

الأثر السمي الخلوي لجرعات متزايدة من الـ Methotrexate في السلالة المنوية عند الفأر

بشير الزالق

قسم البيولوجيا الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

تاريخ الإيداع 2006/10/31

قبل للنشر في 2007/06/04

الملخص

أدى حقن جرعات متزايدة من الميتوتركسات (25، 50، 100، 150، 200، 250، 300 ملغ/كغ) عضلياً في ذكور الفئران من السلالة Swiss strain إلى تناقص مضطرب في عدد خلايا السلالة المنوية في المرحلة VII من موجة تشكل النطاف، وذلك عند الجرعات المنخفضة من هذه المادة، وإلى تأثير مميت عند الجرعات العالية.

كانت الجرعات 25 و 50 ملغ/كغ محتملة من قبل الفئران، ولكن السمية الدوائية للعقار المستخدم كانت مرتفعة عند الجرعات 100 و 150 ملغ/كغ.

وقد لوحظ أثر السمية الخلوية الحاد عند الجرعة 200 ملغ/كغ ونجم عنه تخريب واضح في المكونات الخلوية لجدران الأتابيب المنوية.

بينما كان تأثير الجرعات العالية (250 و 300 ملغ/كغ) مميتاً إذ أدى الحقن بهذه الجرعات إلى نفوق جميع الحيوانات بعد أسبوع من الحقن.

يبدو من النتائج أن لعقار الميتوتركسات تأثيراً سميّاً واضحاً في السلالة المنوية، وذلك بدءاً من الجرعة 100 ملغ/كغ، إذ بدأ إنتاج النطاف ينخفض، وكان كبيراً عند الجرعة 200 ملغ/كغ، في حين أن الجرعات العالية قد سببت تخريباً مميتاً في خلايا السلالة المنوية ونفوق الفئران بعد أسبوع من الحقن.

الكلمات المفتاحية: الميتوتركسات، السمية الخلوية، تكون النطاف.

Cytotoxic Effect of Increasing Doses of Methotrexate on Mouse Sperm Cell Line

Bashir Al-Zalek

Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 31/10/2006

Accepted 04/06/2007

ABSTRACT

Intramuscular injection of increasing doses of Methotrexate Folate-antagoniste (25, 50, 100, 150, 250, 300 mg/ kg) on Swiss strain males mice , resulted in decreasing Spermatogenesis at stage VII whereas higher doses had lethal effects.

In fact doses of 25 and 50 mg per kg were tolerable by mice and the cytotoxic tolerance level decreased at higher doses (100 and 150 mg/kg).

Acute cytotoxic effect was noted at doses of 200 mg/kg and resulted in destruction of cell line.

Doses of 250 and 300 mg/kg had lethal effect and the mice died 1 week after injection.

In conclusion Methotrexate had cytotoxic effects on sperm cell lines. 100mg/kg doses decreased spermatogenesis while 200 mg/kg doses caused greater side effects and higher doses were lethal to the mice 1 week after injection.

Key Words: Methotrexate, Cytotoxicity, Spermatogenesis.

المقدمة

يُعدُّ الميتوتركسات (MTX) Methotrexate من أشهر العقاقير المستخدمة في معالجة أمراض المفاصل، كالتهاب المفاصل الرثياني Rheumatoid arthritis (1 و 2). وأيضاً من الأدوية المستخدمة في المعالجة الكيميائية للأورام السرطانية (3).

يعمل هذا العقار عملاً مثبطاً تنافسياً لحمض الفوليك Folic acid فهو من ضواده Antagonists نظراً لتمامل بنيتهما الجزيئية (4). ونتيجة لذلك يصاب الفرد الذي يعالج بهذا العقار بجرعات عالية بعوز الفولات Folate deficiency الذي يظهر الأعراض المرضية المميزة بعوز مجموعة الفيتامين B، ونظراً لكون حمض الفوليك يتمثل بالفيتامين B9.

يؤدي عوز الفولات إلى تضمين الأساس الأزوتي اليوراسيل (U) Uracil مكان الأساس الأزوتي التيمين (T) Thymine في الحمض النووي الـ DNA للخلايا التي تقوم بتركيب الـ DNA (أو الخلايا المتكاثرة)، الأمر الذي يؤدي إلى إحداث تكسر في الصبغيات، ويكون ذلك عن طريق تفاعل المثيلة Methylation والتي تؤدي إلى إدخال النيكلوزيد المسمى ديزوكسي يوراسيل أحادي الفوسفات dUMP مكان النيكلوزيد dTMP وبوساطة أنزيم DNA-polymerase، ويسهم مثل هذا التخريب في الـ DNA في إحداث سرطانات وتخريب للأنبوب العصبي لدى الكائن الحي (5).

وقد لوحظ أن عوز الفولات يؤدي إلى تراكم بين خلوي بالنيكلوزيد اليوراسيل dUMP؛ مما يؤدي إلى دخوله الخلايا وارتباطه مع DNA الخلية محدثاً بذلك تكسراً مضاعفاً في شريطي الـ DNA (6).

وقد أوضحت البحوث أن العوز بالفولات يمكن أن ينتج من التعدد الشكلي للأنزيم المسمى متيلين رباعي هيدروفولات رديكتاز Methylenetetrahydrofolat reductase (MTHFR)، والذي يمكن أن يحدث أذيات في صبغيات الخلايا الليمفاوية البشرية مترافقة بضعف مناعي (7). يقوم الأنزيم 5-MTHFR بالتخلص من زمرة المتيل Methyle متحولاً إلى شكل آخر هو THFR الذي يشترك في العديد من التفاعلات الأنزيمية التي تتطلب توسط حمض الفوليك (أو فيتامين B) فيها؛ الأمر الذي يؤدي إلى استنفاد هذا الفيتامين وإحداث عوز فيه (8).

كما وجد أن تناول عقار الميتوتركسات إلى جانب العقار المسمى Misoprotol من قبل المرأة الحامل يؤدي إلى الإجهاض وإنهاء الحمل بصورة مبكرة (9).

