



Histological Effects of Paxlovid on Skeletal System Development in a Rat Model

Abdollahi A^a, Morovati-Sharifabad M^{b*}, Salehi E^c, M Rashidi M^d,
Golmisheh AR^e, Morovvati H^f

^a Ms.C. student of cellular and developmental biology, Department of basic science, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran, Email: s2152847131@gmail.com, ORCID: 0009-0005-9545-0649

^b Associate Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran, Email: mmorovati@ardakan.ac.ir, ORCID: 0000-0002-4568-1562

^c Associate Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran, Email: esalehi@ardakan.ac.ir, ORCID: 0000-0003-3004-1252

^d Ph.D. in Histology, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran, Email: Mohsenrashidi3000@gmail.com, ORCID: 0009-0008-6253-6309

^e Assistant Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran, Email: arezaei82@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5755-3348

^f Professor, Department of Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran, Email: mmorovvati@ut.ac.ir, ORCID: 0000-0003-0275-1636

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Abdollahi A, Morovati-Sharifabad M, Salehi E, M Rashidi M, Golmisheh AR, Morovvati H. Histological Effects of Paxlovid on Skeletal System Development in a Rat Model. *Journal of Cell and Tissue*. 2025; 16(4): 337-336.

Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(4): 337-351.

KEYWORDS

Paxlovid,
Fetal development,
Skeletal
morphogenesis,
COVID-19,
Sars Cov-2

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Paxlovid, an investigational oral therapeutic combining the antiviral Nirmatrelvir and the pharmacokinetic enhancer Ritonavir, is being developed to treat SARS-CoV-2 infection, aiming to reduce severe disease progression, hospitalization, and mortality. While its efficacy has been shown in Phase 2/3 trials for non-hospitalized patients, its safety, particularly regarding fetal development, remains under investigation. Coronaviruses have long posed significant challenges to global public health, with their potential to cause severe respiratory infections in humans. Over the past two decades, two novel coronaviruses—Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)—have emerged, leading to widespread morbidity and mortality. The SARS - CoV outbreak, which occurred in the early 2000s, infected over 8,000

* Corresponding author. Tel: 09129373756

E-mail address: mmorovvati@ardakan.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.16.4.337>

Received: 5 May. 2025; Received in revised form: 16 Aug. 2025; Accepted: 19 Oct. 2025

Original Article

© Author



individuals worldwide and resulted in nearly 800 deaths, representing a mortality rate of approximately 10 %. Similarly, MERS - CoV, identified in 2012, caused 857 confirmed infections and 334 deaths, with a strikingly high mortality rate of around 35 %. These outbreaks underscored the persistent threat posed by coronaviruses to human health.

Aims: Pregnant women represent a particularly vulnerable population during infectious disease outbreaks, and the potential teratogenic effects of new therapeutics must be carefully evaluated. Previous studies on Nirmatrelvir have explored its effects on skeletal morphogenesis, but comprehensive data on Paxlovid's impact on fetal development remain limited. This study aims to address this gap by investigating the effects of Paxlovid on the reproduction and skeletal morphogenesis of rat embryos, providing critical insights into its safety profile during pregnancy. By elucidating the potential risks associated with Paxlovid, this research contributes to the broader effort to ensure the safe use of antiviral therapies in vulnerable populations. This study assessed the potential embryotoxic effects of Paxlovid on rat fetal skeletal morphogenesis, following ICH guidelines.

Materials and methods: Pregnant rats were divided into four groups, receiving doses of 0, 100/60, 300/200, or 1000 mg/kg/day of Paxlovid. Maternal clinical symptoms and weight were monitored, and fetal outcomes, including weight, crown-rump length (CRL), and abdominal circumference (AC), were evaluated on gestational day 21. Histological analysis of fetal skeletal tissue was conducted using hematoxylin-eosin and Alizarin Red S staining to detect structural abnormalities.

Results: Results showed reduced maternal weight gain in Paxlovid-treated groups compared to controls. Fetuses in treated groups also exhibited lower weight, CRL, and AC. However, histological analysis revealed no structural abnormalities in skeletal tissue. These findings suggest that while Paxlovid may transiently affect fetal growth metrics, it does not induce teratogenic effects on skeletal development.

Discussion: The findings of this study revealed no histological abnormalities in the skeletal system of fetuses exposed to Paxlovid. The observed effects were limited to reductions in fetal weight, crown-rump length (CRL), and abdominal circumference (AC). Collectively, the data from this investigation, along with existing evidence, suggest a low risk of fetal harm associated with Paxlovid, which comprises Nirmatrelvir (NMV), a potent and selective inhibitor of the SARS-CoV-2 main protease, and Ritonavir, a pharmacokinetic enhancer. Nonetheless, the use of Paxlovid during pregnancy should be carefully evaluated, with a thorough discussion of potential risks and benefits conducted in consultation with a healthcare professional.

Conclusion: The study concludes that Paxlovid does not compromise the histological integrity of fetal skeletal tissue, supporting its potential safety during pregnancy. However, further research is needed to understand the mechanisms behind the observed growth effects and to confirm these findings in human populations. Overall, the results indicate a low risk of fetal harm, reinforcing Paxlovid's safety profile for use in pregnant individuals.



اثر داروی پاکسلوئید بر مورفوژنز سیستم اسکلتی در مدل حیوانی رت (مطالعه بافت‌شناسی)

علی عبداللهی^۱، مجید مروتی-شریف‌آباد^۲، الهام صالحی^۳، محسن رشیدی^۴، علی رضایی^۵
گلمیشه^۶، حسن مروتی^۶

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و تکاملی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران، s2152847131@gmail.com
ORCID: 0009-0005-9545-0649

^۲ دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران، mmorovati@ardakan.ac.ir، ORCID: 0000-0002-4568-1562

^۳ دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران، esalehi@ardakan.ac.ir، ORCID: 0000-0003-3004-1252

^۴ دکترای تخصصی بافت‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، Mohsenrashidi3000@gmail.com، ORCID: 0009-0008-6253-6309

^۵ استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران، arezaei82@gmail.com، ORCID: 0000-0001-5755-3348

^۶ استاد، گروه بافت‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، hmorovvati@ut.ac.ir، ORCID: 0000-0003-0275-1636

