بررسی اثرات تراتوژنیسیته دوکسپین هیدروکلراید بر روی جنین موش صحرایی کشت داده شده در محیط خارج بدن و بر روی جنین جوجه در داخل تخم مرغ

نویسندگان:دکتر محمد عبدالهی[1] ، دکتر سیما گل محمدی[2]،
دکتر بهروزجنت[3] ،دکتر بتول نصرالله زاده[4]

خلاصه

در این مطالعه اثرات سمی داروی دوکسپین هیدروکلراید بعنوان یک داروی ضدافسردگی سه حلقه ای در جنین موش صحرایی و همچنین عوارض اسکلتی در جنین جوجه بررسی شده است. دوکسپین هیدروکلراید با دوزی معادل ۰/۱۵ µg/ml به محیط کشت جنین ده روزه موش صحرایی اضافه شد.بعد از ۴۸ ساعت جنین های موجود در محیط کشت از لحاظ میزان DNA و پروتئین در مقایسه با گروههای شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که میانگین غلظت DNA و پروتئین رویانهایی که در معرض دارو قرار گرفته اند در مقایسه با غلظت DNA و پروتئین رویانهای کنترل و شاهد کاهش معنی داری دارند.همچنین دوکسپین هیدروکلراید با دوزهای ۳۵,۷۰,۱۴۰,۳۵۰ µg/egg به تخم مرغهای نطفه دار در روز ۸ انکوباسیون تزریق شد، سپس در روز ۱۷ انکوباسیون جنین های جوجه از داخل تخم مرغ بیرون آورده شدند و توسط متد آلیزارین - رد استخوانهای جنین رنگ آمیزی شد و مورد بررسی اسکلتی قرار گرفتند. نتایج حاکی از آن است که داروی مورد نظر هیچ اثر مشخصی بر روی سیستم اسکلتی باقی نگذاشته و تنها اثر مشاهده شده افزایش میزان مرگ و میر جنین ها در دوز ۳۵۰ µg/egg بود.

کلید واژه: دوکسپین، عوارض اسکلتی، بارداری

مقدمه:

دوکسپین هیدروکلراید یک داروی ضدافسردگی و ضداضطراب از دسته ترکیبات سه حلقه ای و از مشتقات دی بنزوکسپین ها می باشد .مکانیسم عمل این دارو بخوبی شناخته نشده است. این دارو یک عامل محرک سیستم اعصاب مرکزی نمی باشد. فرضیه رایج این است که اثرات کلینیکی آن ناشی از فعالیت سیستم آدرنرژیک در سیناپس ها می باشد. چون از باز جذب نورایی نفرین بداخل انتهای اعصاب جلوگیری می کند (۱).

عمده ترین بررسی هایی که تاکنون بر روی دوکسپین هیدروکلراید انجام شده مربوط به کاربرد، عوارض کلینیکی، تداخلات و فارماکوکینتیک دارو است و در رابطه با اثرات تراتوژنیک دوکسپین اطلاعات زیادی در دست نیست. بر طبق مدارک موجود دوکسپین هیچ اثر تراتوژنیک مشخصی بر روی موش صحرایی و خرگوش و سگ ایجاد نمی کند. تنها در نوزادانی که مادران آنها در طول بارداری تحت درمان با این دارو می باشند آپنه و خواب آلودگی مشاهده می شود. با این وجود بی ضرری این دارو در زنان باردار و کودکان زیر ۱۲ سال تاکنون به اثبات نرسیده است (۱, ۲, ۳).

۱- استادیار سم شناسی و دارو شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- گروه سم شناسی و داروشناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دستیار مواد خوراکی از نظر داروئی و سم شناسی - گروه سم شناسی و داروشناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- استادیار جنین شناسی دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران

بر طبق گزارشات موجود داروی دوکسپین هیدروکلراید نه تنها از سد جفتی عبور می کند، بلکه حتی وارد جریان خون جنین هم می شود. به همین دلایل FDA این دارو را در گروه C مصرف دوران بارداری رده بندی کرده است و این نشان دهنده این موضوع است که تحقیقات تراتوژنیک در مورد این دارو کافی نیست (۴).