يهدف هذا البحث إلى إحداث عوز الفولات بصورة تجريبية عن طريق حقن فنران التجربة بجرعات متزايدة من الميتوتركسات MTX، ودراسة التبدلات في السلالة المنوية، وقد اختيرت هذه الأخيرة نظراً لتكاثر المنسليات المنوية Spermatogonia

المستمر طيلة حياة الذكر بغرض إنتاج النطاف وانقسامها انقسامات خيطية متساوية Meiosis، ثم منصفة Meiosis في سلالة الخلايا الناتجة عنها. كما يهدف البحث أيضاً إلى دراسة التبدلات الخلوية لهذه السلالة والسمية الخلوية Cyto-toxicity الناجمة عن الجرعات المرتفعة للميتوتركسات.

نظراً لوجود موجة تشكل للنطاف على طول الأنبوب المنوي، فقد قسم الباحثون هذه الموجة إلى ثمانية أطوار (10)، وقسمها بعضهم الآخر إلى اثني عشر طوراً (11)، وقسمها آخرون إلى أربعة عشر طوراً (12). ولا تلاحظ في مقطع نسيجي لخصية مقاطع الأنبوب المنوية في طور واحد، بل في جميع هذه الأطوار. ولذلك اخترنا في هذا البحث دراسة التبدلات الخلوية في مقطع عرضي للأنبوب المنوي في المرحلة السابعة VII لجميع العينات المدروسة ليكون التحليل واضحاً وفي نقطة مقارنة واحدة، وليس هدف التجربة دراسة مراحل تشكل النطاف في الأنبوب المنوي.

إن سبب اختيارنا للمرحلة VII كونها تتوسط المراحل الأربع عشرة وكونها تحوي على جميع أنماط تطور السلالة المنوية بوضوح. تتميز هذه المرحلة بكون النطيفات Spermatises تتوضع بالقرب من لمعة الأنبوب (مقارنة مع نطيفات الأنبوب المنوي في المرحلة VI السادسة؛ حيث تتوضع النطيفات بالقرب من المنطقة العميقة من الأنبوب في ستوبلازما خلايا سيرتولي). تكون النطيفات في هذه المرحلة ناضجة ومهيأة لتشكيل النطاف، ويلاحظ في محيط أنبوب المرحلة VII المنسلات المنوية Spermatises وإلى الأعلى منها باتجاه اللمعة نجد خلايا ذات نوى قاتمة حيث تظهر فيها الصبغيات ثخينة وكثيفة، تظهر هذه الخلايا الطور الأول من الانقسام النضجي الأول (المنصف) وفي مرحلة الخيوط الكثيفة Pachyten. فتلاحظ عدة صفوف خلوية من الخلايا المنوية من المرتبة الأولى I - spermatocytes والتي تتابع أدوار الانقسام المنصف لتشكيل خلايا منوية من المرتبة الثانية II - spermatocytes، ولكن هذه الأخيرة لا تظهر على المقطع نظراً لتحولها السريع إلى نطيفات، لهذا يصعب تمييزها على المقطع (12).

مواد البحث وطرائقه

1 - حيوانات التجربة:

استخدمت في هذا البحث فئران ذكور من السلالة Swiss strain (مستجدة من حظيرة الحيوانات المخبرية في هيئة الطاقة الذرية) متوسط أعمارها 16 أسبوعاً، ومتوسط وزنها (30 غراماً). بلغ عدد فئران التجربة 81 فأراً وزعت في 9 مجموعات، ربيت في حظيرة حيوان في كلية الطب، معدة لهذا الغرض، وقدم إليها العلف المركب والماء في زجاجات خاصة لهذا الغرض، وأمنت لها النظافة والرعاية والتهوية والتكييف.

2 - تحضير تراكيز الدواء:

حضرت جرعات متدرجة من محلول عقار الميثوتريكسات Methotrexate المسوق في عبوات سعة 5 ملغراماً، والمصنع في شركة: EBEWE Azneinittel Ges.m.b.H- Austria الأسترالية. مدد محلول العقار الأولي بمحلول كلور الصوديوم (0.15 NaCl) أو السيروم الملحي، وكانت الجرعات المستعملة: 25، 50، 100، 150، 200، 250، 300 ملغ/كغ لكل مجموعة من مجموعات التجربة، وتركزت مجموعتان تجريبيتان شاهدتان، واحدة من دون معالجة، وثانية حقنت بالسواغ (السيروم الملحي) فقط. حقنت فئران كل مجموعة من مجموعات التجربة السبع عضلياً بـ 1 مل من محلول الميثوتريكسات بأحد التراكيز السابقة، وفئران مجموعة الشاهد الثاني بـ 1 مل من محلول السواغ.

3 - الدراسة النسيجية العملية:

تركت الفئران 15 يوماً بعد الحقن، ثم ضحيت واستؤصلت خصاها، واستعملت اليمنى منها للدراسة النسيجية، حيث قطعت بقطع عرضي ووضعت في مثبت Bouin. تركت الخصى في المثبت مدة يوم واحد، ثم أجريت فيها مقاطع عرضية بثخانة 5 ميكرون، ولونت بالملون المضاعف هيماتوكسيلين - إيوزين H.E. (13).

أجريت الدراسة المجهرية باستخدام المجهر الضوئي ماركة Olympus C-35 (AD4)، واختبرت مقاطع الأنابيب المنوية للمرحلة VII من مراحل تكون النطاف للدراسة، ودرست 5 مقاطع للأنابيب المنوية لكل خصية تابعة لحيوان واحد، وكرر العمل لثلاثة حيوانات في كل مجموعة تجريبية (أي عدد الأنابيب المدروسة تساوي 15 أنبوباً لكل مجموعة). يحسب عدد الخلايا لكل نمط خلوي من أنماط الخلايا الموجودة في الأنبوب المنوي الواحد، ثم نكرر هذا العد على الخمسة أنابيب التابعة لحيوان واحد، ومن ثم تحسب متوسطات عدد الأنماط الخلوية المختلفة (المنسلات المنوية، الخلايا المنوية من المرتبة الأولى، النطيفات الخ....) للأنابيب المنوية الخمسة (للخصية الواحدة)، وكرر العمل نفسه على خصية الحيوان الثاني والثالث مع حساب المتوسطات لـ 15 أنبوباً وسجلت النتائج في جدول، ومثلت في رسوم بيانية لكل مجموعة من مجموعات التجربة، كما أخذت صور مجهرية لبعض المقاطع لإظهار درجات الأديات الخلوية الناتجة.

