

التأثيرات الجانبية لعقار الريبافارين في هلاكات أجنة الفئران وهياكلها العظمية Side Effects of Ribavirin Drug on Mice Embryos and their Skeleton

سعد محمد ندا *

عادل فوزي شهاب

صفا صلاح سلمان

كلية العلوم/جامعة تكريت

*مركز بحوث التقنيات الاحيائية/ جامعة النهريين

Safa S. Salman

Adel F. Shihab

Saad M. Nada*

College of Science/ Tikrit University

*Biotechnology Research Center/ AL-Nahrain University

الملخص

هدف الدراسة الحالية تسليط الضوء على التأثيرات الوراثية الخلوية لعقار الريبافارين (RBV) في الحيوانات المختبرية (الفأر الابيض)، وتم الاعتماد على هلاكات الاجنة وتشوهات الهيكل العظمي للفأر الابيض. درست التحليلات الوراثية الخلوية لعقار (RBV) على الفئران، التي قسمت إلى خمس مجاميع شملت مجموعة السيطرة السالبة التي تمثل الحيوانات الجرعة بدراى (PBS) ومجموعة السيطرة الموجبة المعاملة بعقار السايكلوفوسفوامايد (CP) وثلاث مجاميع معاملة بالعقار (RBV) بالتركيز 10, 20, 50 ملغم/كغم، درست التشوهات الجينية للعقار Teratogenes حيث أظهرت النتائج ان هناك فروقا معنوية باحتمالية ($P < 0.05$) في معدل أوزان أجنة الفئران للمجاميع المدروسة، فقد أظهرت مجموعة السيطرة السالبة أعلى معدل وزن للأجنة بلغ (1.55) غم، في حين سجلت معاملة السيطرة السالبة أقل معدل وزن بلغ (0.59) غم، بينما كانت معدلات أوزان الاجنة للمجاميع الجرعة بعقار (RBV) ذات التركيز 10، 20، 50 ملغم/كغم هي 0.89، 0.71، 0.61 غرام على التوالي. اما بالنسبة لحساب عدد هلاكات الاجنة لوحظ وجود هلاكات عند التركيز العالية من العقار (50) ملغم/كغم وكذلك ظهرت الهلاكات بنسبة عالية جدا في السيطرة الموجبة، وعند دراسة تأثير عقار (RBV) على الهيكل العظمي للأجنة لوحظ ظهور تشوهات بالهيكل العظمي في منطقة الاضلاع وفقدان الضلع الثالث عشر في بعض الاجنة عند التركيز العالية من العقار.

الكلمات المفتاحية : عقار الريبافارين، الفأر الابيض

Abstract

This study focused on the cytogenetic effect of Ribavirin (RBV) drug on teratogenic lab animals (Mice). Several cytogenetic analyses (skeleton abnormal of embryos in mice). Studied the genetic effect of drug (RBV) on mice. That mice were divided into five experiment groups as the following: Negative control group: Animal orally treated with PBS buffer, positive control group was treated with (CP) and three groups treated with (RBV) with concentration 10, 20, 50 mg/kg, in other experiment studied teratogens of drug (RBV) result show significant differences ($p < 0.05$) in body weight of mice embryo of study groups, negative control group recorded rate highly in embryo body weigh was (1.55) gm. While recorded positive control group rate less in weight of orally treated groups with (RBV) with concentration 10, 20, 50 mg/kg were 0.89, 0.71, 0.61 gm. Respectively the result show influences to (RBV) in embryo number at high concentration (50) mg/kg, while show died embryos in positive control group. Also the result shows abnormality in skeleton of embryos at concentration of drug 50 mg/kg.

