

بررسی اثرات ناهنجاری زایای داروی بوتاکس (Botox) بر روی جنین های موش BALB/c در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری

مریم یگانه نسب^۱، پروین تراب زاده^۲، ناصر هرزندی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی-تکوینی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران.

۲- استادیار زیست شناسی سلولی-تکوینی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران. Torabzadeh@kia.ac.ir

۳- استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۵

چکیده

مقدمه و هدف: بوتولینوم (بوتاکس)، شکل خالص و آماده شده سم باکتری کلستریدیوم بوتولینوم است که امروزه به میزان زیادی در مصارف زیبایی و کاربردهای درمانی فراوانی برای سردردهای میگرنی، بیماری‌های تشیمتگاهی، دردهای مزمن لگنی، مشکلات دستگاه ادراری، تعریق بیش از اندازه و غیره استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی اثرات ترانوژنیک داروی بوتاکس بر روی جنین های موش BALB/c در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری است.

روش کار: پس از تهیه دارو دوز کشنده (LD50) در شرایط *in vivo* (۲۲ mg/kg.bw / ۱۲) تعیین شد. با در نظر گرفتن دوز آستانه‌ای به مقدار ۳/۵۵ mg/kg.bw آزمایشات ادامه یافت. تزریقات در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری به صورت درون صفاقی به موش‌های BALB/c انجام گرفت. هم‌زمان با گروه‌های تجربی، ۲ گروه کنترل و شم نیز برای مقایسه جواب‌ها در نظر گرفته شد. برای اطمینان از جواب حاصله تجربیات فوق ۳ بار تکرار و داده‌ها توسط نرم افزار SPSS با روش ANOVA مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بررسی نتایج بیان‌گر آن بود که بیشتر جنین‌ها دارای ناهنجاری‌هایی از قبیل: خونریزی‌های شدید زیر پوستی، خونریزی‌های شدید جفتی، بیرون‌زدگی مغز (اکزانسفال)، بیرون‌زدگی کبد (اکزوهپاتیک)، عدم تشکیل اندام حرکتی، نقص در اندام حرکتی، پولیپ انگشت دست، سین داکتیلی (چسبندگی انگشتان دست و پا)، در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری بودند. نتیجه گیری: شواهد نشان دهنده این است که از سم بوتولینوم در دوران بارداری به خاطر اثرات جبران ناپذیر آن هم‌چون ایجاد ناهنجاری‌های مختلف جنین استفاده نشود.

واژه‌های کلیدی: بوتاکس، جنین، بارداری، ترانوژنیک.

مقدمه

کلستریدیوم دارای گونه‌های زیادی از جمله گونه کلستریدیوم بوتولینوم، عامل بوتولیسم است که بیشترین کاربرد را در جوامع امروزی دارد استفاده شده است (۱۶، ۱۸، ۱۰، ۵، ۶، ۳، ۲). از آنجایی که سم بوتولینوم بر سیستم کولینرژیک در ناحیه انتهایی پیش سیناپسی موثر بوده و با توقف ترشح استیل کولین در فضای عصب - عضله منجر به فلج می‌گردد، این سم می‌تواند در تسکین انواع دردها موثر باشد. سم بوتولینوم پروتئینی به وزن ۱۵۰ کیلو دالتون بوده که به

امروزه استفاده از سم بوتولینوم *Botulinum* برای درمان انواع دردها، در برابر عوارض جانبی ناخواسته در اثر مصرف داروهای شیمیایی ترکیبی مورد توجه قرار گرفته است. با وجود این که سم کلستریدیوم بوتولینوم *Clostridium botulinum* به صورت معمول یک ماده کشنده است اما می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی موثر و قدرتمند مورد استفاده قرار گیرد (۶، ۵، ۳، ۲). باکتری کلستریدیوم بوتولینوم از جنس *Clostridium* از خانواده *Clostridiaceae* می‌باشد. باکتری

می شود (۱۱). سم بوتولینوم دارای خواص درمانی از قبیل: درمان اسپاسم های پلکی بلفارواسپاسم (۵)، موثر بر روی فلج حاد عصب زوج شش مغزی (۶، ۴، ۲)، استرابیسم (۲۵)، درمان سردرد (۱۶)، عرق بیش از حد زیر بغل و کف دست (۱۹، ۶، ۲)، باز شدن چین و چروک صورت (۲۰)، درمان فعالیت بیش از حد ناشناخته دترسور (مثانه بیش از حد فعال) (۲۴، ۱۵، ۱۰)، درمان عارضه ریناود (تنگی عروق) (۲۱)، درمان دردهای مزمن لگنی (۱۳)، درمان بیماری شقاق مزمن مقعدی و فیشر (۹، ۷، ۳)، درمان آشالازی (اختلال مری) (۲۱)، درمان درد نورالژی بعد از زونا (۸) و درمان ریفلاکس معده به مری (۱۲) می باشد. Fels و همکاران در سال ۲۰۱۲ تاثیر سم بوتولینوم را در دوران بارداری و روی بیماری آشالازی (اختلال در مری) بررسی کردند و بیان داشتند که بیماری آشالازی در دوران بارداری با تزریق سم بوتولینوم بهبودی حاصل کرده است. البته در این مقاله بیان شده که در ۳ ماهه اول بارداری از این سم استفاده نشود زیرا باعث سقط خود به خودی جنین می شود (۲۱). Morgan و همکاران در سال ۲۰۰۶، Ta و همکاران در سال ۲۰۱۳، Aesthet در سال ۲۰۰۹ طی پژوهش هایی تاثیر سم بوتولینوم A را در طول بارداری بررسی و بیان کردند تزریق این سم در دوران بارداری در سه ماهه اول بارداری منجر به سقط خود به خودی جنین و ناهنجاری زایی می گردد. هم چنین این تزریق ها روی خرگوش های باردار در روز ششم و روز سیزدهم بارداری موجب مسمومیت شدید مادرزادی، سقط جنین و ناهنجاری های مادرزادی و کاهش وزن جنین می شود (۲۶، ۲۲، ۱۴). با توجه به مطالعات صورت گرفته در این تحقیق اثرات داروی بوتاکس بر ناهنجاری زایی ظاهری جنین و بعضی از شاخص های رشدی کمی موش BALB/c مورد بررسی قرار گرفته است.