درست خلايا السلالة المنوية للمرحلة VII والتي تضم: المنسلات المنوية Spermatogonia، الخلايا المنوية الأولية I - spermatocytes، الخلايا المنوية الثانوية II - spermatocytes والنطيفات Spermatids باستخدام التكبير X1000.

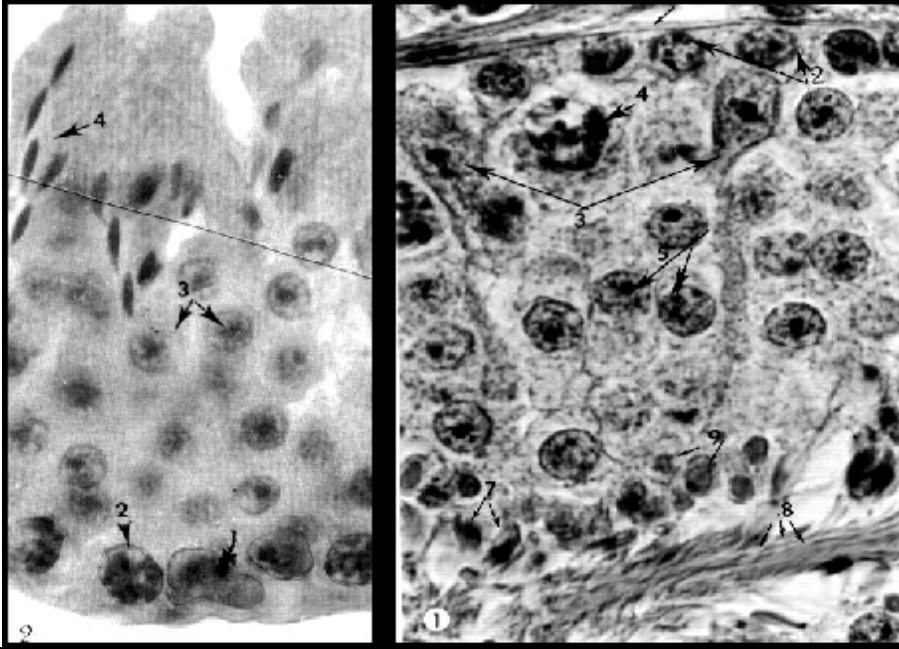
استخدم في التحليل الإحصائي حساب المتوسطات العددية لكل نمط من الأنماط الخلوية للسلالة المنوية مع حساب الانحراف المعياري (الذي يرمز له بـ SD) لكل متوسط من المتوسطات (جدول التحليل الإحصائي).

النتائج

1 - اختبار التحمل الدوائي:

أبدت حيوانات التجربة تحملاً للعقار حتى الجرعة 150 ملغ/كغ، ومات عدد منها في أثناء التجربة بأعداد تتناسب مع زيادة الجرعة. وفي الجرعة 200 ملغ/كغ كانت السمية بالغة على الحيوانات، والموت كبيراً جداً (إذ نفق 8 من أصل 9). وفي الجرعتين 250-300 ملغ/كغ لم تصمد الحيوانات ونفقت جميعها (البالغ عددها 18 حيواناً) قبل الوصول إلى اليوم 15، ولم يتوافر حولها من ثم بيانات، أما فيما يخص الشاهد غير المحقون والمحقون بسواغ فلم يبدوا فروقا في بقاء الحيوانات أو سلوكها أو تكون نطافها، وبذلك عدَّ الشاهدان شاهداً واحداً، وتؤكد عدم تأثير السواغ في التجربة (لوحة 1، شكل 1 أي الصورة 1).

اللوحة (1) البنية النسيجية للأبواب المنوية عند ذكور الفئران الشاهدة والمحقونة بالميتوتركسات. (X1000)



صورة (1) قطاعاً من الأنابيب المنوي عند الحيوان الشاهد (المرحلة I) صورة (2) قطاعاً من الأنابيب المنوي عند الفأر الشاهد (المرحلة VII) أو 2- خلايا منوية في مرحلة الخيوط التخينية Spermatogonia B، 3- خلايا سيرتولي، 4- خلية منوية في المرحلة الأولى Primary spermatocyte وفي مرحلة الخيوط التخينية Pachyten (مرحلة تكثف المادة الكروماتينية)، 5- نطاف، 6- نطاف Spermatids، 7- نطاف Sperms، 8- لمعة الأنابيب وفيه تشاهد سيات النطاف. ملاحظة: لا يمكن تمييز الخلايا المنوية من المرتبة I

2 - التأثير في عملية تكوين النطاف:

درس تأثير عقار الميتوتركسات في تكوين النطاف بصورة إجمالية وإحصائية وخلوية. يتضح التأثير الإجمالي في تناقص وزن الخصية بازدياد الجرعة: من 176 ± 26 ملغ عند الشاهد إلى 110 ± 1 ملغ للتركيز 200 ملغ (الجدول 1). كما يتضح في تناقص عدد الأنايب المنوية في المقطع العرضي للخصية بازدياد الجرعة: من 241 ± 9.41 أنبوباً عند الشاهد إلى 74 ± 25.7 أنبوباً للتركيز 200 ملغ/كغ (الجدول 1).

ويتضح خلوياً تناقص عدد الخلايا في المقطع العرضي لأنبوب منوي في المرحلة VII من 207.2 ± 25.7 خلية عند الشاهد إلى 68.2 ± 17.1 خلية للتركيز 200 ملغ/كغ (الشكل 3، 7، 8)؛ (الجدول 1)، وتشير هذه الأرقام بكل وضوح إلى تراجع عملية تكوين النطاف بتأثير الجرعة.

من جهة ثانية، يتضح من دراسة جميع الأنماط الخلوية للسلالة المنوية بدءاً من المنسلات المنوية حتى النطيفات أنها تناقصت جميعها في العدد مع ازدياد الجرعة (الجدول 1)، أي أن الميتوتركسات لم يكن انتقائياً، إذن إن جميع أنماط خلايا السلالة المنوية حساسة للميتوتركسات دون استثناء.

