria , B. C. (2006) . Methodologies to study Implantation in mice . Methods in MolecularMedicine . 121 : 9-34 .
7. Bai , Z. K. ; Tian , C. ; Cao , Y. K. and Luo , J. L. (2013) .Histochemical study of early Embryo Implantation in mice . Advanced Materials Research . 641-642 : 769-772.
8.Afshar , M. ; Moallem , S. A.; Baharara , J.; Takjo , T. and Golalipour , M.J. (2011) . Effect of vitamine B6 on the Developmental Toxicity of Carbamazepine in Mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences . 14 (2) : 99-106 .
9.Costa , L.G.;Aschner, M.; Vitalone, A.;Syversen , T. and Soldin ,O. P. (2013). Developmental Neuropathy of Environmental Agents. Annu Rev pharmacolToxicol . 44: 87-110.
10. Ambrosio , A. F. ; Soares_Da_ Silva , P. ; Carvalho , C. M. and Carvalho, A. P. (2002) Mechanisms of Action of Carbamazepine and its Derivatives , Oxcarbazepine , BIA 2-093 , and BIA 2-624 . Neurochemicals Research , 27 (1-2):121-130 .
11. Bertilsson , L. and Tomson , T . (1986) . Clinical pharmacokinetics and pharmacolgial effect of Carbamazepine - 10 , 11 epoxide . An update . Clinical Pharamcokinetics . 11 (3) : 177 - 98 .
12. Kalant , H. ; Grant , D.M. and Mitchell , J. (2007) . Principles of Medical Pharmacology . Seventh edition . Elsevier Canada . Pp.228 – 231 .
13. Waterman, R.E. (1976) . Topographical changes along the neural fold associated with neurulation in the hamster and mouse .Am. J.Anat. 146 : 151- 172 .
14. Biernacki, B.; Wfodarczyk , B. and Minta , M. (2000) . Effect of sodium valproat on rat embryo development in vitro . Bull. Vet. Ints. Pulaway . 44 :201 – 205 .
15. Jones, C.J.; Enders A. C. and Fazleabas, A.T. (2001). Early implantation events in the baboon (*Papioanubis*) with special reference to the establishment of anchoring villi.. Placenta. 22: 440- 56 .
16. Herington , J.F. ; Underwood , T. ; McConaha, M. and Bany , B. M. (2009) . Paracrine Signals from the Mouse Conceptus Are Not Required for the Normal Progression of Decidualization . Endocrinology . 150 (9) : 4404- 4413 .
17. Abrahamsohn, P.A. and Zorn , T.M. (1993). Implantation and decidualization in rodents. J. Exp. Zool. 266:603–628.
18. Wang, X.; Matsumoto, H.; Zhao, X.; Sanjoy, K.D. and Paria, B.C. (2004). Embryonic signals direct the formation of tight junctionalpermeability barrier in the decidualizingstroma during embryo implantation. J. Cell Sci. 117:53-62.
19. Kleinfeld , R.G.;Morrow ,H.A. and Defeo, V.J. (1976) . Intercellular Junctions between decidual cells in the growing deciduoma of the pseudopregnant rat uterus . Biology of reproduction . 15: 593- 603.
20. Enders, A.C. and Schlafke, S. (1967). A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Am. J. Anat. 120: 185-226.

21. Schoenwolf , G.C. (2009) . Larsen's Human Embryology . fourth edition . Philadelphia , P.A. : Churchill Livingstone . P.P.53.
22. Sara, S.M; Pauline, Yi. and Laura, T.G. (2012). "Endometrial Stem Cells and Reproduction," J. Obs. Gyn. Inter., V. pp.5.
23. Parr, M.B. and Parr, E.L. (1986). Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: studies using fluorescent-labeled proteins and dextrans. Biol. Rep. 34:393–403.
24. Singh, H. and Aplin, J.D. (2009). Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. J. Anat. 215: 3- 13.
25. Osol,G. and Mandala, M. (2009). Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy . Physiol. (Bethesda) 24: 58–71.
26. Pijnenborg, R. and Vercruysse, L. (2010). Animal models of deep trophoblast invasion. In: Placental bed disorders, 1st ed. R Pijnenborg, I Brosens, and R. Romero (eds.). Cambridge Uni. Press, Cambridge.pp: 127-140.
27. Carter, A.M. ; Enders, A.C.; Jones, C.J.P.; Mess , A. ; Pfarrer, C.; Pijnenborg, R. and Soma, H.(2006). Comparative placentation and animal models: patterns of trophoblast invasion - A workshop report. Trophoblast research Placenta. Suppl 1, 27:30-33.
28. Enders, A.C.; Blankenship, T.N.; Fazleabas, A.T. and Jones, C.J. (2001).Structure of anchoring villi and the trophoblastic shell in the human, baboon and macaque placenta. Placenta. 22: 284-303 .