Key words: Ribavirin Drug, white mice

المقدمة

الريبافارين RBV هو مضاد فايروسي Antiviral drug ينتمي الى مجموعة مشابهات القواعد Base analogue وهو نيكولوسايد تخليقي نظير البيورين Synthetic purine nucleoside analogue وبالتحديد الكوانوسين (guanosine). تم اكتشاف العقار لأول مرة من قبل [1]، وله اسماء تجارية متعددة مثل copequs, virazole Ribasphere ويعرف أيضاً بـ Rebeton عند مايوصف مع الانترفيرون interferon [2]. وبسبب سميته استعمل هذا العقار فقط في الامراض الفايروسية الخطره [13، 12] حيث اثبت ان له تأثيرات جانبية عديدة اهمها السمية الكبدية Hepatotoxicity والسمية الجينية Teratogenicity [14] والسمية الدموية [14] Hematologic toxicity. ان عقار RBV غير فعال بحالته الطبيعية ولكن مساره الابيض داخل الجسم (سواء عن طريق الفم أو الوريد) يتم تحول العلاج في الكبد الى بيورين (guanosine) ونيوكلوئيدات الحامض النووي RNA وهو بهذا الشكل يتداخل مع تكرار الحامض النووي الضروري لمضاعفة وتكاثر الفايروس وبهذه الحالة يعيق تكرار RNA وال DNA للفايروس ويمنع تكاثره [15].

تظهر فعاليته ضد انواع مختلفة لفايروسات RNA خارج الجسم الحي *in vitro* وداخله *in vivo* [4، 3] وتتضمن فايروسات RNA من عائلة [5، 6] Paramyxoviruse وعائلته [7، 8] Flaviviruses وعائلته [9] Picornaviruses وكذلك عائلته [10] Arenavirusc كما تظهر فعاليته ضد انواع معينة لفايروسات، DNA [11، 4]. بدأت بعض العوامل الطبيعية منذ بداية القرن العشرين تهدد بتطوير حالات الشذوذ الولادية في نسل الانسان والحيوان، فضلاً عن

قابلية التداخل والتحول للأشعة السينية والأشعة الراديوية والنظائر المشعة وبعض المعادن والعناصر غير العضوية في التطور الجنيني، ومن جانب آخر اشار كثير من الباحثين الى تأثير العقاقير الطبيعية في النظام الوراثي للخلايا وعمليات التطور الجنيني بشكل تراكمي [16]، لذلك ان التقويم الشامل لتأثير العقاقير باستخدام الحيوانات المختبرية سوف يساعد في تقليل احتمالية ظاهرة التأثيرات المضرة للعقاقير في الأجنة. وأول من قام بعملية تصيب ناجحة للهيكل العظمي للأجنة هو [17]. ثم طورت طريقة التصيب هذه من قبل Yamada, Dawson, Inouye وما زالت هذه الطريقة في تطور مستمر اذ ما قورنت بالطرق المتبعة في الماضي [18]. لقد اجريت العديد من البحوث حول تأثير العقاقير في الاجنه وخصوصا على هيكلها العظمي باستخدام طريقة التصيب بصيغة الاليزارين الحمراء Alizarin Red لمراقبه الاستخدام اليومي للعقاقير من قبل الامهات اثناء الحمل أو قبله وتأثيراته السلبية في الأجنة وخصوصاً على نمو الهيكل العظمي للجنين. كما توضح بعض البحوث ان العقاقير المستخدمة ضد الاورام الخبيثة مثل Carboxamide (DIC) تنتج تشوهات بالفك واللهاة والدماع واطراف الاجنة عند اعطائها للجرذان اثناء مدة حملها [19] علاوة على ذلك فان لعقار السايكلوفوسفواميد تأثير كبير على الاجنة اذ ان التعامل مع هذا العقار اثناء مدة حمل الامهات يؤدي الى زيادة التشوهات الجنينية [20]. كما لاحظ باحثون آخرون ظهور تشوهات بالجهاز الهيكلي تضمنت انشطار العظام الطويلة وتقوسها وفقدان بعض الاضلاع [21] وقد برهنت التجارب المختبرية ان عقار RBV يثبط تكاثر الخلايا الجذعية العظمية Osteoblast proliferation [22]، كما اثبتت دراسات اخرى سميتها الوراثية في الانسان وذلك من خلال تجارب أجريت على الحيوانات [23]. وقد اثبت Narayana وآخرون بأن RBV مطفر وراثي في الخلايا الجرثومية لجرذان وسيت Wster rats [24]. هدفت الدراسة الى دراسة تشوهات الهيكل العظمي لأجنة الفئران المعاملة بعقار الريبافارين.