طور اختصاصی بر روی اعصاب کولینرژیک اثر گذاشته و مانع از آزادسازی نوروترانسمیتر استیل کولین و در نهایت سبب فلج می گردد. این سم در ابتدا به صورت یک زنجیره پلی پپتیدی ساخته شده سپس تحت تاثیر پروتازها به زنجیره سبک (۵۰ کیلو دالتون) و زنجیره سنگین (۱۰۰ کیلو دالتون) شکسته و دارای یک پیوند دی سولفیدی می شوند. این پروتئین شامل ۳ بخش عملکردی شامل بخش آنزیمی با فعالیت کاتالیتیکی که همان زنجیره سبک (بخش عملکردی سم) می باشد، بخش انتقال دهنده که نیمه انتهای آمینی زنجیره سنگین است و بخش اتصال دهنده که نیمه انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین را تشکیل می دهد، است (۱۱). مرحله اول، اتصال بخش اتصال دهنده با گیرنده های سطح سلولی قرار گرفته بر روی غشای پری سیناپتیک، این امر منجر به ورود سم به داخل سیناپس با پروسه آندوسیتوز می شود. مرحله دوم، ایجاد کانال توسط بخش انتقال دهنده بر روی غشای آندوزومی است و مرحله سوم ورود بخش عملکردی به داخل سیناپس می باشد که از طریق کانال ایجاد شده توسط بخش انتقال دهنده در غشای آندوزوم صورت می گیرد. سم بوتولینوم دارای سه نوع سوبسترا است: پروتئین سیناپتوبرین (Vesicle Associated Membrane Protein {VAMP2}) که سوبسترای سروتیب های B, C, D, F بوده و پروتئین سیناپتو ۲۵ کیلودالتونی (SNAP25) که سوبسترای سروتیب های A, B, C بوده و سیناتاکسین که سروتیب C روی آن اثر می گذارد. بخش عملکردی سم بوتولینوم تیپ A بعد از ورود به سیناپس بر روی پروتئین SNAP25 در موقعیت اسید آمینه های گلوتامین ۱۹۷ - آرژنین ۱۹۸ اثر گذاشته و آن را لیز می کند و از این طریق مانع از اتصال وزیکول های حاوی استیل کولین به غشای سیناپس و در نهایت آزاد سازی آن از طریق اگزوسیتوز

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۴۰ سر موش ماده و ۱۵ سر موش نر BALB/c از موسسه سرم و واکسن سازی حصارک کرج تهیه گردید. پس از انتقال به محل انجام آزمایش ۲۰-۱۵ روز به حیوانات فرصت داده شد تا با محیط جدید سازگاری پیدا کنند. حیوانات در شرایط دمایی 21 ± 2 درجه سانتی گراد و تحت شرایط نوری استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و آب و غذا به صورت یکسان نگهداری شدند. در انجام کلیه تجربیات، برای اطمینان از بالغ بودن موش‌ها از موش‌های ماده بی تجربه ۱۰ هفته ای با وزن ۲۸-۲۵ گرم استفاده گردید. حیوانات به ۴ گروه (۳، ۴، ۵، ۶) روز بارداری (۴ تایی با ۳ بار تکرار تقسیم شدند. موش‌های گروه تجربی، کنترل و شم به صورت جداگانه با موش‌های نر در قفس‌های ویژه آمیزش

داده شدند. در دو قفس جداگانه سه موش ماده و یک موش نر (۱:۳) و یک قفس هم چهار موش ماده و یک نر (۱:۴) قرار گرفتند، شاخص جفت گیری و بارداری مشاهده پلاک واژنی یا اسپرم در واژن موش ماده در صبح روز بعد بود. پس از مشاهده پلاک واژنی روز صفر بارداری تعیین و موش‌های باردار از موش‌های نر جدا گشتند، دوزهای مختلفی از داروی بوتاکس جهت تعیین LD50 تزریق شد (جدول ۱). مقدار LD50 با روش (انتگرسیون دوپل) به میزان $12/22 \text{ mg/kg.bw}$ مشخص گردید (۱). به موش‌های گروه تجربی در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری دوز $3/55 \text{ mg/kg.bw}$ تزریق گردید. موش‌های گروه کنترل تزریقی دریافت نکرده و گروه شم تزریق آب مقطر در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری داشتند.