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: پاکسلوئید، یک داروی ترکیبی خوراکی حاوی نیرماترلوئیر (عامل ضد ویروسی) و ریتوناویر (تقویت‌کننده فارماکوکینتیک)، برای درمان کووید-۱۹ با هدف کاهش شدت بیماری، بستری و مرگ و میر توسعه یافته است. با این حال، ایمنی آن در دوران بارداری، به‌ویژه تأثیر آن بر رشد جنین، نیاز به بررسی دارد. این مطالعه با رعایت دستورالعمل‌های ICH، اثرات احتمالی پاکسلوئید بر مورفوژنز اسکلتی جنین موش را ارزیابی کرد. مواد و روش‌ها: رت‌های باردار به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول (کنترل) دارویی دریافت نکرد، گروه دوم دوزهای ۶۰ و ۱۰۰، گروه سوم دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ و گروه چهارم دوز ثابت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه پاکسلوئید را دریافت کردند. پارامترهای مادرانه (وزن و علائم بالینی) و جنینی (وزن، طول سر-دم) CRL (و دور شکم) AC ((در روز ۲۱ بارداری بررسی شدند. ناهنجاری‌های اسکلتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و آلبزارین رد S ارزیابی شدند. نتایج: کاهش وزن مادران و جنین‌ها در گروه‌های تحت درمان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، اما آنالیز بافت‌شناسی اسکلت، ناهنجاری ساختاری نشان نداد. این یافته‌ها حاکی از آن است که پاکسلوئید اگرچه ممکن است بر شاخص‌های رشد جنین تأثیر گذارد، اما اثر تراژونیک بر اسکلت ندارد. نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پاکسلوئید یکپارچگی اسکلت جنین را مختل نمی‌کند و از ایمنی نسبی آن در بارداری حمایت می‌کند. با این حال، پژوهش‌های بیشتر برای درک مکانیسم‌های تأثیر بر رشد و تعمیم نتایج به انسان ضروری است. به‌طور کلی، یافته‌ها حاکی از خطر پایین آسیب جنینی بوده و ایمنی پاکسلوئید را در جمعیت‌های باردار تقویت می‌کنند.</p>	<p>پاکسلوئید، رشد جنین، مورفوژنز اسکلتی، سارس-کوئید-۲، کوئید-۱۹</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۵</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۲۵</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۷</p>

۱- مقدمه

کروناویروس‌ها با پتانسیل ایجاد عفونت‌های تنفسی شدید در انسان، مدت‌ها است که چالش‌های مهمی را برای سلامت عمومی جهانی ایجاد کرده‌اند. در طول دو دهه گذشته، دو کروناویروس جدید - کروناویروس سندرم تنفسی حاد شدید (SARS-CoV) و کروناویروس سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) - ظهور کرده‌اند که منجر به عوارض و مرگ و میر گسترده شده است. شیوع SARS-CoV، که در اوایل دهه ۲۰۰۰ رخ داد، بیش از ۸۰۰۰ نفر را در سراسر جهان آلوده کرد و منجر به مرگ نزدیک به ۸۰۰ نفر شد که نشان دهنده نرخ مرگ و میر تقریباً ۱۰ درصد است. به‌طور مشابه، MERS-CoV، شناسایی شده در سال ۲۰۱۲، باعث ۸۵۷ عفونت تایید شده و ۳۳۴ مرگ و میر، با نرخ مرگ و میر فوق العاده بالا در حدود ۳۵ درصد شد. این همه‌گیری‌ها بر تهدید مداوم ناشی از کروناویروس‌ها برای سلامت انسان تاکید می‌کند (۱ و ۲).

جدیدترین و ویرانگرترین رویداد مرتبط با ویروس کرونا، همه‌گیری COVID-19 است که توسط سندرم حاد تنفسی کرونا ویروس ۲ (SARS-CoV-2) ایجاد می‌شود. از زمان ظهور آن در اواخر سال ۲۰۱۹، این بیماری همه‌گیر تأثیرات جهانی، نه تنها بر سلامت عمومی بلکه بر سیستم‌های اقتصادی، اجتماعی و سیاسی داشته است. تا ۱۲ دسامبر ۲۰۲۱، بیش از ۲۶۹ میلیون مورد تایید شده و ۵/۳ میلیون مرگ در سراسر جهان گزارش شد (۱).

برای مبارزه با SARS-CoV-2، واکسن‌های متعددی (مانند: AstraZeneca، Sinopharm، Moderna، Pfizer) و داروهای ضد ویروسی (مانند Molnupiravir، Remdesivir، Ribavirin، Favipiravir، Nirmatrelvir، Paxlovid) ساخته شده‌اند. پاکسلوید، ترکیبی از نیرماترلویر و ریتوناویر، اثربخشی قابل توجهی را نشان داده است. در ۲۲ دسامبر ۲۰۲۱، سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) مجوز استفاده اضطراری پاکسلوید، برای درمان کووید-۱۹ خفیف تا متوسط در افراد پرخطر ۱۲ سال و بالاتر با وزن ≤ 40 کیلوگرم، ظرف پنج روز پس از شروع علائم را صادر کرد. موسسه ملی بهداشت (NIH)، پاکسلوید را برای بیماران باردار واجد شرایط، بر اساس ارزیابی ریسک و فایده، با در نظر گرفتن عواملی مانند شاخص توده بدنی، وضعیت واکسیناسیون و خطر شدت COVID-19 توصیه می‌کند (۲). در حالی که NIH مصرف پاکسلوید را در دوران بارداری منع نکرده است، توصیه می‌کند مزایای شیردهی، ضرورت مصرف دارو و قرار گرفتن احتمالی نوزاد در معرض COVID-19 را ارزیابی کنید (۳).

تلاش‌های گسترده‌ای برای ایجاد درمان‌های موثر و اقدامات پیشگیرانه از جمله داروهای ضد ویروسی و واکسن‌ها انجام شده است. در این میان، پاکسلوید که توسط شرکت داروسازی فایزر توسعه یافته است، نشان‌دهنده پیشرفت قابل توجهی در درمان COVID-19 است. این داروی ضد ویروسی خوراکی شامل نیرماترلویر که یک مهارکننده قوی پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 و ریتوناویر، یک تقویت کننده فارماکوکینتیک که CYP3A4 را مهار می‌کند تا نیرماترلویر در جریان خون مدت طولانی‌تری فعالیت کند، است (۴، ۵).