الجدول (1) يبين نتيجة الدراسة الإحصائية لتطور السلالة المنوية في المرحلة VII عند الفئران الشاهدة والفئران المحقونة بجرعات متزايدة من الميتوتركسات

| متوسط وزن الخصية الميمني / ملغ | متوسط عدد مقاطع الأنايب المنوية على المقطع العرضي للخصية | متوسط مجموع الخلايا على المقطع العرضي لأنبوب | Spermatides | Spermatocyte II | Spermatocytes I | Spermatogonia | مقدار الجرعة المحقونة mg/kg |
|--------------------------------|--|--|-----------------|-----------------|--|----------------|-----------------------------|
| 176.6 ± 26 | 241 ± 9.4 أنبوباً | 207.2 ± 25.7 | 66.4 ± 17.8 | 0 | P: 39.5 ± 4.9 R: 92 ± 10.3 | 9.4 ± 6.10 | الشاهد |
| 170 ± 9.8 | 154 ± 6 أنبوباً | 189.2 ± 39.6 | 61.4 ± 16.6 | 0 | P: 31.8 ± 4 R: 83.8 ± 16.9 | 10 ± 2.1 | 25 |
| 155 ± 15.1 | 148 ± 5.2 أنبوباً | $182 \pm 17 \pm 17.9$ | 60.4 ± 9.8 | 0 | P: 28 ± 4.7 R: 87.6 ± 8.9 | 6 ± 1.2 | 50 |
| 123.3 ± 11.5 | 108 ± 4 أنبوباً | 132.6 ± 16.6 | 27.8 ± 7 | 0 | P: 19.4 ± 5.8 R: 81.8 ± 7.7 | 3.6 ± 1.1 | 100 |
| 113.3 ± 5.7 | 106 ± 4 أنبوباً | 119.2 ± 14.4 | 22.8 ± 4.43 | 0 | P: 26.8 ± 5.80 R: 66.4 ± 10.8 | 3.2 ± 0.44 | 150 |
| 110 ± 0 | 74 ± 4 أنبوباً | 68.2 ± 17.1 | 0 | 0 | P: 17.8 ± 4.7 R: 46.8 ± 16.2 | 3.6 ± 1.1 | 200 |

Spermatogonia = المنسلات المنوية، I - spermatocytes = الخلايا المنوية من المرتبة I

(II) Spermatocytes = الخلايا المنوية من المرتبة الثانية II . spermatides = النطيفات

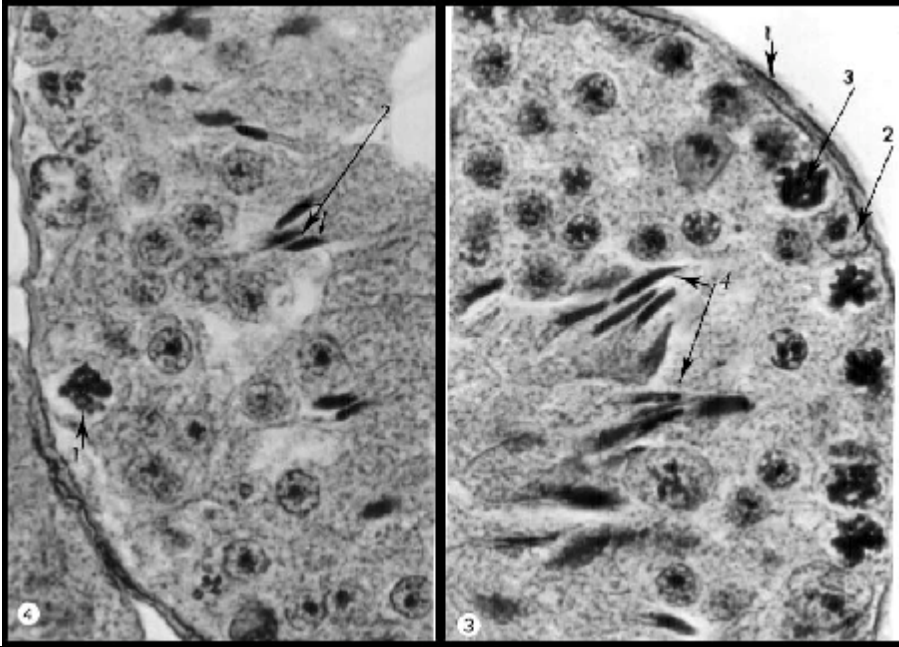
تم التعداد في خمسة أنابيب منوية لكل خصية وكرر العمل على ثلاث خصى بحيث أصبح عدد الأنايب المنوية 15 أنبوباً، وحسبت المتوسطات والانحرافات المعيارية SD لها.

pachyten = P الخلية المنوية من المرتبة I في مرحلة الخيوط الكثيفة الطور الأول من الانقسام النضجي الأول
R = خلايا منوية من المرتبة الأولى I (طور الراحة)

ولم تصادف في دراستنا الخلايا المنوية الثانوية في دارة تكوين النطاف وذلك لقصر عمرها مقارنة مع غيرها. كما لوحظ أن تأثير الميتوتركسات عند 150 ملغ/كغ يزيد بشكل طفيف على تأثير الجرعة 100 ملغ/كغ (الرسوم البيانية).

ومن الناحية الخلوية-النسجية لوحظت المقاطع العرضية للأنايب المنوية مشابهة للشاهد في التراكيز الأولى 25 و 50 ملغ/كغ: قطر متقارب، خلايا مدورة ونوى كبيرة واضحة، لوحات انقسامية في جميع أنماط الخلايا (لوحة 2، شكل 3 و 4). كما كانت لمعات المقاطع واضحة تحوي عددا من النطاف الكاملة (لوحة 2، شكل 3 و 4).

