● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۵، ص ۵۷۱-۵۵۴، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

ارزیابی ضایعات پاتولوژیک جنینی و کارایی داروی آمانتادین در برابر ویروس آنفلوانزای A تحت تیپ H9N2 با استفاده از مدل جنین ماکیان

امین درخشانفر[۱]، هادی توکلی*[۲]

خلاصه

مقدمه: داروهای ضدویروسی مختلفی ازجمله آمانتادین برای درمان بیماری آنفلوانزا به‌کاربرده می‌شوند. این دارو در دسته‌بندی دارویی، جزء داروهای گروه C می‌باشد و تحقیقات کمی در زمینه‌ی آثار سمی آن بر جنین انسان صورت گرفته است. در پژوهش حاضر علاوه بر ارزیابی آثار پاتولوژیک دارو با استفاده از مدل جنین ماکیان، کارایی دارو برای کاهش تیتر ویروس آنفلوانزا، در جنین در حال رشد، نیز بررسی گردید.

روش: مطالعه تجربی حاضر بر روی ۴۸ قطعه تخم‌مرغ نطفه‌دار انجام شد. داروی آمانتادین و مایع آلانتوئیک حاوی 10^5EID50/ml ویروس آنفلوانزای H9N2 به داخل آلبومن تخم‌مرغ تلقیح و آثار پاتولوژیک دارو بر جنین با استفاده از مطالعات ماکروسکوپیک و هیستوپاتولوژیک ارزیابی گردید. کارایی دارو در کاهش تکثیر ویروس در مایع آلانتوئیک جنین نیز با استفاده از روش هماگلوتیناسیون بررسی شد.

یافته‌ها: در این بررسی مشخص گردید داروی ضدویروسی آمانتادین می‌تواند آثار مخربی بر زنده‌مان، رشد، وزن و اندام‌های داخلی جنین در طی دوران رشد داشته باشد. بررسی هیستوپاتولوژیک اندام‌های داخلی جنین‌های مورد آزمایش نشان داد که آثار پاتولوژیک دارو در اندام‌های داخلی ازجمله ریه، قلب، کبد، کلیه و مغز ایجاد می‌گردد. علاوه بر این مشخص شد داروی آمانتادین قادر است با کاهش تکثیر ویروس آنفلوانزای H9N2، باعث افزایش زنده‌مان جنین گردد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اندمیک شدن ویروس آنفلوانزای H9N2 در ایران و امکان انتقال ویروس به انسان، به کارگیری داروی آمانتادین اجتناب ناپذیر است، بنابراین خطر این دارو برای جنین انسان بایستی جدی گرفته شود.

کلمات کلیدی: آمانتادین، آنفلوانزا، جنین، هیستوپاتولوژیک، H9N2

۱- استاد پاتولوژی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، مرکز پزشکی مقایسه‌ای و تجربی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران ۲- دانشیار بخش بهداشت و بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: tavakkoli@uk.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۹/۱۶ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۱۱/۱۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴

مقدمه

ویروس آنفلوانزا یکی از علل عمده‌ی بیماری‌های واگیردار و حاد تنفس در سراسر جهان می‌باشد که انسان، حیوانات و پرندگان را درگیر می‌سازد. این ویروس از خانواده ارتومیکسوویریده و دارای غشاء و اسید ریبونوکلئیک قطعه‌قطعه با قطبیت منفی می‌باشد. بر اساس ویژگی‌های آنتی ژنتیکی نوکلئو پروتئین و پروتئین ماتریکس، ویروس‌های آنفلوانزا به سه جنس یا تیپ A، B و C دسته‌بندی می‌شوند. تغییرات مداوم آنتی‌ژنی در پروتئین‌های سطحی این ویروس باعث می‌شود که تحت تیپ‌های مختلفی از ویروس ایجاد گردد. در حال حاضر، ۱۶ نوع پروتئین هماگلوتینین و ۹ نوع نورآمینیداز تشخیص داده شده است که بر این اساس ویروس‌های آنفلوانزا در ۱۴۴ تحت تیپ گروه‌بندی می‌شوند (۱،۲).

بیماری آنفلوانزا، سالیانه تعداد کثیری از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد که مواردی از مرگ نیز در بین مبتلایان دیده می‌شود. تعداد ده پاندمی بزرگ آنفلوانزا در طی ۳۰۰ سال اخیر اتفاق افتاده است که ازجمله‌ی آن‌ها می‌توان به پاندمی‌های سال‌های ۱۹۱۸، ۱۹۵۷، ۱۹۶۸ و ۲۰۰۹ اشاره کرد که مرگ‌بارترین آن‌ها در سال ۱۹۱۸ بوده است (۳،۴). در حال حاضر تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا بسیار مورد توجه مجامع علمی قرارگرفته است. این تحت تیپ علاوه بر اینکه در بسیاری از مناطق جغرافیایی جهان به‌صورت اندمیک وجود دارد، به‌عنوان یک کاندید برای ایجاد پاندمی‌های آینده نیز مطرح می‌باشد (۸-۵). تحقیقات مختلف در مورد شیوع تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا در ایران نشان داده است که این تحت تیپ به‌صورت گسترده‌ای در جمعیت‌های انسانی، طیور و دامی ایران در حال چرخش می‌باشد (۱۲-۹).

انتقال بین‌گونه‌ای ویروس‌های آنفلوانزا بسیار شایع بوده و به‌علاوه این ویروس‌ها میل و توانایی بالایی به جهش‌های ژنتیکی دارند. با توجه به مطالب ذکرشده، لزوم انجام اقدامات مناسب برای کنترل و پیشگیری از بیماری آنفلوانزا، ازجمله ساخت واکسن‌های مؤثر و داروهای ضدویروسی، بیش‌ازپیش آشکار می‌گردد. در سال‌های اخیر داروهای ضدویروسی مختلف ازجمله آمانتادین، ریمانتادین و همچنین مهارکننده‌های نورآمینیداز در درمان بیماری آنفلوانزا به‌کاربرده شده است. آمانتادین یک داروی خوراکی است که برای درمان بیماری آنفلوانزا در افراد مبتلا به‌کاربرده می‌شود. این دارو از پوشش برداری ویروس و آزاد شدن اسیدنوکلئیک آن به داخل سلول‌های هدف جلوگیری می‌کند (۱۳،۱۴).