در حالی که تاثیر پاکسلوید در درمان COVID-19 نشان داده شده است، مشخصات ایمنی آن، به‌ویژه در جمعیت‌های آسیب‌پذیر مانند زنان باردار، همچنان یک منطقه حیاتی برای بررسی است (۶، ۷) در طی رشد جنینی، سیستم اسکلتی تحت یک فرآیند مورفوزنز تنظیم شده قرار می‌گیرد که با تراکم مزانشیمی شروع می‌شود و از طریق غضروف‌زایی و استخوان‌سازی پیشرفت می‌کند (۸). این فرآیند پیچیده که تا بلوغ اسکلتی ادامه دارد، مستعد اختلالات ناشی از عوامل خارجی از جمله عوامل

دارویی است (۹، ۱۰). با توجه به احتمال مواجهه جنین با پاکسلووید در دوران بارداری و این که پاکسلووید از دو داروی مهارکننده پروتئاز تشکیل شده است، درک تأثیر آن بر رشد اسکلتی برای اطمینان از ایمنی آن ضروری است (۷).

جامعه زنان باردار در طول شیوع بیماری‌های عفونی، جمعیت آسیب‌پذیری را نشان می‌دهند و اثرات تراژوژنیک بالقوه درمان‌های جدید باید به دقت ارزیابی شوند. مطالعات قبلی روی نیرماترلویر، اثرات آن را بر مورفوژنز اسکلتی بررسی کرده‌اند (در مطالعه کاتلین و همکاران (۵) داروی نیرماترلویر بر بقا و وزن جنین رت‌ها عوارضی گزارش نشد اما در جنین خرگوش کاهش وزن جنین در دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه گزارش شد ($p \leq 0.01$), اما داده‌های جامع در مورد تأثیر Paxlovid بر رشد جنین محدود است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات پاکسلووید بر تولیدمثل و مورفوژنز سیستم اسکلتی جنین‌های رت است و بینش‌های مهمی در مورد مشخصات ایمنی آن در دوران بارداری ارائه می‌کند. با مطالعه خطرات بالقوه مرتبط با Paxlovid، این تحقیق به تلاش گسترده‌تر برای اطمینان از استفاده ایمن از درمان‌های ضد ویروسی در جمعیت‌های آسیب‌پذیر کمک می‌کند.

۲- مواد و روش‌ها

کلیه مراحل آزمایشی با رعایت مقررات آزمایشگاهی و استانداردهای اخلاقی تعیین شده در آزمایشگاه‌های آناتومی و بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه اردکان، یزد، ایران انجام شد. این مطالعه تحت نظارت و تأیید کمیته معتبر مراقبت از حیوانات و استفاده از حیوانات (IACUC) انجام شد و از پیروی از دستورالعمل‌های اخلاقی برای رفتار انسانی و استفاده از حیوانات در تحقیقات اطمینان حاصل شد. کد اخلاق: IR.ARDAKAN.REC.1403.035

تهیه دارو: این دارو از شرکت فایزر در چین تهیه شده است. قرص‌های پاکسلووید، شامل نیرماترلویر و ریتوناویر (Ritonavir) به‌طور کامل به پودر تبدیل شدند. مقدار لازم پودر دارو برای هر گروه به‌طور کامل در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. پس از آن، ۱ میلی لیتر از محلول آماده شده از طریق گاواژ خوراکی به‌هر موش داده شد. در طول مطالعه، غلظت پاکسلووید در فرمول‌های دوز به‌دقت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت تا از دقت و ثبات در گاواژ دارو اطمینان حاصل شود.

حیوانات: در این مطالعه تعداد ۴۰ سر رت ماده باردار، نژاد ویستار، در محدوده سنی ۱۱ تا ۱۳ هفته و وزنی معادل ۲۰۰-۲۲۰ گرم از موسسه علوم تولید مثل یزد تهیه شد. بارداری با مشاهده پلاک واژن تأیید شد. حیوانات در یک رژیم غذایی استاندارد شده جوندگان (Envigo Teklad Global Diet) نگهداری شدند که به‌صورت آزاد توسط همان موسسه ارائه شد. آب آشامیدنی شهری تصفیه شده، آزادانه برای همه حیوانات در دسترس بود. شرایط محیطی کنترل شده در آزمایشگاه با رطوبت نسبی ۴۰ تا ۵۰ درصد، دمای محیط بین ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد، و یک چرخه نور / تاریکی ۱۲ ساعت برای اطمینان از شرایط آزمایشی ثابت برای همه گروه‌ها اجرا شد.

گروه‌بندی و درمان: حیوانات به‌طور تصادفی در ۴ گروه آزمایشی (۱۰ موش در هر گروه) قرار گرفتند و به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند:

روز ۰-۷ بارداری:

۱. گروه اول: گروه کنترل هیچ دارویی دریافت نکردند. (آن‌ها روزانه غذا و آب دریافت می‌کردند)

۲. گروه دوم: گروه تجربی ۱، دارو را با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند.
۳. گروه سوم: گروه تجربی ۲، دارو را با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند.
۴. گروه چهارم: گروه تجربی ۳، دارو را با ماکزیمم دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند.

روز ۱۷-۸ بارداری:

۱. گروه اول: گروه کنترل هیچ دارویی دریافت نکردند. (آن‌ها روزانه غذا و آب دریافت می‌کردند)
۲. گروه دوم: گروه تجربی ۱، دارو را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند.
۳. گروه سوم: گروه تجربی ۲، دارو را با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند.
۴. گروه چهارم: گروه تجربی ۳، دارو را با ماکزیمم دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند.

این طرح آزمایشی امکان ارزیابی اثرات دارو را در دوزهای مختلف و دوره‌های بحرانی حاملگی فراهم کرد.