در مطالعاتی که توسط گروهی از دانشمندان بر روی اثرات تولید مثلی این دارو بر روی موش صحرایی و خرگوش انجام شد، هیچ عارضه مهمی در جنین این حیوانات مشاهده نشد. در گزارشاتی که توسط گروه دیگری از دانشمندان ارائه شد، حالاتی از سندرم کوتاهی کولون چپ ناشی از مصرف این دارو در دوره سوم بارداری مشاهده شد (۵). همچنین در مطالعه ای که توسط گروهی از دانشمندان و با دوز ۰/۳۱mg/kg/day بصورت خوراکی در موشهای صحرایی باردار انجام شد، دوکسپین فعالیت آلکالن فسفاتاز جفت را کاهش داده و فعالیت اسید فسفاتاز و گلوکز ۶ فسفاتاز را افزایش می‌دهد و این اعمال منجر به اختلال در اعمال متابولیسمی جفت می شود. همچنین گزارش شده است که مصرف دوکسپین در دوره دوم بارداری موش صحرایی (روزهای ۱۴-۸ بارداری) منجر به افزایش مشخصی در مرگ و میر جنین های موش صحرایی می شود (۷، ۶).

با توجه به گسترش مصرف این دارو در بیماران مبتلا به افسردگی و همچنین نظر به محدود بودن اطلاعات در زمینه عوارض تراتوژن این دارو و همچنین اطلاعات کمی که در رابطه با اثر این دارو در سیستم اسکلتی در دست است علاقمند شدیم که اثرات آن را از لحاظ سمیت و بروز عوارض بافتی و مورفولوژیک و اسکلتی بررسی نماییم.

مواد و روشهای کار:

پودر دوکسپین هیدروکلراید خالص از شرکت آلدریچ تهیه شد. در این تحقیق از موشهای صحرایی نژاد Sprague-Dawly استفاده شد که از مؤسسه سرم سازی رازی حصارک کرج خریداری شدند. محدوده وزنی آنها بین ۲۲۰-۱۸۰ گرم بود. موشها سالم بوده و پشت براق و سفیدی داشتند و از نظر تحرک طبیعی بودند. موشها مدت ۲ هفته قبل از جفت گیری در موقعیت و محل جدید قرار گرفتند تا به محیط عادت کنند. در هر قفس ۳ موش ماده گذاشته شد و غذا و آب به اندازه کافی در اختیار آنها قرار داده شد. درجه حرارت و رطوبت آزمایشگاه به ترتیب ۲۶-۲۲ درجه سانتیگراد و ۵۵-۴۵٪ بود. بعد از عادت کردن موشها به شرایط جدید، در هر قفس یک موش نر سالم و جوان گذاشته شد تا عمل جفت گیری صورت گیرد. پس از جفت گیری در دهانه واژن توده سفت و کرم رنگی ایجاد شد که مانند یک چوب پنبه دهانه واژن را می پوشاند، این توده پلاک واژینال نام دارد. این پلاک تا چند ساعت پس از جفت گیری در محل باقیمانده و سپس از بین می رود. در موشهای ماده ای که این پلاک ظاهر گردید، بعنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد و در قفس های جداگانه نگهداری شدند. بقیه موشها بطریقه اسمیر (Smear) برای تعیین روز صفر بارداری مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس در روز دهم بارداری موشهای ماده با روش نخاعی کردن کشته شده و جنین ها خارج گردیدند. جنین ها پس از خروج از درون رحم از کیسه آمنیون (amnion) خارج گشته، در محلول حاوی نرمال سالین و آنتی بیوتیک قرار گرفتند، کلیه مراحل خارج سازی جنین ها از داخل رحم تا قرار گرفتن آنها در محیط کشت باید در شرایط کاملاً آسپتیک صورت گیرد. سپس رویانها را به درون ظروف کشت انتقال دادیم.