عوارض جانبی داروها همواره یکی از مسائل موردبحث در علوم پزشکی بوده است. در مورد داروی آمانتادین، عوارض جانبی ازجمله بی‌اشتهایی، تهوع، عصبی شدن، بی‌خوابی، گیجی، تشنج، تاکی کاردی، کاهش فشارخون، گوشه‌گیری، تاری دید، اختلالات گوارشی، ادم ریوی، تاکی پنه، دیسفاژی، لکوسیتوز، کراتیت، میدریازیس و بثورات جلدی گزارش‌شده است (۱۸-۱۵). آمانتادین از دید علم فارماکولوژی و همچنین در دسته‌بندی دارویی سازمان FDA، جزء داروهای گروه C می‌باشد، به این مفهوم که تحقیقات کمی در مورد آثار پاتولوژیک این دارو بر جنین انسان صورت گرفته است و آثار جانبی این دارو در جنین انسان مشخص نمی‌باشد. ازاین‌رو انجام مطالعات بیشتر در زمینه‌ی آثار سوء این دارو بر میزان رشد جنین، وزن و اندام‌های داخلی جنین ضروری می‌باشد. جنین ماکیان می‌تواند به‌عنوان یک مدل حیوانی مناسب برای ارزیابی آثار پاتولوژیک و سمی داروها استفاده شود زیرا مطالعات نشان

داده‌اند که امبریوژنز در جنین ماکیان شبیه انسان می‌باشد (۱۹). با توجه به مطالب ذکرشده فوق، اهداف تحقیق حاضر شامل موارد ذیل می‌باشد:

۱- استفاده از مدل جنین ماکیان برای ارزیابی آثار پاتولوژیک و ضایعات جنینی داروی ضدویروسی آمانتادین.

۲- استفاده از مدل جنین ماکیان برای ارزیابی کارایی داروی ضدویروسی آمانتادین در برابر تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای اندمیک در ایران. لازم به ذکر است که تاکنون مطالعه علمی کمی در مورد تأثیر داروی آمانتادین بر ویروس H9N2 جداشده ایران با استفاده از مدل جنین حیوانی (in vivo) صورت نگرفته است.

روش بررسی

تخم‌مرغ نطفه‌دار

در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۴۸ قطعه تخم‌مرغ نطفه‌دار از نژاد راس ۳۰۸ و با میانگین وزن مشابه که تحت شرایط استاندارد تولیدشده بودند، از کارخانه مرغ مادر ماهان کرمان خریداری گردیدند. تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار به آزمایشگاه مرجع دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل و شرایط نگهداری و آزمایش برای همه تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار یکسان در نظر گرفته شد.

دارو

داروی مورداستفاده در این تحقیق، داروی آمانتادین می‌باشد که از شرکت داروسازی رها، ایران تهیه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از دارو با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن توسط سوزن با گیج ۲۲ با روش استاندارد به داخل آلبومن تخم‌مرغ تلقیح گردید. برای حل کردن دارو از فسفات بافر سالین و به‌منظور استریل کردن محلول تولیدشده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استفاده شد (۲۲-۲۰).

ویروس

جدایه ویروس با مشخصات A/Chicken/Iran/SH-110/99(H9N2) در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت. این جدایه از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردید. ابتدا برای سازگار شدن ویروس با تخم‌مرغ‌های جنین‌دار، ویروس در مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین دار ۱۰ روزه کشت داده شد و پس از برداشت، Egg Infective Dose (EID)50 ویروس با روش رید و مانژ تعیین گردید (۲۳). برای تزریق به تخم‌مرغ‌های مورد آزمایش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر مایع آلانتوئیک حاوی 10^5EID50/ml ویروس استفاده شد.

طراحی آزمایش

ابتدا سطح خارجی پوسته تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار توسط اتانل ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس تخم‌مرغ‌ها به‌صورت تصادفی به ۶ گروه مساوی ۸ قطعه‌ای تقسیم و در دستگاه انکوباتور (Belderchi Damavand Co. PLC-DQSH) با دمای ۳۷/۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰٪ انکوبه گردیدند. گروه‌های مورد آزمایش عبارت بودند از:

گروه اول (گروه تزریق داروی آمانتادین): در تخم‌مرغ‌های این گروه، داروی آمانتادین به داخل آلبومن تخم‌مرغ تلقیح گردید. زمان تزریق دارو، روز چهارم دوره انکوباسیون در نظر گرفته شد؛ زیرا این زمان مرحله بسیار حساسی در ارگانوژنز جنین می‌باشد و داروها در این زمان بیشترین آثار پاتولوژیک را ایجاد خواهند کرد (۲۴،۲۵).

گروه دوم (گروه کنترل بدون دارو): در تخم‌مرغ‌های این گروه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین استریل به داخل آلبومن تخم‌مرغ تلقیح گردید.

گروه سوم (گروه تزریق ویروس به‌تنهایی): در تخم‌مرغ‌های این گروه، ویروس آنفلوانزا به داخل مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین دار ۱۰ روزه تلقیح شد.

گروه چهارم (گروه تزریق ویروس و فسفات بافر سالین): در تخم‌مرغ‌های این گروه، ویروس آنفلوانزا به داخل مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ های جنین دار ۱۰ روزه تلقیح شد. به‌علاوه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین استریل به داخل آلبومن تخم‌مرغ نیز تلقیح گردید.

گروه‌های پنجم و ششم (گروه‌های تزریق داروی آمانتادین و ویروس): در تخم‌مرغ‌های این گروه‌ها، ویروس آنفلوانزا به مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین دار ۱۰ روزه تلقیح شد. به‌علاوه، گروه‌های فوق داروی آمانتادین به‌ترتیب بلافاصله قبل و بعد از تلقیح ویروس دریافت کردند.

ارزیابی ضایعات ماکروسکوپیک ایجاد شده در جنین

در طول دوره رشد جنین، جنین‌ها روزانه توسط روش کندلینگ بررسی می‌شدند و جنین‌های مرده شناسایی و زمان مرگ آن‌ها ثبت می‌گردید. جنین‌های زنده مانده گروه‌های اول و دوم، در روز هجدهم (مرحله آخر دوره رشد جنینی) و جنین‌های گروه‌های ۳ تا ۶ در روز ۱۶ دوره رشد جنینی از دستگاه انکوباتور خارج گردیدند. پوسته تخم‌مرغ‌ها از انتهای پهن آن‌ها باز و جنین‌ها با دقت خارج شدند. جنین‌های خارج‌شده برای تعیین آثار احتمالی دارو بر میزان زنده‌مانی، رشد، وزن و اندام‌های داخلی جنین مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس جنین‌های خارج‌شده به‌صورت انفرادی با استفاده از ابزار دقیق کولیس اندازه‌گیری و بررسی شدند. طول محدوده اندازه‌گیری شده از استخوان پیشانی (Frontal Bone) تا انتهای استخوان عانه (Pubic Bone) بود. بعد از این مرحله جنین‌ها وزن‌کشی گردیدند و نسبت وزن جنین به وزن تخم‌مرغ، محاسبه و بین گروه‌های مختلف مقایسه گردید.