آماده‌سازی نمونه: نمونه خون از رت‌های باردار در روز ۱۷ حاملگی (GD 17) برای تعیین کمیت غلظت سیستمیک پاکسلوید در سرم خون جمع‌آوری شد. پروتکل نمونه‌گیری به شرح زیر انجام شد: از هر گروه ۵ رت به صورت تصادفی انتخاب شد. در روز ۱۷ بارداری و پیش از تجویز دارو (Predose) یک نمونه خون از همه گروه‌ها گرفته شد. نمونه‌های بعدی در ۳۰ دقیقه، ۱ ساعت، ۲ ساعت و ۴ ساعت پس از تجویز دارو از همه گروه‌ها جمع‌آوری شد. برای اطمینان از ثبات و به حداقل رساندن استرس حیوانات، از روش برش نوک دم برای تمام خون‌گیری‌ها استفاده شد. این رویکرد سیستماتیک امکان اندازه‌گیری دقیق غلظت پاکسلوید را در چند نقطه زمانی فراهم می‌کند و بینش‌هایی را در مورد مشخصات فارماکوکینتیک آن در طول دوره حیاتی حاملگی ارائه می‌دهد. غلظت پاکسلوید در سرم خون رت‌های باردار با استفاده از کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل با استفاده از یک دستگاه HPLC مدل AZURA، ساخت KNAUER، آلمان انجام شد. علائم بالینی، وزن بدن و مصرف غذا به‌طور سیستماتیک در طول مدت مطالعه کنترل شد. طراحی تجربی، تجزیه و تحلیل سموم کینتیک، و روش‌های آماری به کار گرفته شده برای باروری و مطالعات رشد جنین رت (EFD) به‌طور جامع در مطالعات قبلی شرح داده شده است (۱۱، ۱۲).

در روز ۲۱ بارداری (GD 21)، رت‌های مادر با استفاده از کلروفورم بی‌هوش و یوتانایز شدند و سپس جنین‌ها با دقت استخراج شدند. پس از اتانازی، یک معاینه ماکروسکوپی از رت‌های مادر انجام شد که بر روی ناحیه لگن، قفسه سینه، احشاء شکم و محتویات تخمدان‌ها و رحم تمرکز داشت تا تعداد جنین‌های زنده و مرده تعیین شود. پس از آن، جنین‌های استخراج شده پاکسازی و وزن، طول سر-دم (CRL) و دور شکم (AC) آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای تسهیل مشاهده سیستم اسکلتی، پوست و بافت چربی به دقت جدا و اندام‌های داخلی جنین نیز خارج شدند. سپس نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد به مدت پنج روز ثابت شدند تا از نگهداری مناسب برای تجزیه و تحلیل بیشتر اطمینان حاصل شود. پس از تثبیت، نمونه‌ها به‌طور کامل شستشو،

پاکسازی و سپس با استفاده از پروتکل‌های هماتوکسیلین-ئوزین و Alizarin Red S رنگ‌آمیزی شدند. سپس این نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به‌دقت مورد بررسی قرار گرفتند تا هرگونه ناهنجاری بافت‌شناسی بالقوه در ساختار اسکلتی شناسایی شود (۱۳).

۳- آنالیز آماری

در این مطالعه، داده‌های مربوط به وزن جنین، طول سر-دم (CRL) و دور شکم (AC) با استفاده از Microsoft Excel مورد تحلیل آماری قرار گرفت. از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه تفاوت‌های وزن، CRL و AC بین گروه‌های آزمایش و گروه کنترل استفاده شد. در مواردی که تفاوت‌های معنی‌داری تشخیص داده شد، آزمون تفاوت معنی‌دار توکی (HSD) برای تجزیه و تحلیل تعقیبی استفاده شد. مقایسه‌های آماری بین گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT 2016، با آستانه معنی‌داری برای همه آنالیزهای جنینی ($p < 0.05$) انجام شد.

۴- نتایج

معاینه بالینی رت‌ها

در طول مدت مطالعه، همه رت‌ها از نظر علائم فیزیکی به‌دقت تحت نظر بودند و هیچ موردی از مرگ و میر مشاهده نشد. رت‌ها بر اساس وجود پلاک واژن که به‌عنوان شاخصی برای تایید بارداری مورد استفاده قرار گرفت، برای ورود به مطالعه انتخاب شدند.

بررسی وزن بدن رت‌های مادر

وزن بدن مادرها در سه نقطه زمانی مشخص، روز ۷، ۱۴ و ۲۱ بارداری ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها افزایش وزن رت‌ها را در روز ۲۱ بارداری نسبت به روز ۷ بارداری نشان داد. با این حال، افزایش وزن مشاهده شده در گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر از سه گروه آزمایش بود. در بین گروه‌های آزمایش، کم‌ترین افزایش وزن در گروه تجربی ۱ مشاهده شد که دوزهای ۶۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز دریافت کردند ($p = 0.02$). این یافته حاکی از تاثیر وابسته به دوز بر افزایش وزن مادر در طول دوره مطالعه است (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: میانگین کل مواجهه سیستمیک مادر

mg/kg/day	Mean Systemic Exposure ($\mu\text{g/mL}$)
100	289.6 \pm 121.9
300	296.7 \pm 112.4
1000	209.1 \pm 21.5

داده‌ها به‌صورت میانگین در هر گروه \pm انحراف معیار ارائه شده‌اند

جدول ۲: وزن بدن مادر

Gestation Day	GD 7	GD 14	GD 21
0	215.6 ± 26.9	204.2 ± 33.3	252 ± 19.84
60,100 mg/kg/day (g)*	216.6 ± 14.9	211.6 ± 14.5	224.1 ± 14.1
200,300 mg/kg/day (g)	223.6 ± 14.6	220.6 ± 15.6	232.1 ± 15.5
1000 mg/kg/day (g)	219.2 ± 6.7	214.7 ± 3.2	246.2 ± 12.8

*P < 0.05

روز بارداری = GD گرم؛ (g)

داده‌ها به صورت میانگین در هر گروه ± انحراف معیار ارائه شده‌اند

ارزیابی وزن جنین

در روز ۲۱ بارداری (GD 21)، جنین‌ها بلافاصله پس از استخراج از شاخ‌های رحمی وزن شدند. جنین‌های همه گروه‌های آزمایشی که دوزهای متفاوتی از دارو را دریافت کردند، وزن‌های کم‌تری نسبت به گروه کنترل نشان دادند. گروه تجربی ۱، با دوزهای ۶۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، کم‌ترین میانگین وزن جنین را با تفاوت آماری معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P = 1.06E-17$). به‌طور مشابه، گروه تجربی ۲، دریافت‌کننده دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، به‌طور قابل توجهی میانگین وزن کم‌تر را نسبت به گروه کنترل نشان داد، ($p = 9.02E-12$). گروه تجربی ۳، با تجویز حداکثر دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، به‌طور مشابهی میانگین وزنی کم‌تر جنین را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p = 1.85E-12$). این یافته‌ها نشان‌دهنده کاهش وابسته به دوز در وزن جنین در تمام گروه‌های تجربی است (جدول ۳).