اللوحة (2) (X1000)



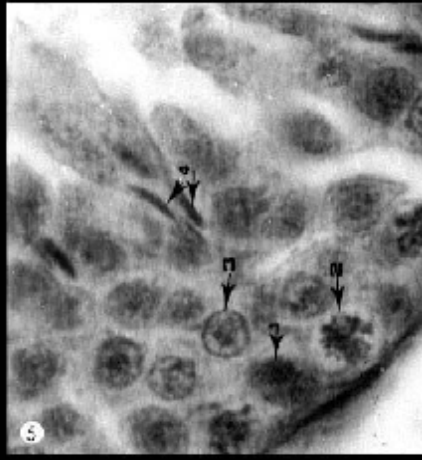
| | |
|--|---|
| صورة (3) قطاعاً من الأنبوب المنوي عند الفأر المحقون بـ 25 ملغ/كغ من الميتوتركسات | صورة (4) قطاعاً من الأنبوب المنوي للفأر المحقون بـ 50 ملغ/كغ وفي المرحلة VII. |
| 1- غلاف الأنبوب المنوي، 2- منسلية منوية، 3- خلية منوية في مرحلة الخيوط الثخينة، 4- نطيفات متطولة بالقرب من لمعة الأنبوب. | 1- خلية منوية في مرحلة الخيوط الثخينة، 2- نطيفات متطولة بالقرب من لمعة الأنبوب. |

وما بين التركيزين 100-150 ملغ/كغ لوحظ تراجع في المدلولات السابقة قابلة للتحمل (لوحة 3، شكل 5 و 6).

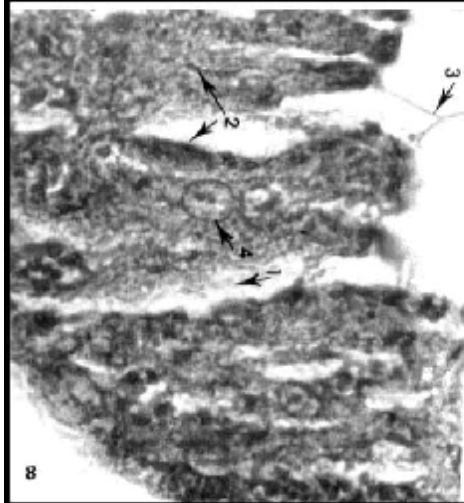
اللوحة (3) (X1000)



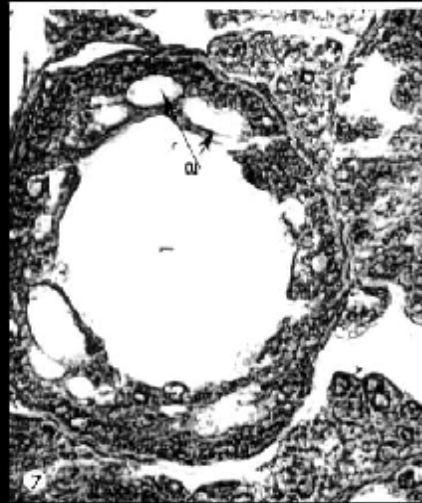
صورة (6) قطاعا من الأنبوب المنوي عند الفأر المحقون بـ 150 ملغ/كغ في المرحلة VII .
1- نطيفات متطاولة، 2- خلايا منوية من المرتبة I.



صورة (5) قطاعا من الأنبوب المنوي عند الفأر المحقون بـ 100 ملغ/كغ في المرحلة VII .
1- خلايا منوية في مرحلة الخيوط الثخينة، 2- خلايا منوية من المرتبة I، 3- نطيفات متطاولة قرب اللمعة.



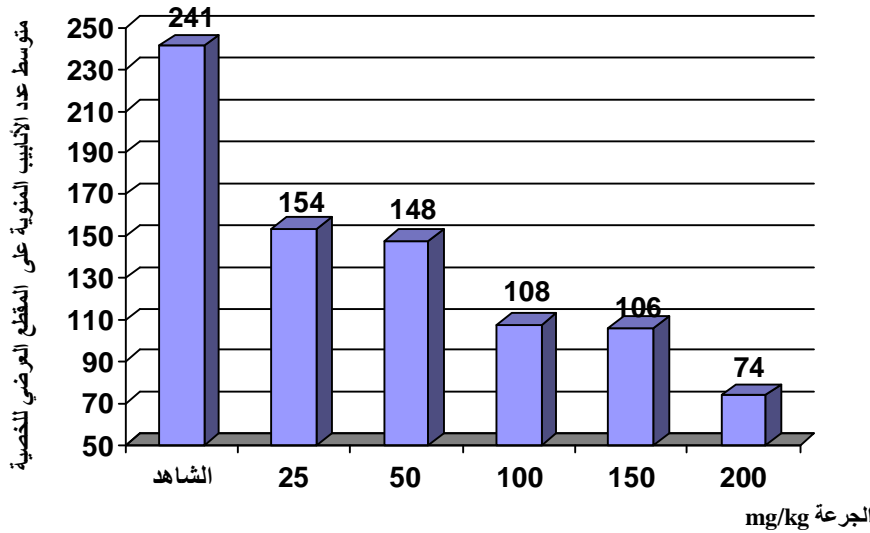
صورة (8) تكبير للأنبوب المنوي عند الحيوان المحقون بـ 200 ملغ/كغ.
1- الفراغات الطولية في جدران الأنبوب المنوي المهشمة،
2- النطيفات باللون القاتم، 3- سباط النطاف، كما يشاهد نوى بعض الخلايا المنوية (I أو II)



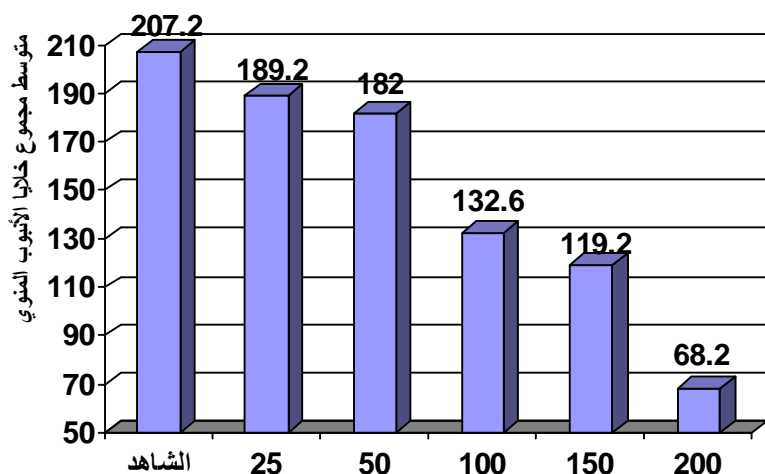
صورة (7) مقطع عرضي في أنبوب منوي عند الفأر المحقون بـ 200 ملغ/كغ X400.
1- اللمعة الفارغة الواسعة دون نطاف، 2- الفجوات في جدار الأنبوب.