در این تحقیق از پلاسمای انسانی فاقد فاکتور شماره ۸ که از سازمان انتقال خون ایران تهیه شده بود بعنوان پایه محیط کشت استفاده شد. پلاسما را بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد حرارت داده سپس به ازای هر میلی لیتر حجم نهایی آن ۳mg گلوکز تهیه شده از شرکت آلدریچ به پلاسما اضافه شد. سپس به پلاسمای غنی شده از گلوکز ۰/۶۶mg استرپتومایسین سولفات و ۰/۰۰۰۶μg پنی سیلین G پتاسیم تهیه شده از شرکت آلدریچ به ازای هر میلی لیتر حجم نهایی محیط کشت اضافه شد. در انتها محلول را با آب مقطر استریل ۱۰ درصد رقیق کرده و توسط فیلتر HA-type milliopore محیط کشت را استریل کردیم (۸). سپس ۰/۱۵μg دوکسپین هیدروکلراید تهیه شده از شرکت آلدریچ به ازای هر میلی لیتر از حجم نهایی محیط کشت به آن اضافه شده پس از انجام کارهای مقدماتی ظروف کشت که محتوی ۵ تا ۸ عدد رویان است را بمدت ۴۸ ساعت در سیستم کشت بطری چرخان New قرار می‌دهیم (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). این سیستم تشکیل شده است از استوانه های چرخانی که با سرعت ۶۰-۳۰ دور در دقیقه می گردند و دمای محیط را نیز ۰/۵±۳۷/۵ درجه سانتیگراد ثابت نگه می‌داریم. رویانها را پس از اتمام دوره کشت (۴۸ ساعت) از محیط کشت خارج کرده و بوسیله تعیین مقدار DNA و پروتئین (متد زدی فنیل آمین، متدلوری) (۱۳، ۱۴) می توانیم به اثرات سمی و تراتوژنیک احتمالی دارو پی ببریم.

قسمت دوم تحقیقی که انجام دادیم بررسی اثر دارو بر روی جنین جوجه در داخل تخم مرغ بود. برای این منظور ابتدا تخم مرغهای نطفه دار White Leghorn از شرکت مرغک خریداری شد. تمامی این تخم مرغها در روز صفر انکوباسیون بودند و تمامی آنهادر یک محدوده وزنی ۵۰-۴۵ گرم قرار داشتند. تخم مرغ ها را

بطور افقی در انکوباتور قرار دادیم. این انکوباتور دما را در ۰/۵±۳۷/۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی را در حدود ۸۰-۶۰٪ ثابت نگه می‌دارد. تخم مرغها را هر ۶ ساعت ۹۰ درجه می‌چرخانیم. همچنین یک محلول استاندارد دوکسپین هیدروکلراید در نرمال سالین با غلظت mg/ml ۰/۷ تهیه شد. سپس در روز ۸ انکوباسیون تخم مرغها را به شش گروه مشابه تقسیم کردیم:

گروه اول: گروه کنترل (شاهد) بدون تزریق هستند.

گروه دوم: گروه کنترلی هستند که µl ۵۰۰ نرمال سالین به آنها تزریق شد.

گروه سوم: به این گروه µl ۵۰ از محلول استاندارد دوکسپین هیدروکلراید تزریق شد (۳۵ µg/egg).

گروه چهارم: به این گروه µl ۱۰۰ از محلول استاندارد دوکسپین هیدروکلراید تزریق شد (۷۰ µg/egg)

گروه پنجم: به این گروه µl ۲۰۰ از محلول استاندارد دوکسپین هیدروکلراید تزریق شد (۱۴۰ µg/egg).

گروه ششم: به این گروه µl ۵۰۰ از محلول استاندارد دوکسپین هیدروکلراید تزریق شد (۳۵۰ µg/egg).

البته برای تزریق به تخم مرغها با تابانیدن نور موازی با شدت زیاد از زیر تخم مرغ سوزن را وارد تخم مرغ کردیم و به این ترتیب تا حدودی موقعیت تزریق را می توان مشاهده کرد.

سپس در روز ۱۷ انکوباسیون جنین های زنده را از داخل تخم مرغها خارج کرده و پرده های دور جنین را باز می کنیم. سپس آنها را به وسیله متد آلیزارین - رد رنگ کردیم (۱۵ ,۱۶). کلیه داده ها توسط روش آماری Chi-square, Student's t - test بررسی شدند و $p<0.05$ بعنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

نتایج حاصل از بررسی اثرات تراتوژنیک داروی دوکسپین هیدروکلراید بر روی سنتز DNA و پروتئین در جدول ۱ ذکر شده است. همانطور که مشاهده می شود بین میانگین غلظت DNA و پروتئین رویانهایی که در تماس با غلظت µg/ml ۰/۱۵ دوکسپین هیدروکلراید قرار گرفته اند در مقایسه با گروه شاهد کاهش مشاهده می شود. ارزیابی این نتایج بوسیله روش آماری student's t-test نشان می دهد که این کاهش غلظت DNA ($p<0/05$) و پروتئین ($P<0/01$) بین دو گروه شاهد و تحت درمان معنی دار است.