المواد وطرق العمل

الحيوانات المختبرية

اجريت الدراسة الحالية على ذكور واناث الفئران البيضاء (Albino mice) من سلالة *Mus musculus* المجهزه من البيت الحيواني التابع لمركز بحوث التقنيات الاحيائية/ جامعة النهدين، وقد تراوحت اعمار الحيوانات ما بين (9-12) أسابيع وتتراوح أوزانها ما بين (18-25) غرام. وضعت الفئران في اقفاص بلاستيكية مغطاه بأغطية معدنية مشبكه وفرشت أرضيتها بمادة نشارة الخشب للمحافظة على بيئة ملائمة وغذيت على عليقة متوازنة من بروتين حيواني (7.15)، مجروش الحنطة (30.0)، مجروش الشير (7.15)، مجروش الذرة (22.5)، ملح الطعام (0.45) وحجر الكلس (0.20) مع مرعاة توفر ماء الشرب بشكل حر، حيث تم وضع 5 فئران (3 اناث: 2 ذكور) في كل قفص، ووضع الفئران في جميع مراحل التجربة تحت ظروف ترواحت درجة الحرارة بين (21-24)م. وتضمنت الدراسة استخدام (25) فأر قسمت الى (5) مجاميع كل مجموعة تحتوي على (5) فئران وشملت مجموعة السيطرة السالبة التي تمثل الحيوانات المجرعة بدرائ (PBS) ومجموعة السيطرة الموجبة المعاملة بعقار السايكلوفوسفواميد (CP) وثلاث مجاميع معاملة بالعقار (RBV) بالتركيز 10، 20، 50 ملغم/كغم، وجرعت بنفس الجرعة الموصى بها في التجربه ويستمر التجريب لمدة (3) أيام بعد ذلك تم ايقاف التجريب وتترك كل مجموعة مع ذكور التلقيح ليله كامله بنفس العدد (أنثى ، ذكر) ثم تؤخذ مسحة مهبلية وتفحص، فان وجود النطف Spermatozoa أو القيقح المهبلي Vaginal plug في المسحة المأخوذة يسجل على أنه اليوم الاول من الحمل [25]، وفي اليوم التاسع عشر من الحمل تم قتلها ونزع قرني الرحم ومن ثم أخذ الاجنة ودراستها عن طريق حساب عدد هلاكات الأجنة في كل قرن في الرحم ووزن كل جنين وحساب عدد هلاكات الأجنة بكل قرن ودراسة الهيكل العظمي له .

تصيب الهيكل العظمي لجنين الفأرة بصيغة الاليزارين الحمراء [26]

محلول المثبت Fixative Solution

حضر انياً عند الاستعمال، بأضافة 3 حجوم من الكحول المثلي methanol (99.8%) الى حجم واحد من حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic Acid (99.9%) .

محلول الكليسيرين Glycerin Solution

تم تحضيره بأذابة (1) غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في (80) مل من الماء المقطر مضافاً اليه (20) مل من الكليسيرين.

محلول صبغة الاليزارين الحمراء Alizarin Red Stain Solution

حضر بأذابة (0.02) غم من مسحوق الصبغة في (50) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز (1%) .