ارزیابی ضایعات میکروسکوپیک ایجاد شده در جنین

به‌منظور بررسی ضایعات میکروسکوپیک، از اندام‌های داخلی شامل مغز، قلب، کبد، کلیه و ریه نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها پس از فیکس شدن در فرمالین ۱۰٪ در دستگاه آماده‌سازی بافت قرار گرفتند. سپس از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه و برش‌هایی به قطر ۵ میکرون تهیه گردید. برش‌های مذکور به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. نهایتاً ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک در گروه‌های مختلف مورد مطالعه میکروسکوپیک و مقایسه قرار گرفت.

ارزیابی کارایی داروی آمانتادین در برابر ویروس آنفلوانزای A تحت تیپ H9N2

روز ۱۶ دوره رشد جنینی، تخم‌مرغ‌های گروه‌های سوم، چهارم، پنجم و ششم از دستگاه انکوباتور خارج و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس تیتر ویروس در مایع آلانتوئیک با استفاده از روش هماگلوتیناسیون تعیین گردید (۲۶). تأثیر داروی آمانتادین بر روی تیتر ویروس در گروه‌های دریافت‌کننده ویروس و دارو (گروه‌های پنجم و ششم) با گروه‌های دریافت‌کننده ویروس (گروه سوم و چهارم) مقایسه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج از برنامه آماری SPSS نسخه ۲۰ و آزمون‌های آماری Chi-Square و آنالیز واریانس استفاده گردید. از آزمون آماری Chi-Square برای مقایسه آثار پاتولوژیک و ضایعات جنینی داروی آمانتادین در گروه‌های دریافت‌کننده دارو و از آزمون آماری آنالیز واریانس برای مقایسه آثار دارو بر وزن و طول بدن استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج ارزیابی ضایعات ماکروسکوپیک ایجاد شده در جنین

الف: اثر داروی آمانتادین و ویروس آنفلوانزا بر زنده‌مانی جنین‌ها

بررسی جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده داروی آمانتادین (گروه ۱) نشان داد که تزریق دارو به تخم‌مرغ آثار بسیار مخربی بر زنده‌مانی جنین‌ها در طول دوران رشد جنینی داشت به‌طوری‌که زنده‌مانی جنین‌ها در این گروه ۳۷/۵ درصد گردید. بیشترین تلفات در بازه زمانی ۷۲ تا ۱۲۰ ساعت بعد از تزریق دارو ایجاد شد (تصویر ۱). درصورتی‌که جنین‌های گروه کنترل (گروه ۲) که داروی آمانتادین دریافت نکرده بودند، درصد زنده‌مانی بالایی (۸۸ درصد) را در طول دوران رشد جنینی نشان دادند (تصاویر ۴-۲). از سوی دیگر بررسی جنین‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده ویروس آنفلوانزا (گروه‌های ۳ و ۴) نشان داد که تزریق ویروس به تخم‌مرغ نیز آثار بسیار مخربی بر زنده‌مانی جنین‌ها در طول دوران رشد داشته، به‌طوری‌که ویروس باعث مرگ تمامی جنین‌ها در روزهای ابتدایی تزریق گردید. بیشترین تلفات در بازه زمانی ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق ویروس (روز ۱۲ تا ۱۳ دوره رشد جنینی) مشاهده شد (تصویر ۵). با بررسی جنین‌های دریافت‌کننده ویروس و داروی آمانتادین (گروه‌های ۵ و ۶) مشخص گردید که در این گروه‌ها نیز تزریق ویروس به تخم‌مرغ باعث مرگ جنین‌ها گردیده است ولی در مقایسه با گروه‌های ۳ و ۴ که ویروس آنفلوانزا را بدون داروی آمانتادین دریافت کرده بودند، ساعات زنده‌مانی جنین‌ها بیشتر بود و جنین ها ۲۴ تا ۷۲ ساعت از زنده‌مانی بیشتری برخوردار بودند (روز ۱۴ تا ۱۶ دوره رشد جنینی) (تصویر ۶). به علاوه، جنین‌های گروه‌های ۵ و ۶ از رشد و وزن بیشتری برخوردار بوده و میانگین وزن بالاتری (۳۰-۲۰ درصد) را نشان دادند.

تصویر ۱. *ضایعات جنینی داروی آمانتادین (گروه ۱): مرگ جنین ۷۲ ساعت بعد از تزریق داروی آمانتادین (روز ۷ دوره جنینی) مشاهده می‌گردد.*

تصویر ۲. *جنین گروه کنترل بدون دریافت داروی آمانتادین (گروه ۲): جنین نرمال با رشد طبیعی در روز ۷ دوره رشد مشاهده می‌گردد.*

تصویر ۳. جنین گروه کنترل بدون دریافت داروی آمانتادین (گروه ۲): جنین نرمال با رشد طبیعی در روز ١٤ دوره جنینی مشاهده می‌گردد.

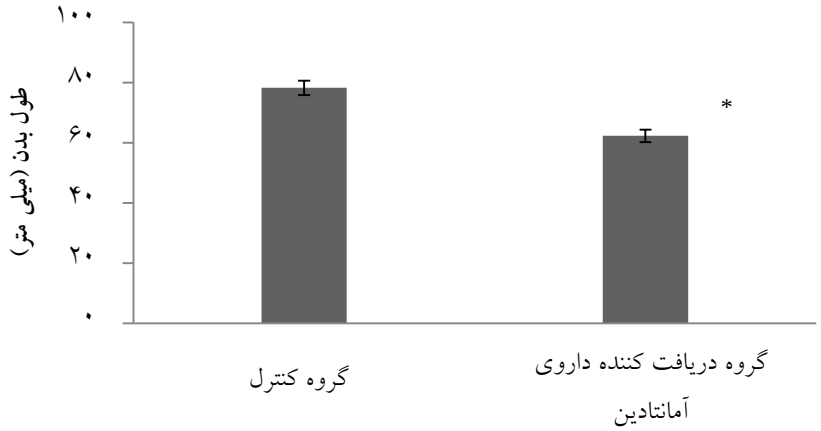
تصویر ٤. جنین گروه کنترل بدون دریافت داروی آمانتادین (گروه ۲): جنین نرمال با رشد طبیعی در روز ۱۸ دوره جنینی مشاهده می‌گردد.