جدول ۱- مشخصات و مشاهدات مربوط به تعیین LD50

مشاهدات	دوز تزریقی (mg/kg.bw)	تعداد موش‌ها	موش‌های زنده	موش‌های مرده
تجربی	۷/۹۲	۴	۴	-
کنترل	----	۴	۴	-
تجربی	۹/۰۵	۴	۴	-
کنترل	----	۴	۴	-
تجربی	۱۰/۳۴	۴	۳	۱
کنترل	----	۴	۴	-
تجربی	۱۱/۸۱	۴	۲	۲
کنترل	----	۴	۴	-
تجربی	۱۳/۴۹	۴	۲	۲
کنترل	----	۴	۴	-
تجربی	۱۵/۴۱	۴	-	۴
کنترل	----	۴	۴	-

داروی بوتاکس با سرنگ انسولین یکبار مصرف در بالای کشاله ران و به صورت درون صفاقی تزریق گردید. در تمام تجربیات انجام شده به گروه شم نیز همان مقدار آب مقطر به صورت درون صفاقی تزریق شد. تزریق داروی بوتاکس در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶

بارداری در ساعت ۱۱-۱۰ صبح انجام گرفت. کلیه موش‌ها در روز ۱۵ بارداری به کمک کلروفرم کشته و سپس تشریح و جنین‌ها خارج گشتند. تعداد جنین‌های خارج شده در روز ۳ بارداری ۳۰ عدد، روز ۴ بارداری ۱۱ عدد، روز ۵ بارداری ۲۷ عدد، روز ۶ بارداری ۳۳

بیشترین بارداری در روز ششم اتفاق افتاده است (شکل ۱).

بحث و نتیجه گیری

داروی بوتاکس به صورت درون صفاقی به موش-های بالغ BALB/c تزریق گردید، زیرا در این روش ماده به سرعت جذب صفاق احشائی و سپس وارد کبد و سیستم گردش خون می شود. در ابتدا بر اساس نتایج بررسی های انجام گرفته، مقدار LD50 را به میزان ۱۲/۲۲ mg/kg.bw مشخص و جهت تعیین میزان نواحی عملکرد در سطح بافتی و اندام ها به میزان ۳/۵۵ mg/kg.bw به روش درون صفاقی در روزهای ۳،۴،۵،۶ بارداری یعنی روزهای قبل و بعد از لانه گزینی تزریق گردید. در پژوهش حاضر ناهنجاری های زیادی در اثر تزریق داروی بوتاکس در روزهای ۳،۴،۵،۶ بارداری، مشاهده شد به طوری که بیشترین ناهنجاری مربوط به روز ۳ بارداری (قبل از جایگزینی) با ۳۳/۶۳٪ بود. در توجیه این نتایج می توان گفت: در مطالعات انجام گرفته توسط Morgan و همکاران در سال ۲۰۰۶ با عنوان تاثیر سم بوتولینوم در دوران بارداری به این نتیجه رسیدند که سم بوتولینوم باعث ایجاد مسمومیت شدید مادرزادی، سقط جنین و ناهنجاری های مادرزادی می شود که با مطالعات ما مطابقت داشت (۲۲). بر اساس نتایج به دست آمده در روز ۳ بارداری حدود (۲۰٪)، روز ۴ بارداری (۹/۰۹٪)، روز ۵ بارداری (۷/۴۱٪)، روز ۶ بارداری (۱۸/۱۸٪)، از جنین ها آتروفیه شدند. وجود جنین های آتروفیه در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ نشان دهنده نقش داروی بوتاکس، در جلوگیری از تقسیم و تمایز سلولی می باشد. رحم موش های تجربی تزریقی روز سوم بارداری (۷۰٪)، روز چهارم (۹۰٪)، روز پنجم (۷۰٪)، روز ششم (۶۰٪) هیچ گونه آثاری از جنین آتروفیه وجود نداشته و فقط رحم ها بسیار ضخیم و متورم دیده شده که توقف

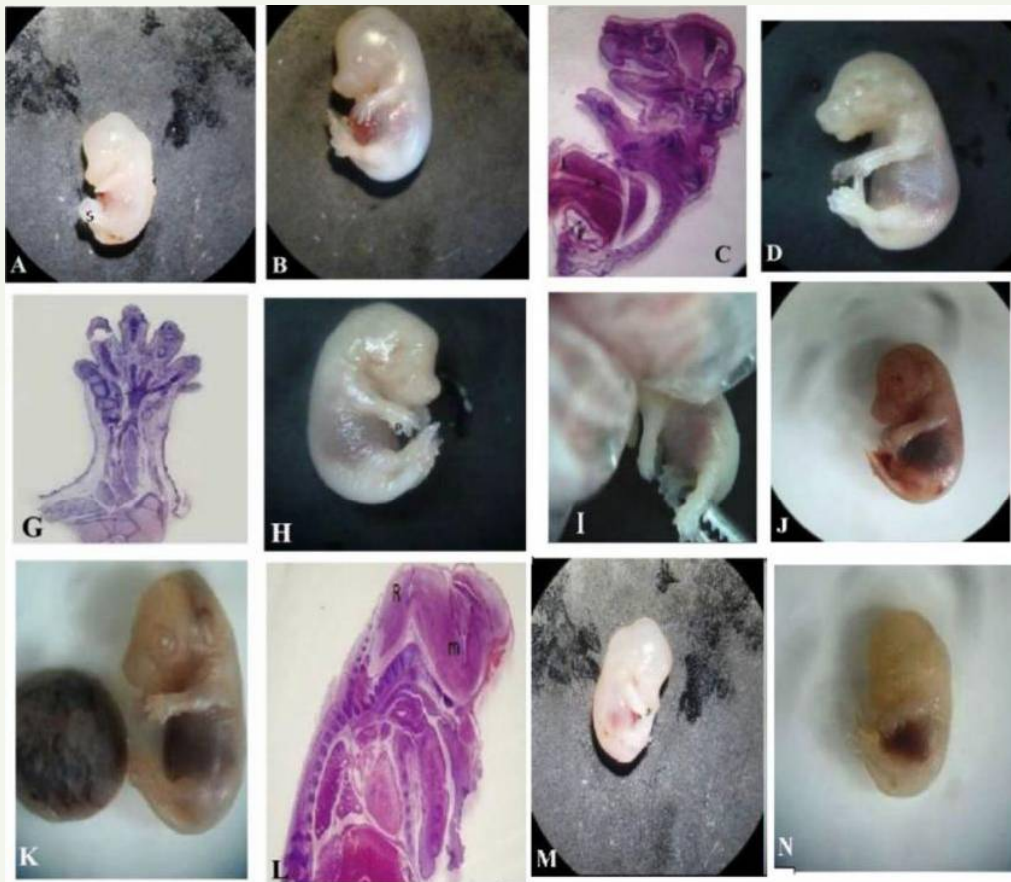
عدد بوده که نمونه ها پس از تثبیت شدن در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت جهت برش گیری و رنگ آمیزی آماده شدند.