عقار الريبافارين Ribavirin Druge

أستخدمت كبسولات الريبافارين (مصرية المنشأ أنتاج شركة مينافارم) في دراسه الحاليه وتم اذابه محتويات الكبسوله الواحده بالماء المقطر (10) مل، وحفظ بالثلاجة بدرجة (4)م.

عملية التثبيت Fixation Process

بعد قتل الفأرة تم اخراج الرحم وأخذ الاجنة منه، ووضع في الكحول الايثلي المطلق (Ethanol) بتركيز (99%) لغرض التثبيت لمدة (24) ساعه وبعد ذلك تم اخراجها من الكحول الايثلي ووضعها في الكحول المثلي المطلق (Methanol) تركيز (95%) لمدة (48) ساعة و تم اخراجها من الكحول المثلي ووضعها في الاسيتون المطلق لمدة (24) ساعة وذلك لازالة الدهون منها.

عملية التصيب Staining Process

نقلت الاجنه بعد التثبيت الى محلول هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز (1%) لمدة (2) ساعة ثم صبغت بعد ذلك بصيغة الاليزارين الحمراء بتركيز (10%) المحضرة في الفترة (2-1-5-9) لمدة (24) ساعة ثم توضع بمحلول الكليسيرين وذلك لغرض توضيح الأجنة ولمدة (3) أسابيع. وبعد انتهاء من عملية التوضيح باستخدام محلول الكليسيرين أخذت الاجنة ووضعنت بمحاليل الكليسيرين بتركيز مختلفة (50،70،90)% اذ تم تحضيرها (حجم : حجم) من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم مع السماح بأبقائه بكل تخفيف لمدة يومان وبعد ذلك تم حفظه في (100) % كليسيرين. تم قراءة النتائج بالاعتماد على استمارات استبائية قياسية.

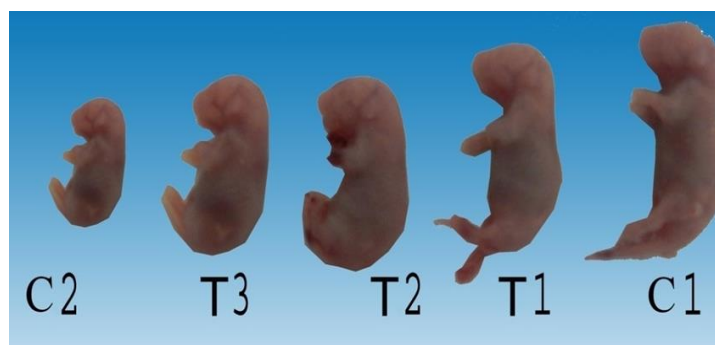
التحليل الإحصائي : Statistical analysis

تم التحليل الإحصائي لنتائج التجربه باستخدام طريقه النموذج الخطي العام (General linear model) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (SAS) لدراسة تأثير العوامل كما جرى اختبار دنكن (Duncan,1955) لتحديد معنويه الفروقات ما بين متوسطات العوامل المؤثره على الصفات المدروسة عند مستوى احتماليه $P \leq 0.05$.

النتائج والمناقشة

التأثيرات الجانبية لعقار الريبافارين على نسبة هلاكات الأجنة وأوزانها وهياكلها العظمية

أظهرت النتائج للدراسة الحالية الموضحة بالشكل (1) والمسجلة بالجدول (1) أن هناك تأثيراً معنوياً باحتمالية ($P \leq 0.05$) للمجاميع المدروسة في معدل أوزان أجنة الفئران، فقد تبين أن مجموعة السيطرة السالبة التي تمثل الحيوانات المجموعة بداري (PBS) قد سجلت أعلى معدل وزن أجنة بلغ 1.55 غم، في حين سجلت معاملة السيطرة الموجبة التي تمثل الحيوانات المعاملة بعقار السايكلوفوسفوامايد (CP) اقل متوسط إذ بلغ 0.59 غم، بينما كانت معدلات أوزان الأجنة للمجاميع المجموعة بعقار (RBV) بالتركيز (10 ، 20 ، 50) ملغم / كغم هي 0.89% ، 0.71% ، 0.61% غم على التوالي.