تصویر ۵. *ضایعات جنینی ویروس آنفلوانزا (گروه ۳): مرگ جنین ٤٨ ساعت بعد از تزریق ویروس (روز ۱۲ دوره جنینی) مشاهده می‌گردد.*

تصویر ٦. *ضایعات جنینی داروی آمانتادین و ویروس آنفلوانزا (گروه ٦): مرگ جنین ۹٦ ساعت بعد از تزریق دارو و ویروس (روز ١٤ دوره رشد جنینی) مشاهده می‌گردد.*

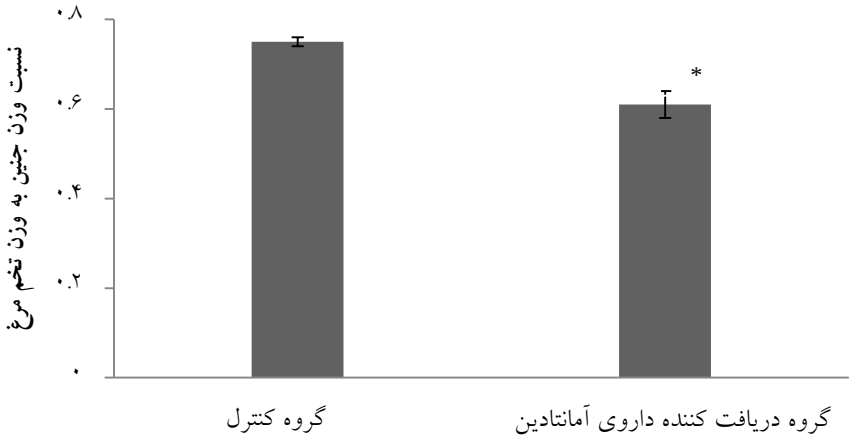
ب: اثر داروی آمانتادین بر وزن و رشد جنین

بررسی جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده داروی آمانتادین (گروه ۱) نشان داد که تزریق دارو به داخل تخم‌مرغ آثار بسیار نامناسب بر وزن و رشد جنین‌ها در طول دوران رشد، در مقایسه با گروه کنترل (گروه ۲)، ایجاد کرده و جنین‌ها از وزن و رشد پایین‌تر از حد استاندارد در طول دوران رشد برخوردار بودند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج نیز اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۵) بین گروه دریافت‌کننده داروی آمانتادین و گروه کنترل نشان داد (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۱. *اثر داروی آمانتادین بر طول بدن (میلی‌متر) در طی دوران رشد جنینی*

کاهش معنی‌دار در طول بدن جنین‌های دریافت کننده داروی آمانتادین با جنین‌های گروه کنترل که دارو دریافت نکرده بودند، مشاهده می گردد (P<۰/۰۵).

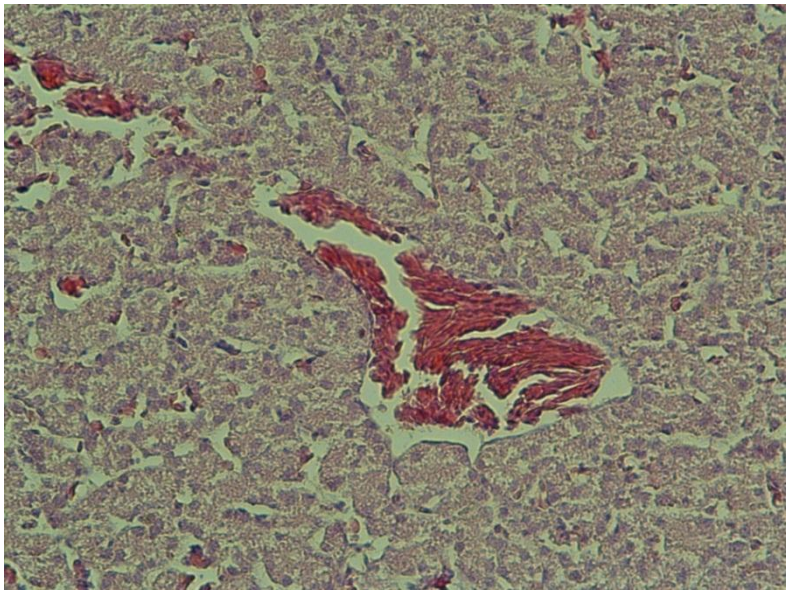


نمودار ۲. *اثر داروی آمانتادین بر وزن بدن در طی دوران رشد جنینی*

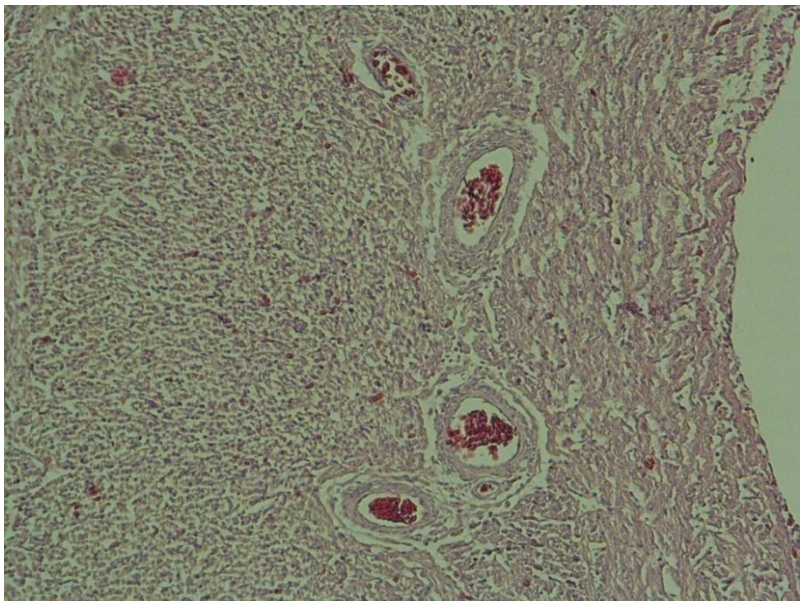
کاهش معنی‌دار در وزن جنین‌های دریافت کننده داروی آمانتادین با جنین‌های گروه کنترل که دارو دریافت نکرده بودند، مشاهده می گردد (P<۰/۰۵).