نتایج

هدف از این تحقیق بررسی اثرات داروی بوتاکس با دوز ۳/۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات در دوران جنینی بر تغییرات مورفولوژیکی بود. نتایج نشان داد که تمامی ۷۰ جنین گروه کنترل و شم سالم بودند ولی در گروه تجربی در روز ۳،۴،۵،۶ بارداری ۱۰۰ جنین سالم و ناهنجر که تعداد و درصدهایی از انواع ناهنجاری های مختلف شامل آگروهپاتیک، آگزانسفال، سین داکتیلی، پولیپ، خونریزی جفتی، خونریزی پوستی، نقص انگشت پا، نقص انگشت دست، رشد ناقص جنین را داشتند، در روزهای مختلف بارداری مشاهده شده است (جدول ۲). در روز ۳ بارداری از ۱۰ موش تنها ۳ سر باردار شده که موش ۱ (۸ جنین)، موش ۲ (۱۳ جنین) موش ۳ (۹ جنین)، از ۳۰ جنین به دست آمده ۵ جنین سالم، ۱۹ جنین ناهنجر و ۶ جنین آتروفیه وجود داشت که بیشترین ناهنجاری در این روز مشاهده شده است. در روز ۴ بارداری از ۱۰ سر موش تنها یک بارداری اتفاق افتاده که از ۱۱ جنین به دست آمده ۴ جنین سالم، ۶ جنین ناهنجر، ۱ جنین آتروفیه شده وجود داشت. در روز ۵ بارداری از ۱۰ سر موش ۳ بارداری اتفاق افتاده که از موش شماره ۱ (۱۲ جنین)، موش ۲ (۱۰ جنین) و موش ۳ (۵ جنین)، از ۲۷ جنین به دست آمده ۸ جنین سالم، ۱۷ جنین ناهنجر، ۲ جنین آتروفیه شده وجود داشت. در روز ۶ بارداری از ۱۰ سر موش ۴ بارداری اتفاق افتاد که موش ۱ (۳ جنین)، موش ۲ (۸ جنین)، موش ۳ (۱۳ جنین)، موش ۴ (۹ جنین) و از ۳۳ جنین به دست آمده ۱۴ جنین سالم، ۱۳ جنین ناهنجر، ۶ جنین آتروفیه شده وجود داشت و

مانند موش، خرگوش باعث کاهش وزن، تاخیر در استخوان سازی، سقط جنین و ناهنجاری زایی می شود (۱۴). تحقیق ما با این مطالعات هم خوانی داشت. در این سری از تجربیات تزریق داروی بوتاکس با دوز $3/55 \text{ mg/kg.bw}$ باعث به وجود آمدن جنین های ناهنجر در سطح سیستم عصبی به صورت اگزانسفال مشاهده شده، به طوری که در روز سوم بارداری (۴۲/۱۱٪)، روز چهارم (۱۸/۱۸٪)، روز پنجم (۱۷/۶۵٪)، روز ششم (۲۳/۰۸٪)، این ناهنجاری مشاهده شد.

بارداری را نشان می دهد. به طوری که قطر هر سه لایه رحمی بسیار کم شده و لومن رحم و یا فضای داخل رحم گسترش پیدا کرده بود. احتمالاً مصرف داروی بوتاکس با دوز $3/55 \text{ mg/kg.bw}$ در دوران بارداری موجب برهم خوردن تعادل هورمونی شده و در موش- های ماده باعث ایجاد ناباروری شده است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Aesthet انجام شد تاثیر سم بوتولینوم در دوران بارداری مورد بررسی قرار گرفت و به این نتیجه دست یافتند که سم بوتولینوم در ۳ ماهه اول بارداری استفاده نشود. تزریق این سم در حیواناتی



شکل ۱- اثر بوتولینوم بر روی جنین های موش در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری

استریوفنومیکروگراف از جنین با ناهنجاری سین داکتیلی (A)، جنین با ناهنجاری اگزوهپاتیک (B,C)، جنین گروه کنترل (D)، جنین با ناهنجاری پولیپ (G,H)، جنین با ناهنجاری نقص انگشت پا (I)، جنین با ناهنجاری خونریزی پوستی و جفتی (K,J)، جنین با ناهنجاری اگزانسفال و رشد ناقص کل بدن (L,M,N).