شكل (1): أجنة الفئران في اليوم 19 من الحمل (سيطره سالبيه C1, سيطره موجبه C2, التركيز الاول 10ملغم/كغم T1, T2 التركيز الثاني 20ملغم/كغم, التركيز الثالث 50ملغم/كغم T3)

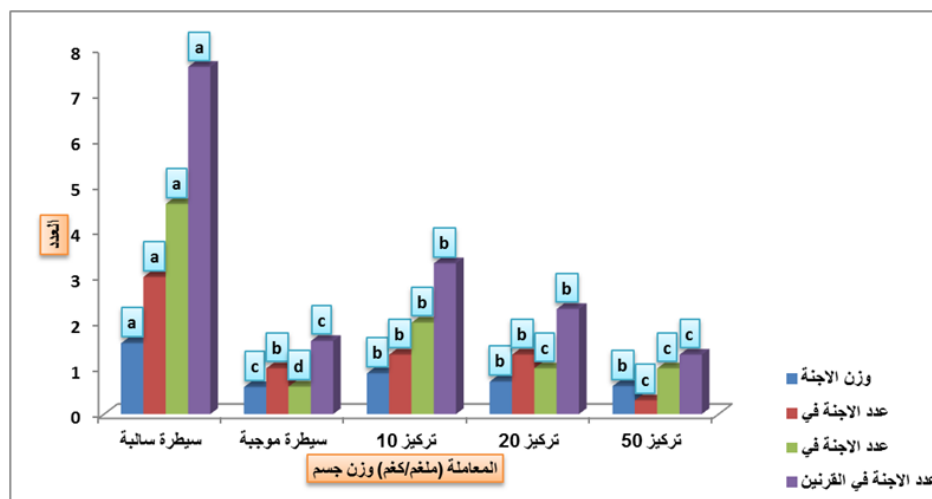
ويعود السبب في ذلك الى أن السمية الخلوية للعقار RBV إذ لاحظ الباحثين أن العلاج بـ (RBV) له التأثير الجانبية عديدة بما فيها السمية الجنينية Teratogenicity إذ يسبب تشوهات خلقية للجنين [14] بالإضافة الى ذلك يسبب طفرات لذلك لا ينصح باستخدامه للنساء الحوامل [28]. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما جاء به [29،30] بسبب زيادة نسبة التشوهات في حجمه ، سقف تجويف الفم ، العين والهيك العظمي لجين الجرذان والأرانب وتزداد نسبة التشوهات بالاعتماد على الجرعة .بينما بينت دراسات أخرى أن هذا العقار لا يملك أي سمية [31] .

جدول (1) :تأثير اضافة تراكيز من RBV في أوزان واعداد الأجنة للفئران البيضاء

المعاملة (ملغم/كغم) وزن جسم	عدد الأجنة في القرنين	عدد الأجنة في القرن الأيمن	عدد الأجنة في القرن الأيسر	وزن الأجنة
سيطرة سالبيه	7.6 ± ^a 0.81	4.6 ± ^a 0.78	3.0 ± ^a 0.47	1.05 ± ^a 1.55
سيطرة موجبه	1.6 ± ^d 0.34	0.6 ± ^b 0.33	1.0 ± ^c 1.60	0.59 ± ^c 0.59
تركيز 10	3.3 ± ^b 0.32	2.0 ± ^b 0.56	1.3 ± ^b 1.81	0.89 ± ^b 0.89
تركيز 20	2.3 ± ^b 0.30	1.0 ± ^c 0.65	1.3 ± ^b 1.42	0.71 ± ^b 0.71
تركيز 50	1.3 ± ^c 0.26	1.0 ± ^c 0.61	0.3 ± ^c 0.38	0.61 ± ^b 1.38

* ($P \leq 0.05$) المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً فيما بينها.