ارزیابی CRL و AC جنین

ارزیابی طول سر-دم جنین (CRL) و دور شکم (AC)، کاهش قابل توجهی را در هر دو پارامتر در همه گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل نشان داد. میانگین CRL در گروه تجربی ۱ به‌طور قابل توجهی کم‌تر از گروه کنترل بود ($P = 1.3E-10$). به‌طور مشابه، گروه‌های تجربی ۲ و ۳ به ترتیب میانگین CRL کمی را نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P = 4.78E-6$ و $P = 6.69E-10$). ارزیابی AC جنین‌ها یافته‌های قابل مقایسه‌ای را نشان داد، به‌طوری که همه گروه‌های تجربی میانگین پایین‌تر از گروه کنترل نشان دادند. گروه تجربی ۱ ($P = 6.65E-12$)، همچنین گروه تجربی ۲ ($P = 3.55E-10$) و گروه تجربی ۳ ($P = 2.28E-5$) کاهش قابل توجه AC را نشان دادند. این یافته‌ها نشان‌دهنده کاهش مداوم و وابسته به دوز در CRL و AC در بین جنین‌هایی است که در معرض دارو قرار گرفته‌اند (جدول ۳).

جدول ۳: داده‌های مربوط به مادر و وزن جنین، CRL و AC از مطالعه رشد جنین-جنین موش صحرایی

Mg/kg/day dose	0	60/100	200/300	1000
Number of pregnant rats	5	9	8	4
Maternal food consumption (g/day)	205.5 ± 20.1	206.6 ± 15.6	201.4 ± 14.4	207.8 ± 17.6
Live fetuses	5.8 ± 4.1	8.7 ± 4.6	8.6 ± 4.6	11.5 ± 5.3
Dead fetus	0	7	0	0
Fetal weight (g)*	3.5 ± 0.6	1.7 ± 0.8	1.8 ± 0.8	2.5 ± 0.3
Fetal CRL (mm)**	35 ± 3.8	25.9 ± 6.5	26.36 ± 6.2	31.58 ± 2.2
Fetal AC (mm)***	12.2 ± 1.2	9.9 ± 1.4	9.8 ± 1.6	11 ± 1

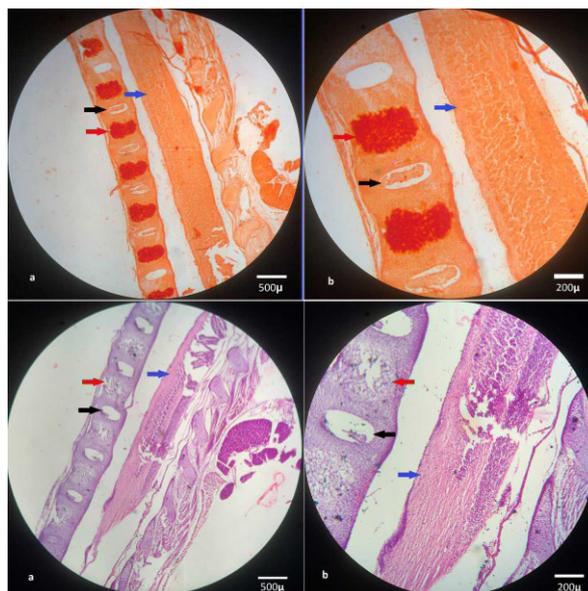
* , ** , ***p < 0.001

میلی‌متر (mm) = گرم؛ (g)

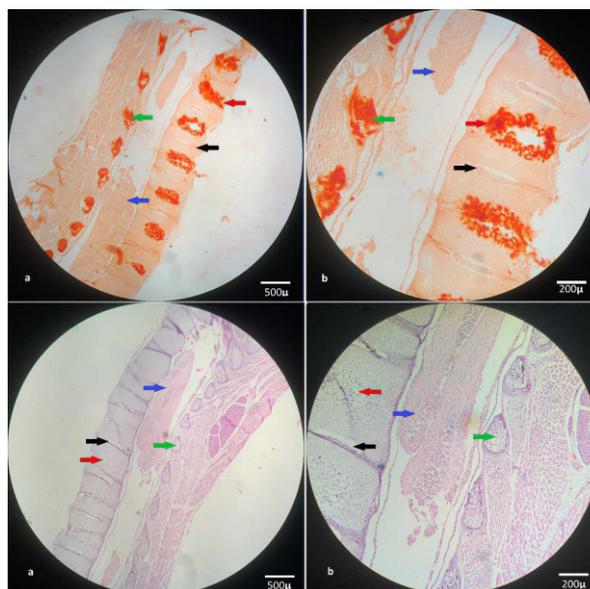
داده‌ها به صورت میانگین در هر گروه ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

مشاهدات جنینی رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و آلیزارین رد S

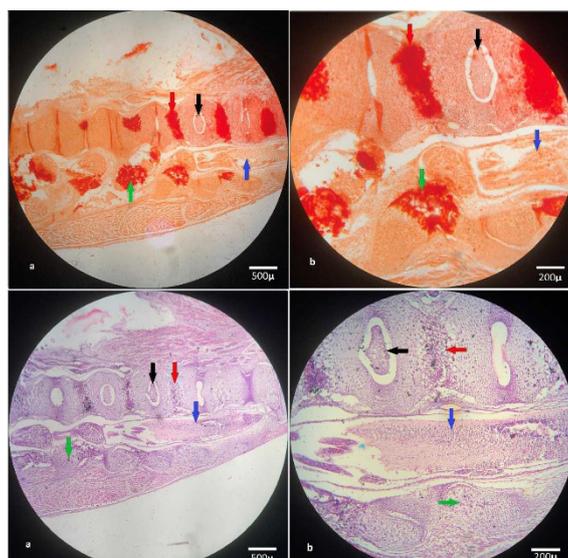
بررسی بافت‌شناسی بافت‌های اسکلتی جنین با استفاده از هماتوکسیلین-ائوزین (E&H) و آلیزارین رد S بررسی شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین هیچ ناهنجاری در سلول‌های استخوان یا غضروف در همه گروه‌ها نشان نداد. استخوان‌سازی داخل غضروفی، بدون تفاوت قابل تشخیص بین گروه کنترل و تجربی به‌وضوح مشاهده شد. علاوه بر این، تشکیل نخاع، دیسک‌های بین مهره‌ای و استخوان‌سازی مهره‌ها به‌طور طبیعی بود و هیچ ناهنجاری سلولی شناسایی نشد. رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin Red S، مخصوص بافت استخوانی، نواحی کلسیفیه را به رنگ قرمز برجسته کرد و وجود رسوبات کلسیم را تایید کرد. تجزیه و تحلیل اسلایدهای رنگ‌آمیزی نشان داد که استخوان‌بندی اسکلتی در سه گروه تجربی با گروه کنترل مطابقت دارد و هیچ‌گونه ناهنجاری ساختاری مشاهده نشد. تشکیل بدنه مهره و استخوان‌سازی دنده نیز به‌وضوح مشهود و قابل مقایسه در همه گروه‌ها بود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که قرار گرفتن در معرض دارو بر رشد اسکلتی یا فرآیندهای استخوان‌سازی در جنین تاثیر منفی نداشته است (شکل‌های ۱-۲-۳-۴).