	تعداد رویان کشت داده شده	تعداد رویان مرده	پروتئین µg/Embryo ± SE	DNA µg/Embryo ± SE
گروه کنترل	۵۱	۳	۷۶/۳±۰/۵	۹/۴۶±۰/۱۳
گروه تست ۰/۱۵µg/ml دوکسپین هیدروکلرید	۴۵	۸	۶۹/۸±۰/۸ **	۸/۷۴±۰/۱۹ *

جدول شماره ۱: اثرات دوکسپین هیدروکلراید در غلظت ۰/۱۵mg/ml روی رویان موش صحرایی در کشت رویان کامل ** $p<0.01$, * $p<0.05$

همچنین افزایش در تعداد مرگ و میر رویانهای گروه تست مشاهده شد ولی این افزایش با انجام تست دقیق فیشر معنی دار نبود.

در بررسی با تخم مرغ نطفه دار در غلظتهای مختلف µg/egg ۳۵۰، ۱۴۰، ۷۰، ۳۵ همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود هیچ ناهنجاری مشخصی در سیستم اسکلتی (طول استخوانهای بازو، زند زیرین، زبرین، درشت نی، ران و فاصله تاج سر تا دنبالچه) مشاهده نشد و میانگین اندازه گیری های انجام شده هیچ تفاوت معنی داری را در مقابل گروه کنترل نشان نداد. در تعداد رویانهای مرده نیز در غلظتهای مختلف دوکسپین هیدروکلراید بجز غلظت µg/egg ۳۵۰ تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در غلظت µg/egg ۳۵۰ با تست Chi-square یک افزایش معنی داری ($P<0.01$) مشاهده شد که تنها آسیب مشاهده شده در این بخش از تحقیق بود.

بحث:

عمده ترین بررسی هایی که تاکنون بر روی دوکسپین هیدروکلراید انجام شده است مربوط به کاربردها، عوارض کلینیکی، تداخلات و فارماکوکینتیک دارو می باشد. در رابطه با اثرات تراتوژنیک این دارو اطلاعات زیادی در دست نیست. در مطالعه ای که توسط Ciszewske- Popiolek در سال ۱۹۸۲ انجام شد، مشاهده شد که تجویز mg/kg/day ۰/۳۱ دوکسپین هیدروکلراید از راه خوراکی به موشهای صحرایی باردار فعالیت آلکالن فسفاتاز جفت را کاهش و فعالیت اسید فسفاتاز و گلوکز ۶ فسفاتاز را افزایش می‌دهد. همچنین تجویز دوز mg/kg/day ۴/۴۱ دوکسپین هیدروکلراید فعالیت ATPase را کاهش می‌دهد و این اثر باعث اختلال در متابولیسم جفت می شود (۶).

همین گروه در سال ۱۹۸۴ گزارش کردند که همین دوزها باعث کاهش فعالیت ATPase و آلکالن فسفاتاز و اسید فسفاتاز و افزایش فعالیت گلوکز ۶ فسفاتاز در هپاتوبلاست می شوند که این تغییرات باعث بی نظمی متابولیسم در کبد جنین می گردند (۷).

Owaki و همکارانش در سال ۱۹۷۱ گزارش نمودند که تجویز mg/kg/day ۱۰۰-۵ دوکسپین هیدروکلراید به خرگوش باردار از روز ۸ تا ۱۶ بارداری بطور مشخص مرگ و میر در جنین ها را افزایش می‌دهد همچنین منجر به تأخیر در استخوان سازی جناغ سینه و تغییرات در دنده ها می‌شوند (۱۷).

گزارش دیگری از همین گروه در دست است مبنی بر اینکه تجویز mg/kg/day ۲۷۰ دوکسپین هیدروکلراید بصورت خوراکی از روز ۹ تا ۱۴ بارداری باعث افزایش مرگ و میر جنین می‌شود ولی تاکنون هیچ اثر تراتوژنیک مشخصی مشاهده نشده است(۱۸).

Saha و همکاران وی در سال ۱۹۸۶ گزارش نمودند که دوکسپین هیدروکلراید با دوز بالاتر از μg/mg protein ۲۰۰ باعث مهار آنزیم کولین استراز در مغز جنین انسان می‌شود. ،البته دوکسپین هیچ اثری روی فعالیت سیستم MAO مغزی نداشت و این تحقیق نشان می‌دهد که دوکسپین هیدروکلراید ممکن است روی بلوغ مغزی جنین انسان اثر مهمی بر جای بگذارد (۳).