كذلك أظهرت النتائج أن لعقار السايكلوفوسفوامايد (CP) تأثيراً كبيراً في وزن الجنين ، وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسات شملت معاملة الفئران البيض بعقار (CP) بتركيز 20 ملغم/ كغم ، وفي اليوم التاسع عشر من الحمل أظهرت النتائج أن وزن الجنين (0.68%) بالمقارنة مع وزن مجموعة السيطرة السالبة التي كان معدل وزن الجنين (1.55) [32] . كذلك تتسجم النتائج التي حصلنا عليها مع ما هو مسجل عن كون عقار (CP) يسبب تشوهات خلقية في البشر وفي بعض الحيوانات المختبرية (الفئران والجرذان والأرانب والقردة) ، عند إعطاءه خلال مدة الحمل أو قبلها [33]. أما بالنسبة لأعداد الأجنة الحية وعدد الهلاكات إذ لوحظ أن هناك تأثيراً لعقار RBV فيها ، حيث لوحظ فروق معنوية باحتمالية ($P \leq 0.05$) في عدد الأجنة في القرن الأيمن للمجاميع المعاملة بعقار (RBV) عند مقارنتها بعينة السيطرة السالبة ولكن تلك المجاميع كانت تختلف معنوياً عن عينة السيطرة الموجبة المعاملة بعقار (CP) التي سجلت اقل معدلات بأعداد الأجنة في كلا القرنين وبهذا يظهر أن لعقار (CP) تأثيراً ملحوظ في عدد الأجنة الحية فضلاً عن ظهور هلاكات فيها كما موضح في شكل (2).



شكل (2): النسب المئوية لتأثير عقار الريبافارين على اوزان الاجنة واعدادها

وعند دراسة التأثيرات الجانبية لعقار (RBV) على تكوين الهيكل العظمي لأجنة الفئران ، بعد أخذها في اليوم التاسع عشر من الحمل حيث تم تصبغ الهيكل العظمي لتلك الأجنة بصبغة الاليزارين الحمراء وكما موضح بالشكل (3) .



شكل (3): الهيكل العظمي لأجنة الفئران معاملة بصبغة الاليزارين الحمراء

ومن هذا نستنتج أن لعقار RBV تأثيرات حادة حيث اثبت أن عقار RBV مثل باقي Nucleoside analogw يسبب تشوهات خلقية وطفرات [28]، وأن ما توصلنا إليه بخصوص علاقة RBV بالتشوهات الخلقية تؤكد الافتراض الذي جاء به [23] أن الريبافارين يدخل ضمن المواد ذات السمية الخلوية Cytotoxic والسمية الوراثية Genotoxic. لاحظ مجموعة من الباحثين أن النساء التي يستخدمن عقار (Arimidex) Anastrozole و (Femara) hetrozole لمسح معاودة سرطان الثدي فقدن كثير من الكثافة العظمية وزاد خط حدوث الكسور العظمية وذلك لان هذه العقاقير تعمل على منع إنتاج هرمون الاستروجين فضلاً عن انه يعمل على خفض كمية هذا الهرمون في الجسم وبهذا فأن غيابه يؤدي الى الخسارة المعجلة للكثافة العظمية [34]. أوضحت بعض التجارب لدراسات اخرى أن تعريض أجنة الفئران خلال الأيام الأولى من الحمل (1-5) أيام للاستروجين سبب زيادة في الكثافة العظمية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وذلك بعد إجراء عملية التصبغ لهيكلها [35]، فضلاً عن أن هناك دراسات أوضحت أن لهرمون الاستروجين دوراً في تشكيل ونمو العظام [36،37] .