جدول ۲- اثر بوتولینوم بر تعداد و درصد ناهنجاری های جنین های موش در روزهای ۳،۴،۵،۶ بارداری

انواع ناهنجاری	روز ۳ بارداری	روز ۴ بارداری	روز ۵ بارداری	روز ۶ بارداری
اگزوهپاتیک	٪ ۴۷/۳۷	٪ ۱۸/۱۸	٪ ۴۱/۱۸	٪ ۳۰/۷۷
اگزانسفال	٪ ۴۲/۱۱	٪ ۱۸/۱۸	٪ ۱۷/۶۵	٪ ۲۳/۰۸
سین داکتیلی	۵/۲۶٪	مشاهده نشد	۱۱/۷۶٪	مشاهده نشد
پولپ	مشاهده نشد	۲۷/۲۷٪	۱۱/۷۶٪	۹۲/۳۱٪
خونریزی جفتی	۳۶/۸۴٪	۹/۰۹٪	۷۶/۴۷٪	۷۶/۹۲٪
خونریزی پوستی	۷۸/۹۵٪	۴۵/۴۵٪	۱۰۰٪	۶۹/۲۳٪
رشد ناقص دست	۱۵/۷۹٪	مشاهده نشد	۱۱/۷۶٪	مشاهده نشد
رشد ناقص جنین	۱۰/۵۲٪	مشاهده نشد	۵/۸۸٪	مشاهده نشد
نقص انگشت پا	۵/۲۶٪	۱۸/۱۸٪	۱۱/۷۶٪	۷/۶۹٪
تعداد بارداری	۳	۱	۳	۴
تعداد کل موش	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد کل جنین	۳۰	۱۱	۲۷	۳۳
تعداد جنین سالم	۵	۴	۸	۱۴
تعداد جنین آتروفیه	۶	۱	۲	۶
تعداد جنین ناهنجار	۱۹	۶	۱۷	۱۳

که در روز ۳ بارداری (۴۷/۳۷٪)، در روز ۴ بارداری (۱۸/۱۸٪)، در روز ۵ بارداری (۴۱/۱۸٪) و در روز ۶ بارداری (۳۰/۷۷٪) و موش هایی که یک ماه بعد از تزریق باردار شدند (۵/۸۸٪) به علت تشکیل نشدن پرده صفاقی از سینه تا انتهای ناحیه شکمی موجب بیرون زدگی کبد در آنها شده است. در پژوهشی که توسط Tan و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت تاثیر سم بوتولینوم را در دوران بارداری بررسی و سقط و ناهنجاری های مختلف را در خرگوش مشاهده کردند. البته در زنان هم شواهدی از قبیل نقایص هنگام تولد، سقط خودبه خودی و سقط درمانی مشاهده شده است. تحقیق ما با این مطالعات هم خوانی داشت (۲۶). از سری تجربیات تزریق داروی بوتاکس با دوز ۳/۵۵mg/kg جنین هایی با ناهنجاری سین داکتیلی در دست و پا وجود داشت. به طوری که در روز ۳

احتمالاً پرده منمز در بخش های مختلف مغز نیز تشکیل نشده و بیرون زدگی مغز اتفاق افتاده است. با توجه به این نتایج می توان سم بوتولینوم را نوعی تراژون نوروتروپیک معرفی نمود. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ توسط Fels و همکاران انجام گرفت تحقیقاتی بر روی اثر داروی بوتاکس بر بیماری آسالازی (یک اختلال حرکتی عضله صاف مری است) بر روی زن حامله صورت گرفت که نتیجه آن درمان بیماری توسط سم بوتولینوم بوده ولی ذکر شده که این سم در ۳ ماهه اول بارداری تزریق نشود زیرا باعث سقط و ناهنجاری زایی می شود که تحقیق ما با این مطالعات مطابقت دارد (۱۷). در سری تجربیات تزریق داروی بوتاکس با دوز تزریق ۳/۵۵mg/kg در روزهای ۳،۴،۵،۶ بارداری و تزریقی های یک ماه قبل از بارداری ناهنجاری اگزوهپاتیک دیده شد به طوری

دهنده اثر داروی بوتاکس بر ساختارهای بافتی این اندامها است که می تواند دلیل بر تجمع سلولها در این نواحی باشد. به طوری که در روز ۴ بارداری (۲۷/۲۷)، روز ۵ بارداری (۱۱/۷۶)، روز ۶ بارداری (۹۲/۳۶) و در موشهایی که یک ماه بعد از تزریق باردار شدند (۱۱/۷۶) از این ناهنجاری دیده شد. همچنین ناهنجاری در اندام حرکتی، تشکیل نشدن اندام حرکتی، ناقص تشکیل شدن اندامها در روزهای ۳، ۴، ۵، ۶ بارداری، به ترتیب در روز ۳ (۱۵/۷۹)، روز ۴ (۷/۶۹) و موش-هایی که یک ماه بعد از تزریق باردار شدن (۱۱/۷۶) مشاهده گردید که با توجه به این نتایج می توان داروی بوتاکس را نوعی تراژون برای رشد و نمو اندام حرکتی معرفی کرد. سم بوتولینوم مستقیماً بر روی سمی شدن جنین در مرحله اندام زایی (جنین موش) تاثیر می-گذارد. تکوین اندام حرکتی زمانی شروع می شود که سلولهای مزانشیمی لایه جداره یا مزودرم سوماتیک صفحه جانبی و مزودرم میوتوم (بخشی از ستون مهره) با هم در زیر بافت اکتودرمی تجمع یافته و یک برجستگی به نام جوانه اندام حرکتی بوجود می آورد. اغلب سلولهای جوانه اندام حرکتی پس از انجام وظیفه ی خود دچار آپوپتوز شده و تنها سلولهای بیان کننده shh باقی می ماندند (۲۳). این سلولها ترجیحاً به استخوان، عضله، پوست ناحیه خلفی اندام حرکتی تبدیل می شوند. در حقیقت انگشتان ۴، ۵ و بخشی از انگشت ۳ اندام حرکتی خلفی موش توسط همین سلولها ی ترشح کننده shh بیان می شوند. هر چند این ژن به طور مستقل انگشتان را تعیین می کند اما ممکن است با واسطه BMP نیز عمل نماید که غلظت آنها نیز در تعیین انگشتان نقش دارد. پس می توانیم بیان کنیم که داروی بوتاکس به جوانه اندام حرکتی و ژنهایی که در آن قسمت باید برای تشکیل اندام و