نتایج ارزیابی ضایعات میکروسکوپیک ایجاد شده در جنین

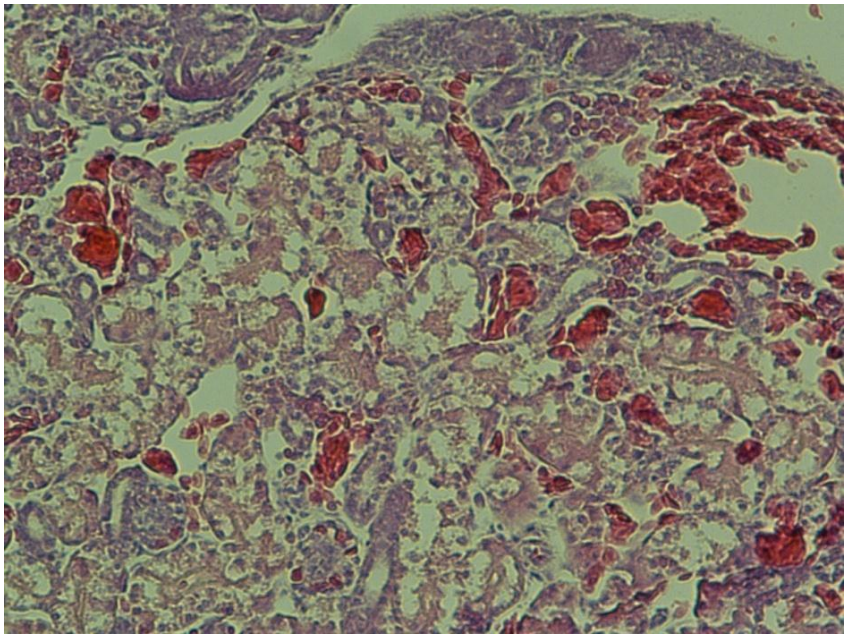
آثار پاتولوژیک داروی آمانتادین بر اندام‌های داخلی جنین‌های دریافت‌کننده این دارو (گروه ۱) در تصاویر ۷ تا ۱۱ نشان داده شده است. در بافت های مورد مطالعه، پرخونی در کبد، قلب، کلیه، مغز و ریه دیده شد و علاوه بر آن، ادم در مغز و ریه وجود داشت.



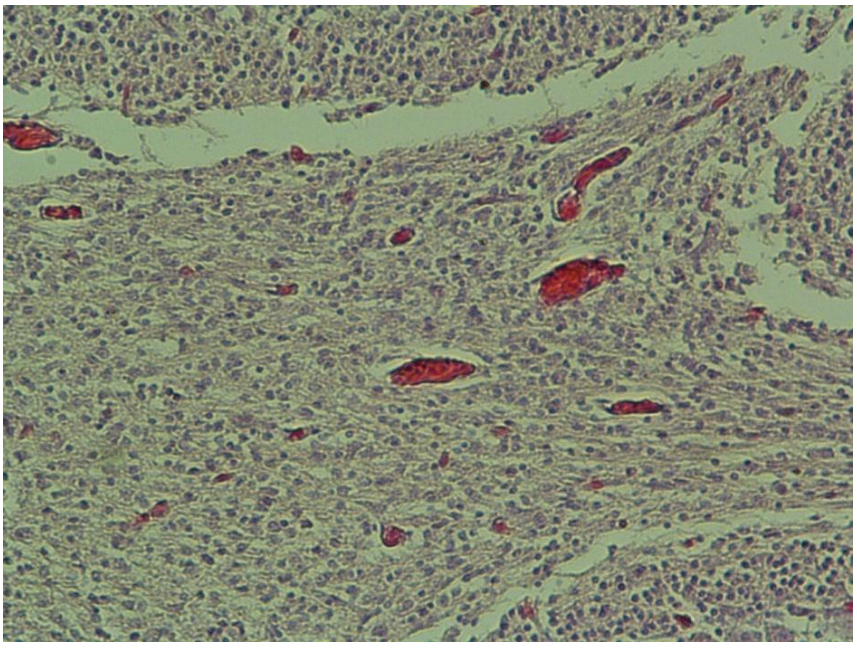
تصویر ۷. *تصویر هیستوپاتولوژیک از جنین دریافت‌کننده داروی آمانتادین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. پرخونی در کبد دیده می‌شود. (هماتوکسیلین و ائوزین، ۲۰۰)*



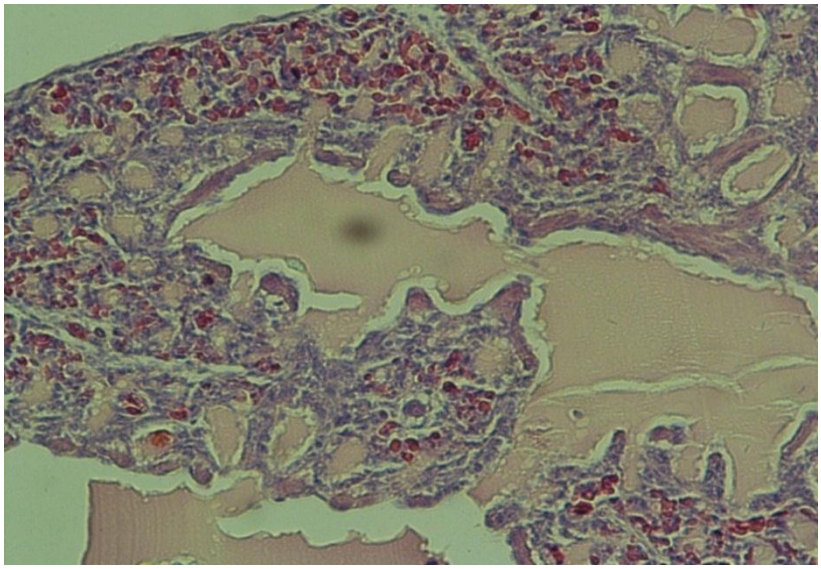
تصویر ۸ *تصویر هیستوپاتولوژیک از جنین دریافت‌کننده داروی آمانتادین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. پرخونی در قلب دیده می‌شود. (هماتوکسیلین و ائوزین، ۱۰۰)*



تصویر ۹. *تصویر هیستوپاتولوژیک از جنین دریافت‌کننده داروی آمانتادین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. پرخونی در کلیه دیده می‌شود. (هماتوکسیلین و ائوزین، ۲۰۰)*