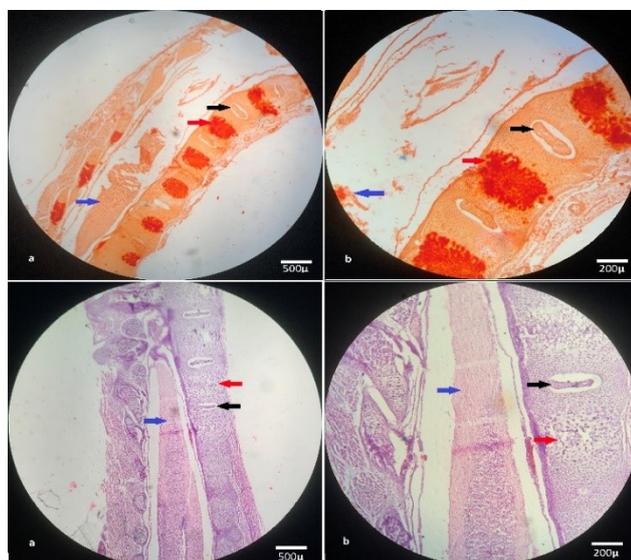
شکل ۱: بافت اسکلتی جنین گروه کنترل، اسلایدهای (a): برش‌هایی از یک ناحیه ستون فقرات را با بزرگنمایی کم نشان می‌دهند که با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) رنگ‌آمیزی شده‌اند. (b): برش‌هایی از همان ناحیه مهره‌ای را با بزرگنمایی بالاتر و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) نشان می‌دهند. فلش‌های قرمز نواحی تشکیل استخوان در جسم مهره‌ها یا نواحی تحت استخوان‌سازی درون غضروفی را نشان می‌دهند، فلش‌های سیاه ساختارهای غضروفی و دیسک‌های بین مهره‌ای را نشان می‌دهند و فلش‌های آبی نخاع را نشان می‌دهند. این تصاویر برای نشان دادن سازماندهی بافت‌شناسی کلی و روابط فضایی بین استخوان، غضروف و ساختارهای عصبی در نظر گرفته شده‌اند. برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و آلیزارین رد S رنگ‌آمیزی شدند. بزرگنمایی‌ها برای ارائه تجسم بهینه از معماری مهره‌ها در میدان دید انتخاب شده‌اند. رنگ آمیزی H&A و Alizarin red S. بزرگنمایی (a) 100X و (b) 400X.



شکل ۲: بافت اسکلتی جنین گروه تجربی ۱، (a): برش‌هایی از یک ناحیه ستون فقرات را با بزرگنمایی کم و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) نشان دهید. (b): برش‌هایی از همان ناحیه مهره‌ای را با بزرگنمایی بالاتر و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) نشان دهید. فلش‌های قرمز نواحی تشکیل استخوان در جسم مهره یا نواحی تحت استخوان‌سازی درون غضروفی را نشان می‌دهند، که در آن غضروف (کندروسیت‌ها) توسط بافت استخوانی (استئوسیت‌ها) جایگزین می‌شود. فلش‌های سیاه ساختارهای غضروفی و دیسک‌های بین مهره‌ای را نشان می‌دهند، فلش‌های آبی نخاع را نشان می‌دهند و فلش‌های سبز استخوان‌سازی اولیه دنده‌ها را نشان می‌دهند. این تصاویر برای نشان دادن سازماندهی بافت‌شناسی کلی و روابط فضایی بین استخوان، غضروف و ساختارهای عصبی در نظر گرفته شده‌اند. برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و آلیزارین رد S رنگ‌آمیزی شدند. بزرگنمایی‌ها برای ارائه تجسم بهینه از معماری مهره‌ها در میدان دید انتخاب شده‌اند. رنگ آمیزی H&A و Alizarin red S. بزرگنمایی (a) 100X و (b) 400X.



شکل ۳: بافت اسکلتی جنین گروه تجربی ۲، (a): برش‌هایی از یک ناحیه ستون فقرات را با بزرگنمایی کم و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) نشان دهید. (b): برش‌هایی از همان ناحیه مهره‌ای را با بزرگنمایی بالاتر و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) نشان دهید. فلش‌های قرمز نواحی تشکیل استخوان در جسم مهره یا نواحی تحت استخوان‌سازی درون غضروفی را نشان می‌دهند، که در آن غضروف (کندروسیت‌ها) توسط بافت استخوانی (استئوسیت‌ها) جایگزین می‌شود. فلش‌های سیاه ساختارهای غضروفی و دیسک‌های بین مهره‌ای را نشان می‌دهند، فلش‌های آبی نخاع را نشان می‌دهند و فلش‌های سبز استخوان‌سازی اولیه دنده‌ها را نشان می‌دهند. این تصاویر برای نشان دادن سازماندهی بافت‌شناسی کلی و روابط فضایی بین استخوان، غضروف و ساختارهای عصبی در نظر گرفته شده‌اند. برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و آلیزارین رد S رنگ‌آمیزی شدند. بزرگنمایی‌ها برای ارائه تجسم بهینه از معماری مهره‌ها در میدان دید انتخاب شده‌اند. رنگ آمیزی H&A و Alizarin red S بزرگنمایی (a) 100X و (b) 400X.