Simpkins و همکارانش در سال ۱۹۸۵ گزارش نمودند که تجویز دوکسپین در ثلث دوم دوره بارداری موش صحرایی (روزهای ۱۴-۸ بارداری) منجر به افزایش مشخصی در مرگ و میر جنین های موش صحرایی می‌شود.

در تحقیقی که ما انجام دادیم تجویز دارو با غلظت μg/ml ۰/۱۵ به جنین موش صحرایی به این علت است که حداکثر غلظت درمانی در پلاسمای انسان معادل همین غلظت است و رویان در این روش در یک محیط بسته همواره با این غلظت در تماس است و سیستم حذفی وجود ندارد که از غلظت داروی مورد نظر کاسته شود و مشاهده شد که این دارو با این غلظت (μg/ml ۰/۱۵) منجر به کاهش سنتز DNA و پروتئین در جنین ۱۰ روزه موش صحرایی می‌شود. دوزهای μg/egg ۳۵۰، ۱۴۰، ۷۰، ۳۵ از دوکسپین در تخم مرغ با توجه به گزارشات قبلی و معیار سمیت مادری انتخاب شدند (۲۰). نتایج نشان داد که در غلظت‌های فوق دارو هیچ ناهنجاری مشخصی در سیستم اسکلتی رویانها ایجاد نمی‌کند و تنها در دوز μg/egg ۳۵۰ منجر به افزایش مرگ و میر رویانهای تحت درمان در مقایسه با گروه شاهد شد.

با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که:

- دوکسپین هیدروکلراید در اکثر گونه ها باعث افزایش مرگ رویان می‌شود و این مسئله در انسان می‌تواند بصورت سقط و کاهش میزان باروری ظاهر شود.
- دوکسپین هیدروکلراید با تأثیر بر روی عملکرد آنزیم‌ها بدون ایجاد ناهنجاری مورفولوژیک و ظاهری باعث تغییرات عملکردی بر روی کبد و CNS می‌شود که این اثرات را می‌توان با آزمایشات سیستم متابولیسمی و همچنین اثرات CNS را با تستهای رفتاری بررسی نمود.
- کاهش میزان DNA و پروتئین جنین های کشت داده شده در خارج بدن به علل مختلف و ناشی از تداخل این دارو با سیستم‌های آنزیمی سنتز سلولی ممکن است توجیه شود و لیکن آنچه مسلم است این است که هنوز نمی‌توان مکانیسم این اثر را با قطعیت بیان نمود. این اثر دوکسپین در داخل بدن می‌تواند بصورت کاهش رشد جسمی ظاهر گردد که متأسفانه در جنین جوجه دیده نمی‌شود. افزایش میزان مرگ و میر با دوزهای بالاتر می‌تواند نشانگر سمیت جنین باشد که در انسان ممکن است بصورت سقط ظاهر شود. نهایتاً نتایج بیانگر آن است که این دارو توانایی اثر بر جنین را دارد و حتی‌الامکان از مصرف آن در دوران بارداری باید خودداری

	تعداد رویانها	تعداد رویانهای مرده	بازو mean±SE (mm)	زندزیرین mean±SE (mm)	زندزیرین mean±SE (mm)	ران mean±SE (mm)	درشت mean±SE (mm)	فاصله تاج سرتادنبالچه mean±SE
کنترل	۴۰	۶	۱۰/۶۶ ±۰/۱۱	۹/۶۶ ±۰/۱	۹/۸۲ ±۰/۰۷	۱۷/۱ ±۰/۲	۲۲/۷۵ ±۰/۱۶	۶۶/۷۵ ±۰/۶۹
نرمال سالین ۰/۵ cc/egg	۳۹	۴	۱۰/۶۴ ±۰/۱۵	۹/۴۴ ±۰/۱	۹/۵۶ ±۰/۱۲	۱۶/۷۱ ±۰/۱۸	۲۱/۹۳ ±۰/۲۶	۶۶/۵۵ ±۰/۴۲
دوکسپین ۳۵μg/egg	۳۹	۱۰	۱۰/۳۶ ±۰/۱۳	۹/۴۶ ±۰/۱	۹/۵۴ ±۰/۰۹	۱۶/۷۸ ±۰/۱۳	۲۱/۵۲ ±۰/۱۹	۶۶/۳۲ ±۰/۴۱
دوکسپین ۷۰μg/egg	۴۱	۷	۱۰/۲۲ ±۰/۱۳	۹/۹۸ ±۰/۰۸	۹/۷۳ ±۰/۱۱	۱۷/۱۱ ±۰/۱۳	۲۲/۵۲ ±۰/۱۲	۶۶/۱۸ ±۰/۲۷
دوکسپین ۱۴۰μg/egg	۳۸	۷	۱۰/۳۷ ±۰/۱۳	۹/۴۱ ±۰/۰۹	۹/۶۵ ±۰/۱۱	۱۷/۰۹ ±۰/۱۶	۲۲ ±۰/۲۳	۶۶/۲۹ ±۰/۴۹
دوکسپین ۳۵۰μg/egg	۴۱	۲۰ *	۱۰/۴۹ ±۰/۱۶	۹/۳۶ ±۰/۱۲	۹/۶۵ ±۰/۱۱	۱۷/۱۴ ±۰/۱۲	۲۲/۵ ±۰/۰۹	۶۵/۷۱ ±۰/۸۷