بارداری (۵/۲۶)، روز ۵ بارداری (۱۱/۷۶) از این ناهنجاری دیده شد. تاثیر سم نشان می دهد مزانشیم بین انگشتان تحلیل رفته و در نتیجه انگشتان به هم چسبیده باقی مانده اند و آپوپتوز صورت نگرفته است. مرگ سلولهای بافت مزانشیم بین انگشتی در اثر آپوپتوز و به همراه قطعه قطعه شدن DNA ی آنها رخ می دهد. پیام آپوپتوز در ناحیه اتوپود (میچ و انگشتان دست یا میچ و انگشتان پا) توسط پروتئین های BMP ایجاد می شود. BMP7، BMP4، BMP2 همگی در مزانشیم بین انگشتان بیان و ممانعت از پیام رسانی BMP ها مانع از آپوپتوز ناحیه بین انگشتان می شود. از آنجایی که این BMP ها در طول مزانشیم ناحیه پیش رونده بیان می گردند به نظر می رسد که بایستی مرگ سلولی (به صورت یک پیش فرض اصلی) انجام شود، مگر این که BMP ها به صورت فعالی سرکوب شوند. عمل سرکوب BMP ها ممکن است توسط پروتئین Noggin (که توسط غضروف های در حال نمو انگشتان و سلولهای پریکوندریال احاطه کننده ی آن-ها ساخته می شود) اعمال گردد. اگر Noggin در سراسر جوانه اندام حرکتی بیان شود هیچ آپوپتوزی رخ نمی دهد. احتمالاً سم بوتاکس بر روی فعالیت ژن های BMP اثر مهاری داشته است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ توسط Newman و همکاران انجام گرفت تاثیر سم بوتولینوم را در درمان دیستونی در ۴ زن باردار در ۳ ماهه سوم بررسی کردند. بیمار با سم بوتولینوم درمان شد بدون این که هیچ تاثیری بر نتیجه بارداری داشته باشد. قابل ذکر است که سم بوتولینوم در سه ماهه اول بارداری طی پژوهشهایی که انجام گرفته موجب سقط، ناهنجاری های مختلف، مسمومیت مادرزادی، تاخیر در استخوان سازی و کاهش وزن جنین می شود (۲۷). در این سری از تجربیات مشاهده ناهنجاری در اندام حرکتی از قبیل برجستگی پوستی (پولیپ) نشان

خونریزی های پوستی، خونریزی های جفتی و ایجاد رحم متورم مشاهده شد.

در نتیجه گیری کلی می توان به موارد زیر اشاره نمود

۱- ناهنجاری سین داکتیلی که نشان می دهد مزانشیم بین انگشتان تحلیل نرفته و در نتیجه انگشتان به هم چسبیده باقی مانده و آپوتوز صورت نگرفته است. احتمالاً پیام آپوتوز در ناحیه اتوپود توسط پروتئین های BMP ایجاد می شود. BMP2, BMP4, BMP7 همگی در مزانشیم بین انگشتی بیان می گردند، و ممانعت از پیام رسانی BMP مانع از آپوتوز ناحیه ی بین انگشتی می گردد. احتمالاً سم بوتاکس بر روی فعالیت ژن های BMP اثر مهاری داشته است و از بیان آن جلوگیری کرده است.

۲- مشاهده ناهنجاری در اندام حرکتی از قبیل تشکیل نشدن اندام حرکتی دست و پا و تشکیل ناقص آن ناشی از تزریق داروی بوتاکس در روزهای ۳،۴،۵،۶ بارداری که می توان داروی بوتاکس را نوعی ترانوژن برای رشد و نمو اندام حرکتی معرفی نمود زمانی که در بیان ژن های *noggin* و *chordin* موش نقص ایجاد شود موجب نقص در اندام حرکتی می-شود.

۳- ناهنجاری اگزانسفال که در روزهای مختلف بارداری مشاهده شد، به دلیل تشکیل نشدن پرده منتر قسمت های مختلف مغز دچار بیرون زدگی شده که می توان داروی بوتاکس را نوعی ترانوژن نوروتروپیک معرفی نمود.

۴- ناهنجاری آگروهپاتیک به علت تشکیل نشدن پرده صفاقی از سینه تا انتهای ناحیه ی شکمی موجب بیرون زدگی کبد شده است، که می توان سم بوتولینوم را ترانوژن معرفی کرد.