وقد لوحظ عند الحيوانات التي حققت بجرعات 200 ملغ/كغ من مادة الميثوتريكسات وجود فجوات في جدران الأنايبب المنوية تمثل في الواقع أشكالاً من التخر أو الموت الخلوي، انتاب الخلايا المنوية من المرتبة I (لوحة 3، شكل 7 و 8)، وأن أكثر من 90% من الأنايبب كانت بهذا الشكل. كما تناقصت أقطار الأنايبب المنوية لدرجة ملحوظة، وندرت الأشكال الانقسامية وأصبح تمييز خلايا السلالة عن بعضها صعباً جداً، يضاف إلى ذلك التناقص الحاد في عدد الخلايا للأنبوب المنوي.

ولمقارنة النتائج التي تم الحصول عليها والمبينة في الجدول السابق، أنشئت الرسوم البيانية 1، 2، 3، 4 الخاصة بتناقص عدد الأنايبب على المقطع العرضي بازدياد الجرعة، وتناقص مجموع خلايا الأنبوب المنوي على المقطع بازدياد الجرعة، وأيضاً تناقص عدد المنويات من المرتبة الأولى والنطيفات (أو المنويات). وتوضح هذه الرسوم البيانية التأثير العام للميثوتريكسات في جميع مكونات تكون النطاف وجميع خلايا السلالة المنوية، كما تعكس حساسيتها جميعاً للميثوتريكسات وعدم الانتقائية في التأثير.

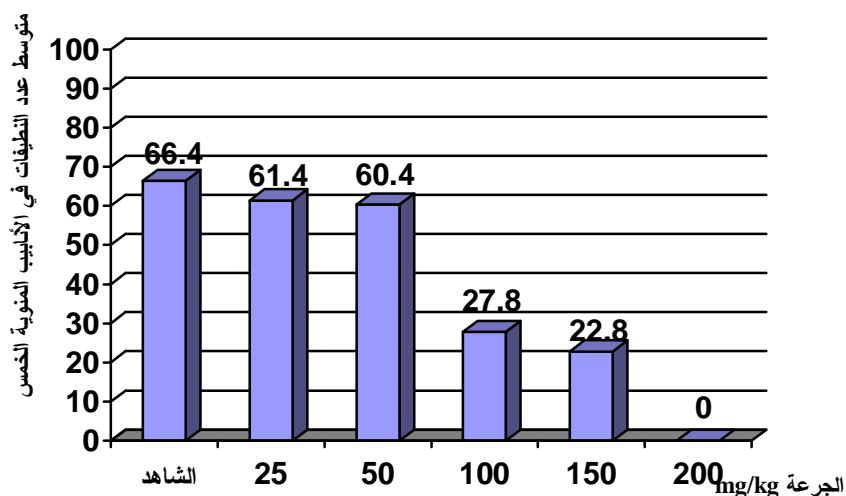


رسم بياني (1) يبين العلاقة بين مقدار الجرعة المحقونة من مادة الميثوتريكسات ومتوسط عدد الأنايبب على المقطع العرضي لخصية الفأر: لاحظ تناقص عدد الأنايبب مع تزايد الجرعة المحقونة

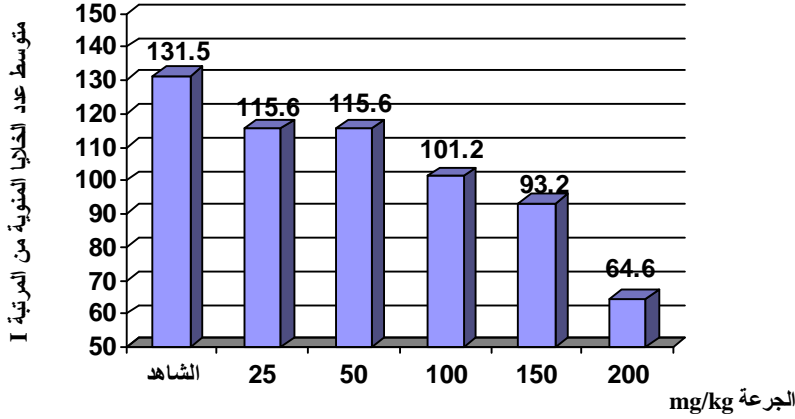


الجرعة mg/kg

رسم بياني (2) يبين العلاقة بين مقدار الجرعة المحقونة من مادة الميتوتركسات ومتوسط مجموع خلايا الأنبوب المنوي للفأر. لاحظ تناقص عدد الخلايا مع تزايد الجرعة المحقونة



رسم بياني (3) يبين العلاقة بين مقدار الجرعة المحقونة من مادة الميتوتركسات ومتوسط كمية النطيفات في الأنبوب المنوي عند الفأر أثر حقن جرعات متزايدة من مادة الميتوتركسات.



رسم بياني (4) يبين العلاقة بين مقدار الجرعة المحقونة من مادة الميثوتريكسات ومتوسط مجموع عدد الخلايا المنوية من المرتبة I Spermatocytes في طور الخيوط التخيئية (P) وطور الراحة (R). لاحظ تناقص عدد هذه الخلايا مع زيادة الجرعة المحقونة ولاحظ التساوي بين جرعتي 25 ملغ/كغ و 50 ملغ/كغ.

المناقشة

إن الهدف من استخدام مادة الميثوتريكسات في هذه الدراسة كونها من مضادات الفولات Folate antagoniste وكونها تستخدم في معالجة بعض الأورام السرطانية، ويمكن أن ينجم عن ذلك آثار عديدة: آثار عوز الفولات في الأعراض المرضية وفي تكاثر خلايا الجسم (6)، آثار السمية الخلوية cytotoxicity في التراكيز العالية للميثوتريكسات على خلايا السلالة المنوية في الأنابيب المنوية لخصى الجرذ (14). كما يبين بعض الباحثين مدى تحمل الكائن الحي لجرعات متزايدة منها وحدوث تشوهات جنينية خلقية وخاصة في الأنبوب العصبي (15).