تصویر ۱۰. *تصویر هیستوپاتولوژیک از جنین دریافت‌کننده داروی آمانتادین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. پرخونی در مغز دیده می‌شود. (هماتوکسیلین و ائوزین، ۲۰۰)*



تصویر ۱۱. *تصویر هیستوپاتولوژیک از جنین دریافت‌کننده داروی آمانتادین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. ادم در ریه دیده می‌شود. (هماتوکسیلین و ائوزین، ۲۰۰)*

نتایج ارزیابی کارایی داروی آمانتادین در برابر ویروس آنفلوانزای A تحت تیپ H9N2

نتایج ارزیابی تیتر ویروس آنفلوانزا در مایع آلانتوئیک گروه‌های دریافت‌کننده ویروس و داروی آمانتادین در جدول ۱ آورده شده است. با توجه به جدول مشخص می‌گردد که داروی آمانتادین به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تیتر ویروس آنفلوانزای H9N2 در مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های جنین دار (گروه‌های ۵ و ۶) شده است (P<۰/۵)، درحالی‌که تیتر ویروس در مایع آلانتوئیک جنین‌هایی که ویروس آنفلوانزا بدون داروی آمانتادین را دریافت کرده بودند (گروه‌های ۳ و ۴) بالا می‌باشد. با مقایسه گروه‌های ۵ و ۶ که داروی آمانتادین را به ترتیب قبل و بعد از تلقیح ویروس آنفلوانزا دریافت کردند، مشخص گردید که زمان تلقیح داروی آمانتادین اثر معنی‌دار بر تیتر ویروس نداشت (P>۰/۵).

جدول ۱ *نتایج ارزیابی تیتر ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 در مایع آلانتوئیک گروه‌های دریافت‌کننده ویروس و داروی آمانتادین*

گروه	تیتر ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 با استفاده از روش هماگلوتیناسیون (log2)*
۳ (گروه تزریق ویروس)	۸/۶۲±۰/۳۲[a]
٤ (گروه تزریق ویروس و فسفات بافر سالین)	۸/۳۷±۰/۳۷[a]
۵ (گروه تزریق ویروس و داروی آمانتادین قبل از تلقیح ویروس)	۴/۷۵±۰/۲۷[b]
٦ (گروه تزریق ویروس و داروی آمانتادین بعد از تلقیح ویروس)	۴/۲۵±۰/۴۷[b]

* اعداد (میانگین ±SEM) می‌باشند. اعداد با اندیس متفاوت در یک ستون دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند.

بحث

برای درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A در جهان، داروهای ضدویروسی مختلفی ازجمله آمانتادین مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حال حاضر این دارو در داروخانه‌های ایران موجود بوده و در افراد بیمار مصرف می‌گردد. داروهای ضدویروسی ممکن است با داشتن اثرات جانبی مختلف، سبب ایجاد آسیب‌های بافتی غیرقابل جبرانی گردند. در تحقیق حاضر مشخص گردید که داروی آمانتادین می‌تواند آثار مخربی بر زنده‌مانی، رشد، وزن و اندام‌های داخلی جنین ماکیان در طی دوران رشد داشته باشد. بررسی هیستوپاتولوژیک اندام‌های داخلی جنین‌های مورد آزمایش نشان داد که آثار پاتولوژیک داروی آمانتادین می‌تواند در اندام‌های داخلی ازجمله ریه، قلب، کبد، کلیه و مغز ایجاد گردد. ازآنجاکه امبریوژنز در جنین ماکیان شبیه انسان می‌باشد (۱۹)، می‌توان پیش‌بینی نمود که مصرف داروی آمانتادین در طی دوران بارداری ممکن است آثار نامناسبی را بر روی رشد و تکامل جنین انسان نیز داشته باشد. با این وجود، آثار این دارو بر جنین انسان نیاز به بررسی‌های بیشتری داشته و تحقیقات آینده را در این خصوص طلب می‌نماید؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد که مصرف داروی آمانتادین در دوران بارداری بااحتیاط صورت پذیرد.

در زمینه‌ی اثر داروی آمانتادین بر میزان زنده‌مانی جنین انسان و همچنین اثرات هیستوپاتولوژیک دارو در طی دوران رشد جنین، مطالعات اندکی صورت گرفته است. در گزارشی، یک نوزاد که مادرش در دو هفته ابتدای دوران بارداری از داروی آمانتادین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در روز استفاده کرده بود، مشکلات قلبی و عروقی ازجمله اختلال در تشکیل بطن‌های قلب دیده شد (۲۷). همچنین اختلال در تکامل جنین، زمانیکه مادر در ابتدای دوران بارداری از داروی آمانتادین روزانه به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به مدت یک هفته استفاده کرده بود، دیده شد (۲۸). اختلالات جنینی دیگری نیز به دنبال استفاده از داروی آمانتادین در طی دوران بارداری گزارش‌شده است (۲۹،۳۰). لامار (Lamar) و همکاران نشان دادند داروی آمانتادین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در موش‌های آزمایشگاهی می‌تواند باعث مرگ‌ومیر جنین‌ها در طی دوران آبستنی گردد (۳۱). نتایج مشابه نیز در تحقیق ما دیده شد به صورتی که این دارو باعث ایجاد تلفات ۶۲/۵ درصدی در جنین‌های مورد آزمایش گردید. آثار سمی و هیستوپاتولوژیک داروی آمانتادین را می‌توان مرتبط با عوامل مختلفی ازجمله اثر مستقیم دارو بر سلول، ایجاد متابولیت های سمی و فعال ساختن واسطه‌های شیمیایی یا مسیرهای متابولیکی اختصاصی دانست (۳۵-۳۲).

تحقیق حاضر همچنین نشان داد داروی آمانتادین می‌تواند باعث کاهش تیتر ویروس آنفلوانزای H9N2 در جنین در حال رشد گردد که درنتیجه، جنین‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده این دارو (گروه‌های ۵ و ۶) در مقایسه با گروه‌هایی که دارو را دریافت نکرده بودند (گروه‌های ۳ و ۴)، از زنده‌مانی بیشتری برخوردار بودند. از سوی دیگر مرگ جنین‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده داروی آمانتادین و ویروس (گروه‌های ۵ و ۶) نشان داد که اگرچه آمانتادین قادر به کاهش تکثیر و تیتر ویروس آنفلوانزای H9N2 در جنین می‌باشد، ولی به‌طور کامل نمی‌تواند از تکثیر ویروس جلوگیری نماید به‌طوری‌که تکثیر ویروس درنهایت منجر به مرگ جنین می‌گردد. با مراجعه به جدول ۱ هم مشخص می‌گردد که گرچه تیتر ویروس در گروه‌های ۵ و ۶ که ویروس و داروی آمانتادین را دریافت

کرده بودند، در مقایسه با گروه ۳ و ۴ که داروی آمانتادین را دریافت نکرده بودند، کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد ولی بازهم ویروس در این گروه‌ها تکثیر پیداکرده است.