المصادر

1. Witkoswski, J. T., Robins, R. K., Sidwell, R. W. and Simon, L. N. (1972). Design, synthesis and broad spectrum antiviral activity of 1- b- D- Ribofuranosyl- 1, 2, 4- triazole - 3-carboxamide and related nucleosides. J. Med. Chem. 15: 1150–1154.
2. Khalid, S.N.R., Khan, A.A., Alam, A., Lak, N.H., Butt, A.K., Shafqat, F., ALvi, A., Ahmed, L., Sarwar, S. and Niazi, A. (2009). Interferon – Ribavirin treatment in chronic hepatitis C the less Talked about Aspects. J. Ayub Med Coll Abbottabad. 21:99-102.
3. Allen, L. B. (1980). Review of *in vivo* efficacy of ribavirin. In: Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent, pp. 43–58, Smith, R. A. and Kirkpatrick, W. (eds.), Academic Press, London.
4. Sidwell, R. W., Huffman, J. H., Khare, G. P., Allen, L. B., Witkowski, J. T. and Robins, R. K. (1972). Broad spectrum antiviral activity of Virazole: 1-b-D-ribofuranosyl-1, 2,4-triazole-3- carboxamide. Science. 177: 705–706.

5. Povey, R.C. (1978). *In vitro* antiviral efficacy of ribavirin against feline calicivirus, feline viral rhinotracheitis virus, and canine parainfluenza virus. *Am. J. Vet Res.* 39:175.
6. Hruska, J.F., Bernstein, J.M., Douglas, R.G. Jr., Hall, C.B. (1980). Effects of ribavirin on respiratory syncytial virus *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 17:770.
7. Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J.Y., Lipkin, W.I. (2000). Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis.* 182:1214.
8. Neyts, J., Leyssen, P., De Clercq, E. (1999). Infections with flaviviridae. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 61:661.
9. Crotty, S., Maag, D., Arnold, J.J., Zhong, W., Lau, J.Y., Hong, Z., Andino, R., Cameron, C.E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med.* 6:1375.
10. Andrei, G. and De Clercq, E. (1990). Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* 287:5-14.
11. Markland, W., McQuaid, T.J., Jain, J., Kwong, A.D. (2000). Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:859.
12. Grancher, N., Venard, V., Kedzierewicz, F., Ammerlaan, W., Finance, C., Muller, C.P. (2004). Improved antiviral activity *in vitro* of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. *Antiviral Res.* 62: 135–137.
13. Urganci, N., Gulec, S.G., Arapoglu, M., Vural, S., Nuhog, A. (2005). The effect of ribavirin on bone density in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-ribavirin therapy. *JPediatr Gastroenterol Nut.* 41: 650–652.
14. Brok, J., Gluud, L.L., Gluud, C. (2006). Ribavirin monotherapy for chronic hepatitis C infection: a Cochrane Hepato-Biliary Group systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Gastroenterol.* 101: 842–847.
15. Torriani, F.J., Rodriguez-Torres, M. and Rockstroh, J. K. (2004). Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. 351:438-50.
16. Khafizyanova, R. Kh., Burykin, I. M., Aleeva, G. N. and Kiyasov, A. P. (2004). Effect of Dimephosphone (Monophosphonate) on the Course of Pregnancy and Fetal Development in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 137: 375-378.
17. Alden, B. D. (1962). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin red S. *Stain Tec.* 1: 123-124.
18. Erdodan, D., Kadiodlu, D. and Peker, T. (1995). Visualisation of the fetal skeletal system by double staining with Alizarin red and Alician blue. *Gazi Medical Journal.* 6: 55-58.
19. Koechel, J. and Muck, P. (1973). Protective Effects of Thymidine, 5-Aminoimidazolecarboxamide, and Riboflavin against Fetal Abnormalities Produced in Rats by 5-(3,3-Dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide. *Cancer Research.* 33:2231- 2240.
20. Mirkes, P.E. and Little, S.A. (1998). Teratogen-induced cell death in post-implantation mouse embryos: differential tissue sensitivity and hallmarks of apoptosis. *Cell Death Differ.* 5:592- 600.
21. Gibson, J. E. and Becke, B. A. (1988). The Teratogenicity of Cyclophosphamide in Mice 1-2. *Cancer research.* 28: 475-480.
22. Moreira, R.O., Balduino, A., Martins, H.S., Reis, J.S., Duarte, M.E., Farias, M.L. (2004). Ribavirin, but not interferon alpha-2b, is associated with impaired osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *Calcif Tissue Int.* 75: 160–168.
23. Narayana, K., D'Souza, U. J. and Seetharama Rao, K. P. (2002). Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. *Mutat. Res.* 513: 193-196.
24. Narayana, K., D'Souza, U. J. and Seetharama Rao, K. P. (2002). The genotoxic and cytotoxic effects of ribavirin in rat bone marrow. *Mutat. Res.* 521, 179-185.
25. Prakash, D., Gajendra, S. and Sukmahendra, S. (2007). Neuroimmune consequences of teratological insult induced by cyclophosphamide exposure during intrauterine life in mice. *Neuroanatomy.* 6: 6-11.
26. Peters, P.W.J. (1977). Double staining of fetal skeletons for cartilage and bone. In: *Methods in prenatal toxicology.* Neuberg, H.J.M.D. and Kwasigroch, T.E., (eds). Geory thieme verlag. stuttgart, Germany. Pp: 153-154.
27. Duncan, B.C. (1955). Multiple range and Multiple F.test: *Biometrics.* 11:1-42.
28. Ferm, V.H., Willhite, C., Kilham, H. (1978). Teratogenic effects of ribavirin on hamster and rat embryos. *Teratology.* 17: 93-102.
29. Tedjaratis Baker, C.H., Apte, S. and Huang, S. (2002). Synergistic therapy of human ovarian carcinoma implanted orthotopically in nude mice by optimal biological dose of pegylated interferon alpha combined with paclitaxel. *Clin. cancer. Res.* 8: 2413-2422.
30. Craxi, A. and Licata, A. (2003). Clinical trial results of peginterferons in combination with ribavirin. *Semin. Liver. Bis.,* 23 suppl 1:35-46.