ومن أهم آثار عوز الفولات انخفاض التكاثرية الخلوية، وقد اخترنا تكوين النطاف لمعرفة الأثر الناتج في محصول النطاف، ومن ثم علاقة ذلك بدرجة الخصوبة والعقم، ومعرفة الحدود الناجمة عن السمية الخلوية في التراكيز العالية.

كان التراجع في إنتاج النطاف واضحاً في هذه الدراسة، ويزداد مع ازدياد الجرعة. تتوافق هذه النتائج مع نتائج أخرى استخدمت فيها مضادات للفولات -غير الميثوتريكسات، حيث ظهر تراجع في تكوين النطاف عند الجرذ باستخدام جرعات متكررة من مضاد

الفولات من مادة الـ Pyrimethamine (16). وكذلك الأثر السمي لمادة Busulfan في تطور الخلايا المنشئة في خصية الفأر (17).

وفي دراستنا هذه، لوحظ أن إنتاج النطاف المعبر عنه بعدد الخلايا في المقطع العرضي لأنبوب منوي وفي وزن الخصية وعدد الأنابيب المنوية، كان طفيفاً في التراكيز المنخفضة 25-50 ملغ/كغ بحيث لا يتوقع أن ينتج عنه تأثير بدرجة الخصوبة، ولكن بدءاً من التركيز 100 ملغ/كغ تراجمت المدلولات السابقة إلى درجة كبيرة. وفي التراكيز 200 ملغ/كغ كان التأثير واضحاً حيث ظهرت فجوات في جدران الأنابيب المنوي مع تموت خلوي (أو تنخر خلوي) واضح وكبير في المنسلات المنوية والخلايا المنوية، الأمر الذي أدى إلى ندرة النطاف في الأنابيب المنوية وصولاً إلى حالة انعدام الخصوبة لقلّة النطاف بالمقارنة مع عدد النطاف عند الفأر الشاهد. وقد لوحظ التنخر الخلوي المبرمج Apoptosis أيضاً في الخلايا الكبدية لكبد حيوان كان قد حقن بمادة مضادة للفولات (18).

وتشير بعض الدراسات إلى أن عوز الفولات يرتبط في الواقع بارتفاع معدل الحمض الأميني الهوموسيستئين في الدم، وعندما يدخل خلايا الجسم فإنه يحدث أديات في الحمض النووي الـ DNA والصبغيات (تكسر في أذرع الصبغي) الأمر الذي يؤدي إلى انخفاض في معدل الانقسام الخلوي الخيطي المتساوي والمنصف المرافقين لعملية تكوين النطاف، ومن ثم انخفاض في عددها (19).

يرى الباحث رمضان وزملاؤه أن لمادة الميتوتركسات (MTX) تأثيراً سميّاً في الخلايا الظهارية في الأمعاء الدقيقة للفئران (خلايا الزغابات المعوية، الخلايا الغدية)، يتمثل في انخفاض عدد الجسيمات الكوندرية وقياساتها، وكان هذا الأمر يعود للعمل التخريبي لمادة (MTX) على هذه الجسيمات، كما ترافق ذلك بانخفاض ملحوظ في النشاط الأنزيمي للأنزيم سيكسونيك ديهيدروجيناز succinic dehydrogenase، الأمر الذي يحدث اضطرابات استقلابية في الخلايا (20).

وفي بحث آخر للباحث السابق وزملائه، وجدوا أن التأثير السمي لمادة (MTX) في الأمعاء الدقيقة للفئران تتمثل بتضخم في حجم جهاز كولجي للخلايا، وإحداث اضطرابات استقلابية فيها، تنتج عن زيادة في النشاط الأنزيمي لأنزيم الفوسفاتاز الحامضية، والتي تؤدي إلى زيادة الأيض الهدمي Catabolic ينتج عن عدم توازن في عمل الجسيمات الحالة (الليزومات)، وهذا يعرقل ظاهرة الانقسام الخلوي. ومن جهة أخرى يرى الباحثون أن ارتفاع تركيز أنزيم الإستيراز غير النوعية esterases nonspecific في الخلايا المعالجة بمادة (MTX) يؤدي إلى ارتفاع في استقلاب الحموض الدسمة، أو لعل ذلك يكون عاملاً في إزالة السمية Detoxicant (21).

ويرى بعض الباحثين إمكانية إحداث خلل في تكوين النطاف باستخدام مادة محرضة تخل في عملية تحول النطيفات إلى نطاف وهذه المادة هي: Alkylated Imino Sugar : A- butyldeoxynojmycin (=NB-DNJ) حيث يكون لهذه المادة دور سمي يشابه عمل الميتوتركسات، تؤثر في تمايز النطاف، وتؤدي إلى ظهور نطاف مشوهة غير طبيعية (22).

وفي دراستنا هذه، بدت ملامح السمية الخلوية واضحة في التراكيز المرتفعة بدءاً من التركيز 150 ملغ/كغ، وكانت شديدة الوضوح في التركيز 200 ملغ/كغ، فغابت الملامح الخلوية المميزة لكل نوع خلوي في الأنبوب المنوي، وبدا التخريب جلياً وظهرت ضمن الأنابيب المنوية فضوات عديدة، وزادت لمعة الأنابيب اتساعاً.

وتبين من الدراسة الإحصائية باستخدام التراكيز المختارة أن مادة الميتوتركسات تؤثر فعلاً في انقسام خلايا السلالة المنوية بدليل انخفاض أعداد جميع الأنماط الخلوية دون تمييز.

أما آثار السمية الخلوية فلا تظهر إلا في التراكيز المرتفعة، وتكون عامة في جميع الأنماط الخلوية.