انگشتان بیان شوند، آسیب رساننده و مانع بیان ژن ها شده و باعث شده است که جنین هایی با ناهنجاری اندام حرکتی (تشکیل نشدن اندام، تشکیل ناقص اندام، تشکیل نشدن انگشت دست و پا) بوجود بیاید. در بررسی های ماکروسکوپی، برخی از جنین های تجربی تزریق داروی بوتاکس با دوز ۳/۵۵ mg/kg دچار خونریزی های شدید زیر پوستی در نواحی سر، صورت، گوش، بدن، دم شده بودند. که در روز ۳ بارداری (۷۸/۹۵٪)، روز ۴ بارداری (۴۵/۴۵٪)، روز ۵ بارداری (۱۰۰٪)، روز ۶ بارداری (۶۹/۲۳٪) و همچنین در موش هایی که یک ماه بعد از تزریق بوتاکس باردار شدند (۶۴/۷۱٪) این ناهنجاری مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تشکیل نشدن پلاکت ها و یا تشکیل ناقص آن خونریزی شدید زیر پوستی اتفاق افتاده است. پلاکت ها اجسام کروی یا بیضوی شکلی هستند که از قطعه قطعه شدن سیتوپلاسم سلول های بزرگی به نام مگاکاریوسیت در مغز استخوان حاصل می شوند. مگاکاریوسیت ها سلول های مادر پلاکت می باشند و تمایز نیافتن آن ها باعث کاهش پلاکت و در نتیجه خونریزی های شدید زیر پوستی می شود. پلاکت ها فاقد هسته هستند. پلاکت ها نه فقط از طریق هموار کردن انعقاد خون بلکه از طریق انقباض رگی نیز از خونریزی جلوگیری می کنند. بررسی ها نشان می دهد که تزریق سم باعث کاهش پلاکت های خونی شده و در نتیجه خونریزی های شدید زیر پوستی و جفتی اتفاق افتاده است. قابل ذکر است که در پژوهش هایی که با عنوان تاثیر سم بوتاکس در دوران بارداری انجام گرفته بود فقط ناهنجاری زایی و سقط زایی بیان شده بود و انواع آن مشخص نشده بود ولی در پژوهش حاضر انواع ناهنجاری ها از قبیل اگزانسفال، آگروهپاتیک، سین داکتیلی، پولیپ، نقص در اندام حرکتی (تشکیل نشدن و یا تشکیل ناقص اندام)، نقص در کل بدن،

بوتولینوم (بوتاکس) می توان این چنین نتیجه گیری کرد که احتمالاً ترکیبات موجود در این سم نقش بر عدم باروری دارد و بر رحم تاثیر منفی می گذارد هم- چنین سم بوتولینوم مستقیماً بر روی سمی شدن جنین در مرحله اندام زایی جنین موش تاثیر می گذارد و باعث ایجاد ناهنجاری های مختلف می شود. در نتیجه تزریق بوتاکس در دوران بارداری خطرناک بوده و باعث ایجاد ناباروری و ناهنجاری های مختلف می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه عوامل و همکاران محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به خاطر فراهم نمودن امکانات اجرای این پژوهش اعلام می دارند.

(بلفارواسپاسم) و اسپاسم نیمه صورت. مجله دانشکده پزشکی.

شماره ۲، ص ۳۹-۳۴.

۶- سلیمانپور، ر.، رحمانیان، م. ۱۳۷۹. درمان تعریق شدید زیر بغل با سم بوتولینوم نوع A. دانشکده علوم پزشکی شیراز. سال چهارم. شماره ۲. صفحات ۹-۱۲.

۷- عزیزی، ر. ۱۳۸۲. مقایسه اثر مقادیر ۵۰ و ۲۵ واحدی سم بوتولینوم در شقاق مزمن مقعدی. سال دهم. شماره ۳۸. صفحات ۹۳۱-۹۲۷.

۸- عماد، م.، عماد، م.، طاهری، پ. ۱۳۸۹. بررسی تاثیر سم بوتولینوم در کاهش درد در نورالژی بعد از زونا. مجله پزشکی اصفهان. سال بیست و هشتم. شماره ۱۱۴، صفحه ۸۲۷-۸۱۹.

۹- کماتی، ف. ۱۳۹۰. مقایسه تاثیر تزریق سم بوتاکس با اسفنکروتومی جانبی اسفنکتر داخلی در مبتلایان به فیشر آنال مزمن. دوره ۳۵۰. شماره ۲. صفحه ۸۰-۷۵.

۱۰- مهدوی، ر.، شیخی، ژ.، گلشن، ع. ۱۳۹۰. اثر تزریق توکسین بوتولینوم نوع A به داخل عضله دترسور مثانه در بیماران با مثانه بیش فعال ایدیوپاتیک مقاوم به درمان دارویی. مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی. دوره ۳. شماره ۲. صفحه ۸۰-۷۵.

۵- خونریزی های زیر پوستی که به علت تزریق داروی بوتاکس در روزهای بارداری با درصدهای مختلف بیان شده احتمالاً به دلیل تشکیل نشدن پلاکت- ها و یا تشکیل ناقص آن ها بوده است. مگا کاربوسیت ها سلول های مادر پلاکت هستند و تمایز نیافتن آن ها باعث کاهش پلاکت ها و در نتیجه خونریزی های شدید زیر پوستی می شود.

۶- مشاهده ناهنجاری در اندام حرکتی از قبیل برجستگی پوستی یا پولپ نشان دهنده اثر داروی بوتاکس بر ساختار های بافتی این اندام هاست که می- تواند دلیل بر تجمع سلول ها در این نواحی باشد که باعث بوجود آمدن برجستگی پوستی می شود.