شکل ۴: بافت اسکلتی جنین گروه تجربی ۳، (a): برش‌هایی از یک ناحیه ستون فقرات را با بزرگنمایی کم نشان می‌دهند که با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) رنگ‌آمیزی شده‌اند. اسلایدهای (b): برش‌هایی از همان ناحیه مهره‌ای را با بزرگنمایی بالاتر و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد اس (بالا) و هماتوکسیلین و ائوزین (پایین) نشان می‌دهند. فلش‌های قرمز نواحی تشکیل استخوان در جسم مهره‌ها یا نواحی تحت استخوان‌سازی درون غضروفی را نشان می‌دهند، فلش‌های سیاه ساختارهای غضروفی و دیسک‌های بین مهره‌ای را نشان می‌دهند و فلش‌های آبی نخاع را نشان می‌دهند. این تصاویر برای نشان دادن سازماندهی بافت‌شناسی کلی و روابط فضایی بین استخوان، غضروف و ساختارهای عصبی در نظر گرفته شده‌اند. برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و آلیزارین رد S رنگ‌آمیزی شدند. بزرگنمایی‌ها برای ارائه تجسم بهینه از معماری مهره‌ها در میدان دید انتخاب شده‌اند. رنگ‌آمیزی H&A و Alizarin red S بزرگنمایی (a) 100X و (b) 400X.

۵- بحث

این مطالعه اثرات Paxlovid (Nirmatrelvir و Ritonavir) را بر رت‌های باردار و جنین‌های آن‌ها ارزیابی کرد و هیچ شواهدی از ناهنجاری یا کاهش بقای جنین را نشان نداد. مشاهدات اولیه کاهش وزن جنین، طول سر-دم (CRL) و دور شکم (AC) و همچنین کاهش وزن مادر در دوران بارداری را نشان داد. کاهش وزن جنین، مطابق با تاخیر در رشد، به‌دنبال قرار گرفتن در معرض دارو در طول اندام‌زایی رخ داد. قابل ذکر است، دوره درمان ۵ روزه Paxlovid در انسان کم‌تر از ۲ درصد از دوره بارداری انسان (۲۸۰ روز) است. علاوه بر این، کاهش وزن جنین در رت‌ها در دوزهای ۱۰ برابر بیشتر از دوز درمانی پیش‌بینی شده برای انسان مشاهده شد، که نشان می‌دهد اثرات مشاهده شده ممکن است خطر قابل توجهی برای رشد جنین انسان نداشته باشد. علاوه بر این، هیچ اثر نامطلوبی بر باروری مادر یا رشد جنین قبل از لانه‌گزینی مشاهده نشد. به‌طور خلاصه، این یافته‌ها نشان می‌دهد که Nirmatrelvir (NMV) پروفایل ایمنی باروری مطلوبی را نشان می‌دهد که با عدم وجود اثرات بالینی قابل توجه بر باروری رت‌های ماده، بافت‌شناسی بافت اسکلتی جنین و نتایج منفی در آزمایش سم‌شناسی ژنتیکی همراه است (۵، ۱۴).

انجمن پزشکی مادر و جنین ایالات متحده از مصرف Paxlovid در بیماران باردار تحت شرایط خاص، با وجود تداخلات دارویی گسترده آن، حمایت می‌کند. برعکس، دستورالعمل‌های کانادایی در مورد استفاده از آن در دوران بارداری احتیاط می‌کنند، مگر اینکه توسط یک متخصص مراقبت‌های بهداشتی توصیه شود و در طول درمان، پیشگیری از بارداری را برای زنان غیر باردار توصیه می‌کند. انجمن‌های پزشکی اروپا، بریتانیا، آلمان، استرالیا و نیوزلند به طور کلی از مصرف Paxlovid در دوران بارداری و شیردهی خودداری می‌کنند (۴).

عدم سمیت ژنتیکی Nirmatrelvir یک عامل مهم در ارزیابی خطر بارداری آن است. مشابه Remdesivir، یک مهارکننده RNA پلیمرز تایید شده برای بیماران COVID-19 بستری در بیمارستان، Nirmatrelvir در بالاترین دوز آزمایش شده (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) هیچ اثر نامطلوبی بر رشد جنین در رت‌ها نشان نداد. فقط یک مطالعه حیوانی، ایمنی تولیدمثل و رشد Nirmatrelvir را ارزیابی کرده است که هیچ سمیت رشدی شدید در رت‌ها یا خرگوش‌ها و هیچ اثر نامطلوب بر باروری یا رشد اولیه جنین گزارش نشده است. کاهش وزن جنین مشاهده شده در خرگوش با یافته‌های این مطالعه مطابقت دارد (۵، ۱۵).

Nirmatrelvir پروتئاز اصلی SARS-CoV-2 را مهار می‌کند (۱۴) و از تکثیر ویروس جلوگیری می‌کند، در حالی که ریتوناویر، یک مهارکننده CYP3A، غلظت پلاسمایی آن را افزایش می‌دهد. استفاده گسترده ریتوناویر در درمان اچ‌آی‌وی داده‌های قابل توجهی را در مورد ایمنی آن در دوران بارداری ارائه می‌دهد، با مطالعاتی که نشان دهنده افزایش خطر ابتلا به نوزادان کوچک در سن حاملگی است، اما خطر زایمان زودرس یا سایر پیامدهای نامطلوب را افزایش نمی‌دهد (۴، ۱۶).

در مقابل، سایر داروهای ضد ویروسی مانند ریباویرین (RBV) و فاویپیراویر (FAV) خطرات تراتوژنیک قابل توجهی دارند و مصرف آنها را در دوران بارداری منع شده است. هر دوی این ترکیبات تراتوژنیسیته را در چندین گونه نشان داده‌اند، RBV باعث مرگ و میر جنین و ناهنجاری در موش‌ها، خرگوش‌ها و خوکچه‌های هندی می‌شود (۱۷، ۱۸) و FAV نیز اثرات مشابهی را در

میمون‌ها، موش‌ها و خرگوش‌ها نشان داده است (۵). مکانیسم‌های جهش‌زایی آن‌ها، که زیربنای فعالیت ضد ویروسی آن‌ها است، ممکن است DNA میزبان را نیز مختل کند (۱۹، ۲۰).