جدول شماره ۲: اثرات غلظت های مختلف دوکسپین بر روی اسکلت جنین جوجه

* P<0.01

نمود و در صورت اجبار کمترین مقدار درمانی
قابل تجویز است.

REFRENCES:

1- Sifton D. W., *PDR*, 49th ed., Medical Economics, Montrale, 1995, pp.2098.

2- Gennaro A. R., *Remington's pharmaceutical Science*, 18th ed., Mack published company, pennysylvania, 1990, pp. 1092.

3- Saha U. K., Biochemical studies on the in vitro effect of doxepin on Mg^{2+}& Na^{+},K-ATPase of human fetal & adult brain. *Indian J. Med. Res.*, 1980, 27-31.

4- Katzung B. G., *Drug therapy*, 2nd ed. chapter 1, Applenton & Lang, US, 1991, pp. 4.

5- Falterman C. G. Richardson C. J., Small left colon syndrome assosiated with maternal ingestion of psychotropic drugs, *J. pediatr.*, 1980, 97: 308-310.

6- Ciszewska-popiolek B. Kostrubick M., Histochemical analysis of the rat placenta after experimental adiministration of a psychotropic drug during the gestation period, *Ann. Univ. Maria. Curi-Sklodowska, Sect. D*, 1982, 37:239-241.

7- Ciszewska-popiolek B. Wysocka G., Effect of psychotropic drug administrated during pregnancy on histochemical reactions in the embryonic liver, *Ann. Univ. Maria. Curi-Sklodowska, Sect. D*, 1979, 35:251-257.

8- Chatot C. L. Klein N. W., Succesful culture of rat embryos on human serum use in the detection of teratogens, *Science*, 1980, 207: 1471-1473.

9- New DAT, Techniques or assesment of teratogenic effect: embryo culture, *Encironment Health Prespective*, 1976, 18:105-110.

10- New DAT, Whole embryo culture and the study of mamalian embryos during organogenecies, *Biol. Rev.*, 1978, 53:81-122.

11- Neubert D., The use of culture techniques in studies on prenatal toxicity, *Pharm. Ther.*, 1982, 18:397-347.

12- Schemid B. P. Goulding E. Kitchen K. Sanyl M. K., Embryonic and fetal development fundamental research, *Reprod. Toxicol.*, 1993, 7: 155-164.

13- Giles K. W. Myers A., An improved diphenyl amine method for the estimation of the DNA, *Nature*, 1965, 206:3.

14- Lowry O. H. Rosebrough N. G. Farr A. L. Randell R. J., Protein measurment with the folin phenol reagent, *Biological Chemistry*, 1951, 193:265-275.

15- Lipman H. J., Staining the skeleton of cleared embryos with Alizarin reds, *Stain Technology*, 1935, 10(2): 61-63.

16- Kell W. L. Bryden M. M., A modified diffrential stain for cartilage and bone in whole mount preparation of mamalian fetuses and small vertebrates, *Stain Technol.*, 1983, 58(3):131-134.

17- Yasuo O. Momiyama H. Onodera N., Effect of doxepin hydrochloride administration to pregnant rabbit upon the fetuses, *Oyo Yakuri*, 1971, 5 (6): 1905-1912.

18- Yasuo O. Momiyama H. Onodera N., Effect of doxepin hydrochlorice administration to pregnant rats upon the fetuses and their postnatal, *Development*, 1971, 5(6): 913-924.

19- Jlinek K. R. Peterka M., Chick embryo toxicity screening test 130 substances tested, *Indian J. of Exp. Bio.*, 1985, 23: 588-595.