با مد نظر قرار دادن نتایج حاصل از این پژوهش و پژوهش های انجام گرفته در مورد سم

منابع

۱- تراب زاده خراسانی، پ. ۱۳۷۸. بررسی اثرات ناباروری گیاه عروسک پشت پرده بر روی موش ماده سوری نژاد BALB/c. مجله علوم زیستی واحد علوم و تحقیقات تهران. صفحه ۴۶.

۲- دویان، س.، کلاتری، خ.، رحیمی، ع. سلطانی، الف. ۱۳۸۶. میزان اثر بخشی و پایانی یونتوفورزیس بوتولینوم نوع A بر تعریق بیش از حد اولیه کف دست. مجله علوم پزشکی رفسنجان. دوره هفتم. شماره اول. ۶۴-۵۷.

۳- رحمانی، ن. ۱۳۸۶. تاثیر توکسین بوتولینوم در درمان مبتلایان به فیشر آنال مزمن آیدیوپاتیک. مجله پزشکی مازندران. دوره هفدهم. شماره ۶۰. صفحه ۲۹-۲۲.

۴- رزمجو، ح.، شایگان نژاد، ع.، دهقانی، ع.، اخلاقی، م.، صابری، ع. ۱۳۸۶. تاثیر تزریق سبب تنون سم بوتولینوم A در فلج حاد عصب زوج شش مغزی. مجله چشم پزشکی بینا. دوره ۳. شماره ۲. صفحه ۲۲۶-۲۲۲.

۵- سلطان زاده، الف.، جوادیان، الف. ۱۳۷۶. کاربرد سم بوتولینوم و نتایج آن در درمان اسپاسم های پلکی

- Australian and new Zealand. Journal of Ophthalmology, 1989;239-244.
19. Glogau, R. (2007). Topically applied botulinum toxin type a for the treatment of primary axillary hyperhidrosis. *Dermatol Surg*, 33; S76-S80.
20. Hexasel, C., Hexasel, D., Donidaporto, M., Schilling, J., Siega, C. (2011). Botulinum toxin type A for aging face and aesthetic uses. *Dermatologic Therapy*, 24;54-61.
21. Iorio, M., Masden, D., Higgins, J. (2012). Botulinum toxin A treatment of raynaud s phenomenon. A Review, Elsevier Inc, 41; 599-603.
22. Morgan, J. C., Iyer, S. S., Moser, E. T., Singer, C., Sethi, K. D. (2006). Botulinum toxin A during pregnancy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77; 117-119.
23. Sabetti, L., Greco, I., Lodovico, D. (2012). Usefulness of Botulinum toxin type-A in the treatment of chronic sixth nerve palsy open. *Journal of Ophthalmology*, 2;1-4.
24. Sahai, A., Shamim khan, M., Dasgupta, P. (2007). Efficacy of botulinum toxin-a for treating idiopathic detrusor overactivity. *the Journal of Urology*, 177; 2231-2236.
25. Scott, A. B., Collins, C. C., O Meara, D. M. (1972). A forceps to measure strabismus forces. *Archophthalmol*, 88; 330-333.
26. Tan, M., Kim, E., Koren G, Bozzo P. (2013). Botulinum toxin type A in pregnancy. November, 59(11); 1183-1184.
27. Newman, W. J., Davis, TL., Padaliya, BB., Covington, CD., Gill, CE., Abramovitch, Al. (2004). Botulinum toxin type A therapy during pregnancy. *Mov Disord*, 19; 1384-5.
- ۱۱- موسوی، ل، امانی، ج، نظریان، ش، سروری، ر. ۱۳۸۶. بررسی خصوصیات ایمنی زایی پروتئین نوترکیب زنجیره ی سبک سم بوتولینوم تیپ A. *مجله علوم پزشکی زنجان*. دوره ۱۵. شماره ۵۹. صفحه ۳۴-۲۱.
- ۱۲- میر باقری، الف، صادقی، الف، عمویی، م، منصوری، س، فروتن، م، ملک زاده، ر. ۱۳۸۶. بررسی تاثیر تزریق پیلوریک سم بوتولینوم A در مبتلایان به بیماری ری فلاکس معده به مری مقاوم به درمان همراه با تاخیر در تخلیه معده و گوارش. دوره ۱۲. شماره ۳. صفحه ۱۶۷-۱۶۱.
13. Abbot, J. (2009). Gynecological indications for the use of botulinum toxin in women with chronic pelvic pain. *Journal homepage, Toxicon*, 54;647-653.
14. Aesthet Surg, J. (2009). Botulinum toxin in pregnancy. *J Cutaneous and Aesthetic surgery*, 2(1); 4-5.
15. Behr-Roussel, D., Oger, S., Pignol, B., Pham, E. (2012). Minimal effective dose of dysport and botox in a rat model of neurogenic detrusor overactivity. *European Urology*, 61;1054-1061.
16. Choudhury, H., Bhattacharjee, K., Bhattacharjee, H., Kumar Choudhury, H. (2002). Botox for treatment of migraine headaches. *Assam University*, 442-444.
17. Fels, H., Stohl, H. E., Richard, H., Aggajanian, P. (2012). Botulinum toxin for the treatment of acgalasia in pregnancy. *Case Rep. Perinat. Med*, 1(1-2); 41-42.
18. Fracs, M. (1989). Early and late botulinum toxin treatment of acute sixth nerve palsy.