ویروس مورداستفاده در تحقیق حاضر از طیور ایران جدا شده و تاکنون مطالعه علمی کمی در مورد تأثیر داروی آمانتادین بر این تحت‌تیپ با استفاده از مدل جنین حیوانی صورت گرفته است. با توجه به اندمیک شدن ویروس H9N2 در مزارع پرورش طیور ایران و مجاورت این مراکز با مناطق شهری و روستایی و امکان انتقال ویروس از پرنده به انسان، از داروی آمانتادین می‌توان در درمان موارد بالینی مرتبط با این تحت تیپ ویروسی بهره جست. این دارو می‌تواند تکثیر ویروس آنفلوانزای H9N2 را کاهش داده و به دنبال کاهش این تکثیر، عوارض بالینی مرتبط با بیماری نیز کاهش می‌یابد. علاوه بر اثرات مثبت داروی آمانتادین در کاهش تکثیر ویروس آنفلوانزا در جنین باید خاطرنشان کرد که این دارو می‌تواند آثار سمی و پاتولوژیک بر جنین نیز داشته باشد.

در تحقیق حاضر از جنین ماکیان به‌عنوان یک مدل حیوانی برای ارزیابی آثار سمی داروی آمانتادین استفاده گردید. بیشتر مدل‌های حیوانی که برای ارزیابی کارایی داروها و ویروس‌های مختلف مورداستفاده قرار گرفته‌اند، حیواناتی مثل رت و موش آزمایشگاهی بوده‌اند. استفاده از این حیوانات محدودیت‌هایی را در زمان تهیه و همچنین رعایت نکات اخلاقی کار با حیوان دارد، درحالی‌که در زمان کار با جنین ماکیان، محدودیت‌های فوق وجود ندارد. از سوی دیگر در زمان کار با حیوانات آزمایشگاهی، اغلب ویروس از طریق داخل بینی تلقیح شده است و یا دارو به‌صورت خوراکی داده‌شده است. ولی در تحقیق حاضر، هنگام تلقیح ویروس و دارو به تخم‌مرغ‌های جنین دار، این ترکیبات در جنین به‌صورت سیستمیک پخش می‌شوند. در جنین انسان نیز زمانی که دارو و ویروس از مادر به جنین می‌رسند، به‌صورت سیستمیک در جنین منتشر می‌گردند؛ بنابراین با توجه به مطالب ذکرشده، تحقیق حاضر نشان داد جنین ماکیان می‌تواند مدل مناسبی برای ارزیابی داروهای ضدویروس آنفلوانزا باشد.

نتیجه‌گیری

استفاده از داروی ضدویروسی آمانتادین در مدل جنین ماکیان نشان داد که این دارو علاوه بر اینکه می‌تواند مرگ و آثار هیستوپاتولوژیک در جنین ایجاد نماید، قادر است تکثیر ویروس آنفلوانزای اندمیک ایران (تحت تیپ H9N2) را در جنین کاهش داده و باعث افزایش زنده‌مانی جنین گردد؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد، در زمان مواجهه با موارد ابتلا به بیماری آنفلوانزا، تجویز داروی آمانتادین در دوران بارداری بااحتیاط صورت پذیرد و فقط در شرایطی مصرف گردد که منافع دارو بر آثار جانبی آن برتری داشته باشد. علاوه بر این با توجه به مقاومت دارویی علیه آمانتادین در جدایه های H9N2، لزوم مصرف این دارو در اپیدمی های احتمالی در زنان باردار جایز نیست و می توان از داروهای جایگزین مانند تامی فلو استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر وافر خود را از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی به‌دلیل در اختیار قرار دادن تحت تیپ ویروس آنفلوانزا و همچنین جناب آقای حسن‌زاده به‌دلیل تهیه اسلایدهای هیستوپاتولوژی، اعلام می‌دارند.

References

1. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12(1): 36-44.
2. Karlsson EA, Marcelin G, Webby RJ, Schultz-Cherry S. Review on the impact of pregnancy and obesity on influenza virus infection. *Influ Other Respir Viruses* 2012; 6(6): 449-60.
3. Rasmussen SA, Kissin DM, Yeung LF, Mac Farlane K, Chu SY, Turcios-Ruiz RM, et al. Preparing for influenza after 2009 H1N1: special considerations for pregnant women and newborns. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204(6): 13-20.
4. Carrasco LR, Jit M, Chen MI, Lee VJ, Milne GJ, Cook AR. Trends in parameterization, economics and host behaviour in influenza pandemic modelling: a review and reporting protocol. *Emerg Themes Epidemiol* 2013; 10(1): 3.
5. Moghadaszadeh M, Golchin M, Tavakkoli H, Ghambarpour R. Cloning, expression and purification of M2e-HA2 from Influenza A virus in Escherichia coli. *OJVR* 2015; 19(2): 124-9.
6. Liu D, Shi W, Gao GF. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses. *Lancet* 2014; 383(9920): 869-75.
7. Yu X, Jin T, Cui Y, Pu X, Li J, Xu J, et al. Influenza H7N9 and H9N2 viruses: coexistence in poultry linked to human H7N9 infection and genome characteristics. *J Virol* 2014; 88(6): 3423-31.
8. Zhu G, Wang R, Xuan F, Daszak P, Anthony SJ, Zang S, et al. Characterization of recombinant H9N2 influenza viruses isolated from wild ducks in China. *Vet Microbiol* 2013; 166(3-4): 327-36.
9. Tavakkoli H, Asasi K, Mohammadi A. Effectiveness of two H9N2 low pathogenic avian influenza conventional inactivated oil emulsion vaccine on H9N2 viral replication and shedding in broiler Chicens. *IJVR* 2011; 12(3): 214-20.
10. Fallah Mehrabadi MH, Bahonar AR, Zeynolabedini Tehrani F, Vasfi Marandi M, Sadrzadeh A, Ghafouri SA, et al. Seroepidemiology of Avian Influenza (H9N2) in Rural Domestic Poultry of Iran: A Cross-Sectional Study. *Iranian J Epidemiol* 2015; 10(4): 1-9.
11. Ebrahimi M, Grigorian S ,Shoushtari A, Abedini F, Moeini H. Sequence analysis and phylogenetic profiling of the nonstructural (NS) genes of H9N2 influenza A viruses isolated in Iran during 1998-2007. *Arch Razi Inst* 2014; 69(2): 127-35.
12. Bahari P, Pourbakhsh SA, Shoushtari H , Bahmaninejad MA. Molecular characterization of H9N2 avian influenza viruses isolated from vaccinated broiler chickens in northeast Iran. *Trop Anim Health Prod* 2015; 47(6): 1195-201.
13. Hosenbocus S, Chahal R. Amantadine: a review of use in child and adolescent

psychiatry. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 2013; 22(1): 55-60.