زنان باردار در معرض خطر بیشتری برای پیامدهای شدید COVID-19، از جمله زایمان زودرس، عوارض و از دست دادن بارداری هستند، که بر نیاز آن‌ها به درمان‌های ضدویروسی ایمن تاکید می‌کند (۲۱، ۲۲). پاکسوئید یک گزینه امیدوارکننده برای کاهش خطرات حاد COVID-19 در بیماران پرخطر و واکسینه نشده است. با این حال، مطالعات بیشتر برای ارزیابی جامع ایمنی آن در زنان باردار و شیرده ضروری است (۴).

۶- نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه هیچ‌گونه ناهنجاری بافتی را در سیستم اسکلتی جنین‌های در معرض پاکسلوئید نشان نداد. اثرات مشاهده شده محدود به کاهش وزن جنین، طول تاج-دم (CRL) و دور شکم (AC) بود. در مجموع، داده‌های این تحقیق، همراه با شواهد موجود، خطر کم آسیب جنینی مرتبط با Paxlovid را نشان می‌دهد که شامل Nirmatrelvir (NMV) یک مهارکننده قوی و انتخابی پروتئاز اصلی SARS-CoV-2، و Ritonavir، یک تقویت‌کننده فارماکوکینتیک است. با این وجود، استفاده از پاکسوئید در دوران بارداری باید به دقت مورد ارزیابی قرار گیرد و با یک متخصص مراقبت‌های بهداشتی، در مورد خطرات و فواید احتمالی بحث و مشورت شود.

۷- تشکر و قدردانی

این مطالعه به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با حمایت دانشگاه اردکان انجام شد. نویسندگان مایلند صمیمانه از خانم مهین دهستانی اردکانی به دلیل مشارکت ارزشمند و همکاری متعهدانه ایشان در طول فرآیند تحقیق تشکر و قدردانی کنند.

۸- منابع

1. Marzi M, Vakil MK, Bahmanyar M, Zarenezhad E. Paxlovid: mechanism of action, synthesis, and in silico study. *BioMed Research International*. 2022;2022(1):7341493.
2. Food U, Administration D. Fact sheet for healthcare providers: emergency use authorization for Paxlovid. *FACTSHEETFORHEALTHCAREPROVIDERS: EMERGENCYUSEAUTHORIZATIONFORPAXLOVID (fda gov)*> Accessed May. 2022;5.
3. Health NIO. Drug-drug interactions between ritonavir-boosted nirmatrelvir (Paxlovid) and concomitant medications. Maryland: NIH. 20.۲۳
4. Chourasia P, Maringanti BS, Edwards-Fligner M, Gangu K, Bobba A, Sheikh AB, et al. Paxlovid (nirmatrelvir and ritonavir) use in pregnant and lactating woman: current evidence and practice guidelines—a scoping review. *Vaccines*. 2023;11(1):107.
5. Catlin N, Bowman C, Champion S, Cheung J, Nowland W, Sathish J, et al. Reproductive and developmental safety of nirmatrelvir (PF-07321332), an oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor in animal models. *Reproductive Toxicology*. 2022;108:56-61.

6. Ciotti M, Ciccozzi M, Terrinoni A, Jiang W-C, Wang C-B, Bernardini S. The COVID-19 pandemic. Critical reviews in clinical laboratory sciences. 2020;57(6):365-88.
7. Fishbane S, Hirsch JS, Nair V. Special considerations for paxlovid treatment among transplant recipients with SARS-CoV-2 infection. American Journal of Kidney Diseases. 2022;79(4):480.
8. Kovacs CS, Ward LM. Physiology of calcium, phosphorus, and bone metabolism during fetal and neonatal development. Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology: Elsevier; 2020. p. 57.۸۶-۳
9. Mundlos S. Skeletal morphogenesis. Developmental Biology Protocols: Volume II. 2000:61-70.
10. Sher RB, Cox GA, Ackert-Bicknell C. Development and disease of mouse muscular and skeletal systems. 2012.
11. Champion SN, Han B, Cappon GD, Lewis EM, Kraynov E, Liang H, et al. Decreased maternal and fetal cholesterol following maternal bococizumab (anti-PCSK9 monoclonal antibody) administration does not affect rat embryo-fetal development. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2015;73(2):562-70.
12. Catlin N, Bowman C, Engel S, Sacaan A, Thibault S, Lewis E, et al. Reproductive and developmental toxicity assessment of palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, in Sprague-Dawley rats and New Zealand White rabbits. Reproductive Toxicology. 2019;88:76-84.
13. Mohamed R. Alizarin Red-S Protocol for Skeletal Staining during Fetal Period in Rabbit. Acad Anato Intern. 2018:41-4.
14. Owen DR, Allerton CM, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. Science. 2021;374(6575):1586-93.
15. Bakheit AH, Darwish H, Darwish IA, Al-Ghusn AI. Remdesivir. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. 2023;48:71-108.
16. Cowdell I, Beck K, Portwood C, Sexton H, Kumarendran M, Brandon Z, et al. Adverse perinatal outcomes associated with protease inhibitor-based antiretroviral therapy in pregnant women living with HIV: A systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine. 2022;46.
17. Ferm VH, Willhite C, Kilham L. Teratogenic effects of ribavirin on hamster and rat embryos. Teratology. 1978;17(1):93-101.
18. Willhite CC, Ferm VH. Potentiation of ribavirin-induced teratogenesis by natural purines. Experimental and Molecular Pathology. 1978;28(2):196-201.
19. Waters MD, Warren S, Hughes C, Lewis P, Zhang F. Human genetic risk of treatment with antiviral nucleoside analog drugs that induce lethal mutagenesis: the special case of molnupiravir. Environmental and molecular mutagenesis. 2022;63(1):37-63.
20. Zhou S, Hill CS, Sarkar S, Tse LV, Woodburn BM, Schinazi RF, et al. β -D-N 4-hydroxycytidine inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells. The Journal of infectious diseases. 2021;224(3):415-9.
21. Zambrano LD. Update: characteristics of symptomatic women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status—United States, January 22–October 3, 2020. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2020;69.
22. Banerjee J, Mullins E, Townson J, Playle R, Shaw C, Kirby N, et al. Pregnancy and neonatal outcomes in COVID-19: study protocol for a global registry of women with suspected or confirmed SARS-CoV-2 infection in

pregnancy and their neonates, understanding natural history to guide treatment and prevention. *BMJ open*. 2021;11(1):e041247.