31. Joksic, G., Stankovic, M., Vasic, V., Cakar, M. and Jokanovic, M. (2000). Influence of ribavirin on the micronucleus formation and *in vitro* proliferation of human lymphocytes. *Neoplasma*. 47:283-287.
32. Prakash, D., Gajendra, S. and Sukmahendra, S. (2007). Neuroimmune consequences of teratological insult induced by cyclophosphamide exposure during intrauterine life in mice. *Neuroanatomy*. 6: 6-11 .
33. Briggs, G.G., Freeman, R.K. and Yaffe, S.J. (1994). *A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk. Drugs in Pregnancy and Lactation*. 4th ed. Baltimore, M.D. (ed.) Lippincott, Williams and Wilkins. Pp: 234.
34. Frederick, S., Sarahann B. and Catherine, A. R. (2007). Study Confirms Risk of Bone Loss for Patients Taking Exemestane. *Lancet Oncol*. 8: 119- 127.
35. Migliaccio, S., Newbold, R. R., Bullock, B. C., Jefferson, W. J., Sutton, F. G., McLachlan, J. A. and Korach, K. S. (1996). Alterations of maternal estrogen levels during gestation affect the skeleton of female offspring. *Endocrinology*. 137: 2118-2125.
36. Verhaeghe, J., Oloumi, G., van Herck, E., van Bree, R., Dequeker, J., Einhorn, T. A. and Bouillon, R. (1997). Effects of long-term diabetes and/or high-dose 17 beta-estradiol on bone formation, bone mineral density, and strength in ovariectomized rats. *Bone*. 20: 421-428.
37. Yeh, J. K., Chen, M. M. and Aloia, J. F. (1997). Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 273: 734-742.