14. Jackson RJ, Cooper KL, Tappenden P, Rees A, Simpson El, Read RC, et al. Oseltamivir, zanamivir and amantadine in the prevention of influenza: a systematic review. *J Infect* 2011; 62(1): 14-25.
15. Praharaj SK, Sharma PS. Amantadine for olanzapine-induced weight gain: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Ther Adv Psychopharmacol* 2012; 2(4): 151-6.
16. Michiels B, Van Puyenbroeck K, Verhoeven V, Vermeire E, Coenen S. The value of neuraminidase inhibitors for the prevention and treatment of seasonal influenza: a systematic review of systematic reviews. *PLoS One* 2013; 8(4): 603-14.
17. Beck CR, Sokal R Arunachalam N, Puleston R, Cichowska A, Kessel A, et al. Neuraminidase inhibitors for influenza: a review and public health perspective in the aftermath of the 2009 pandemic. *Influ Other Respir Viruses* 2013; 7(11): 14-24.
18. Hubsher G, Haider M, Okun M. Amantadine: the journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology* 2012; 78(14): 1096-99.
19. Singroha R, Srivastava S.K, Chhikara P. Effect of Gentamicin on kidney in developing chicks. *Eur J Anat* 2012; 16(2): 119-26.
20. Cheled-Shoval SL, Amit-Romach E, Barbakov M, Uni Z. The effect of in ovo administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre-and posthatch periods in chickens. *Poult Sci* 2011; 90(10): 2301-10.
21. Liu HH, Wang J.W, Chen X, Zhang R.P, Yu HY, Gin H.B, et al. In ovo administration of rhIGF-1 to duck eggs affects the expression of myogenic transcription factors and muscle mass during late embryo development. *J Appl Physiol* 2011; 111(6): 1789-97.
22. Li X-G, Sui W-G, Yan H-C, Jiang Q-Y, Wang X-Q. The in ovo administration of l-trans pyrrolidine-2, 4-dicarboxylic acid regulates small intestinal growth in chicks. *Animal* 2014; 8(10): 1677-83.
23. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The Am J Hygiene* 1938; 27(3): 493-7.
24. Kulesa PM, McKinney MC, McLennan R. Developmental imaging: the avian embryo hatches to the challenge. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2013; 99(2): 121-33.
25. Tavakkoli H, Derakhshanfar A, Noori GS. The effect of florfnicol egg-ingetion on embryonated chicken egg. *IJABBR* 2014; 2: 496-503.
26. INFL WA, Manu U. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. *Geneva: World Health Organization* 2002; 12-22.
27. Nora JY, Nora AH, Way GL. Cardiovascular maldevelopment associated with maternal exposure to amantadine. *Lancet* 1975; 306(7935): 607-612.

28. Coulson AS. Amantadine and teratogenesis. *Lancet* 1975; 306(7943): 1044-49.

29. Levy M, Pastuszak A, Koren G. Fetal outcome following intrauterine amantadine exposure. *Reprod Toxicol* 1991; 5(1): 79-81.

30. Rosa F. Amantadine pregnancy experience. *Reprod Toxicol* 1994; 8(6): 531-9.

31. Lamar K, Calhoun F, Darr A. Effects of amantadine hydrochloride on cleavage and embryonic development in rat and rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol* 1970; 17: 272-80.

32. Siena S, Villa S, Bregni M, Bonnadonna G, Gianni AM. Amantadine potentiates T lymphocyte killing by an anti-pan-T cell (CD5) ricin A-chain immunotoxin. *Blood* 1987; 69(1): 345-8.

33. Chang KC, Kim MK, Wee WR, Lee JH. Corneal endothelial dysfunction associated with amantadine toxicity. *Cornea* 2008; 27(10): 1182-85.

34. Caumont AS, Octave JN, Hermans E. Amantadine and memantine induce the expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor in C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 2006; 394(3): 196-201.

35. Sommerauer C, Rebernik P, Reither H, Nanoff C, Pifl C. The noradrenaline transporter as site of action for the anti-Parkinson drug amantadine. *Neuropharmacology* 2012; 62(4): 1708-16.

Evaluation of the Embryonic Pathological Lesions and Efficacy of Amantadine against H9N2 Influenza Virus Using Chicken Embryo Model

Amin Derakhshanfar, Ph.D.[1], Hadi Tavakkoli, Ph.D.[2*]

1. Professor of Pathology, Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, Center of Comparative & Experimental Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2. Associate Professor of Avian Medicine, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: tavakkoli@uk.ac.ir

(Received: 6 Dec. 2015 Accepted: 2 Feb. 2016)

Abstract

Background & Aims: Various antiviral drugs such as amantadine are used to treat influenza. This drug is categorized in group C and few researches have been conducted about its toxic effects on human fetus. In the current study, the pathologic effects of the drug as well as drug efficacy in reducing influenza virus titer in the developing chicken embryo were assessed.

Method: The experiment was done on 48 fertilized eggs. Amantadine and allantoic fluid containing 10^5 EID50/ml of H9N2 virus were inoculated into the egg albumen, then, the pathologic effects of the drug on embryos were evaluated using macroscopic and histopathologic examinations. Drug efficacy in reducing influenza virus titer, was also assessed using the hemagglutination test.

Results: The study showed that amantadine has adverse effect on the survival, growth, weight and internal organs during embryonic development. Histopathological examinations of the internal organs showed that pathological effects of the drug occurred in the organs, including lungs, heart, liver, kidney and brain. Furthermore, it was found that amantadine can to reduce the replication of H9N2 virus and increases the viability of the embryo.

Conclusion: As regards to the endemic condition of the H9N2 virus in Iran and the possibility of virus transmission to human, the utilization of amantadine is inevitable, however, the hazard of the drug for human embryo must be taken seriously.

Keywords: Amantadine, Influenza, Embryo, Histopathologic, H9N2

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(5): 554-571