ولا بد من الإشارة إلى ما يخص التراكيز المرتفعة من عقار الميتوتركسات المستخدمة في هذا العمل والتي تحملتها الفئران كانت أضعاف ما يوصف عند استخدامه في البروتوكولات العلاجية الكيميائية في حالات الأورام البشرية Chemotherapy، ويعود ذلك بشكل رئيسي للمعدلات الاستقلابية المرتفعة High metabolic rates عند القوارض بشكل عام والفئران بشكل خاص، وربما يعود لانخفاض الإتاحة البيولوجية الحيوية Bioavailability لهذا الدواء عند الفئران.

أما موضوع تجديد السلالة المنوية وعودتها إلى الحالة الطبيعية بالشفاء Recovery فقد خصصنا له دراسة لاحقة لمعرفة الأثر التراكمي لمادة الميتوتركسات.

REFERENCES

- 1-Vergel, R. G., Sanchez, L. R., Hereders, B. L., Rodingues, P. L. and Martinez, B. I. (1990). Primary prevention of Neural tube defects with Folic supplementation: Cuban Experience. *Penat Digan*, 10(3) :149-152.
- 2-Manganel, P., Triose, R. W. (1993). Weekly low-dose in rheumatoid arthritis. Review of the literature *Minerva Med. Oct.* (10) : 541-52.
- 3- Jolivet, J. and Chabner, B. A. (1983). Intracellular Pharmacokinetics of Methotrexate polyglumates in human breast Cancer cell. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH₂, 10- CH₃ pteroylglumate 4 and 4-NH₂-10-CH₃ pteroylglumates to dihydrofolate reductase. *J. Clin. Invest. Sept.* 72 (3) : 773-778.
- 4- Laurence, K. M., James, N., Miller, M. and Tennant, G. B. (1981). Double Blind Randomized Controlled Trial of Folate Treatment Conception to Prevent of Neural-Tube .*Br.Med.* 282: 1509-1511.
- 5-Blount, B. C., Mack, M. M., Wehr, G. M., MacGregor, J. T., Hiatt, R. A., Wang, G., Wickramasinghe, S. N., Everson, R. B. and Ames, B. N. (1997). Folate deficiency cause Uracil minicorporation into human DNA and chromosome breakag: Implication for Cancer and Neural Damage. *Proc. Natl.Acad. U.S.A* vol. 94 pp: 3290-3295 April 1997.
- 6-Croh, J. W., Mashiyama, S. T., Ames, B. N. and Fenech, M. (2001a). The effect of Folic Acid Deficiency and MTHFR C677T polymorphism on Chromosome Damage in Human Lymphocytes in vitro *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. Vol.10* 1089-1096.
- 7-Croh, J. W., Mashiyama, S. T., Ames, B. N. and Fenech, M. F. (2001b). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T Polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced Uracil incorporation into primary human Lymphocyte DNA in vitro *Carcinogenesis, Vol. 22 No.7*, 1019-1025 July.
- 8-Lindebaum, J., Allen, R. H. (1995). Clinical spectrum and Diagnosis of Folate Deficiency in: Bailey, L. B., ed. *Folate in health and disease*. New York , NY : Macel Dekker,inc. 43-73.
- 9-Hausknecht, R. U. (1995). Methotrexate and Misoprostole to terminate early pregnancy . *J. Med. Vol. 333*: 527-540.
- 10- Neves, E. S., Chiarini-Garcia, H. and Franca, L. R. (2002). Comparative Testis Morphometry and Somniferous Epithelium Cycle length in Donkey and Mules. *Biology of Reproduction. 67*,247-255.
- 11- Leblon, C. P. and Clermont, Y. (1952). Definition of Stages of cycle of Seminiferous Epithelium in the Rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55: 548-573.
- 12-Christensen, A. K. (1961). Cycle of Seminiferous Epithelium in rat testis. Photographs Showing Examples of the Various Stages. *Am. J. Anat.* 108:47.
- 13- Martogia, R. and Martogia, P. (1967). *Initiation aux Techniques de l'histologie Animal*. Masson et Cie Editeur 120 bd.st. Garrion Paris VI France.
- 14-Johnson, F. E., Farr, S. A., Mawad, M. and Woo, Y. C. (1994). Testicular Cytotoxicity of Intravenous Methotrexate in Rate. *J. Surg. Oncol. Mar.*, 55(3) : 175-178.

- 15-Juriloff, D. M. and Harris, M. J. (2000). Mouse models for neural tube closure defect. *Hum. Mol. Genet. Apr.* 129 (6) p. 933-1000.
- 16- Murakami, Y., Takeda, M., Suzuki, Y., Fujie, H., Ogasawara, H. and Masuda, T. (2002). Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated doses study in Rat 2: *J. Toxicol. Sci. Oct.* 25 Spec. N: 203-210.
- 17- Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S., Honjo, T., and Shinohara, T. (2003). Allogeneic Offspring Produced by male Germ Line Stem Cell. Transplantation into infertile mouse testis. *Biology of Reproduction* 68 (1) : 167-173.
- 18- Kobayashi, K., Terada, C. and Tsukamoto, L. (2002). Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. *Eur. J. Pharmacol. Mar. 1,* 4381 (1-2) : 19-24.
- 19-Formsser, K. M., Jagerstad, M. I. and Witthof, K. (2000). Folate and dairy products: A critical Update. *J. Am. Coll. Nutr. Apr.* 19 (2 supp) 2p: 1005-1105.
- 20-Ramadn, A. A., Yousif, W. B. and Ali, A. M. (1992a). The effect of methotrexate (MTX) on the small intestine of the mouse.III.Mitochondria and succinic dehydrogenase (SDH). *Funct. Dev. Morphol.*2 (1):3-9.
- 21-Ramadan, A. A., Yousif, W. B. and Ali, A. M. (1992b). The effect of Methotrexate (MTX) on the small intestine of the mouse. IV. The Golgi apparatus, phosphatases and estrerases. *Funct. Dev. Morphol.* (2):111-9.
- 22-Van DER, A. C., Jeyakumar, M., Butters, T. D., Charlton, H. M., Moore, H. D., Dwek, R. A. and Platte, F. M. (2002). Reversible infertility in male mice after Oral administration of alkylated Imino sugar: A non-hormonal approach to male contraception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Dec. Vol.99* N0. 26 pp.17173-17178.