

دراسة التأثير التراكمي للميتوتركسات Methotrexate في تكون النطاف عند ذكور الفئران البيضاء وإمكانية البراء

أحمد عثمان⁽¹⁾ و بشير الزالق⁽²⁾

و أمل العبد الله⁽²⁾ و أميرة أومري⁽²⁾

⁽¹⁾ قسم النسيج وعلم الجنين - كلية الطب البشري - جامعة دمشق - سورية

⁽²⁾ قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

تاريخ الإيداع 2011/05/08

قبل للنشر في 2011/08/08

الملخص

أدى الحقن العضلي التراكمي لمحلول الميتوتركسات بجرعة 15 ملغ / كغ وبمعدل جرعتين أسبوعياً 40 فأراً بالغاً بمتوسط وزن يعادل 32 غ وعمر 16 أسبوعاً عند بدء التجربة إلى تناقص نسب البقيا بعد الحقن الثاني من بدء التجربة لتصل إلى 10% بعد الحقن الرابع، ويشير ذلك إلى أن للجرعة 15 ملغ/ كغ أثراً مميتاً عند استخدامها بشكل تراكمي.

وباستخدام الجرعة 10 ملغ/كغ، وتكرار التجربة السابقة على 45 فأراً بالغاً مدة ثمانية أسابيع، لم يلاحظ نفوق في حيوانات التجربة. مما يشير إلى أن هذه الجرعة التراكمية متحملة حيويًا. بيد أن مؤشرات تكون النطاف عند هذه الحيوانات المعالجة تراجعت تراجعاً كبيراً بصورة تؤثر في درجة الإخصاب. إذ تناقصت أوزان الخصى تدريجياً مقارنة بالشاهد من 170 ± 7 ملغ /خصية إلى 21 ± 135 ملغ/ خصية، وترافق ذلك مع تناقص واضح في تعداد النطاف من $8.25 \pm 2.02 \times 10^6$ نطفة/ خصية إلى $4.76 \pm 1.28 \times 10^6$ نطفة/ خصية. ومن الملفت للنظر أن مؤشرات تكوين النطاف (ومن ثم درجة الإخصاب) قد ارتفعت قيمها تجريبياً بعد توقف الحقن وعادت إلى قيمتها الطبيعية بعد شهرين من التوقف. ويشير ذلك إلى إمكانية البراء من تأثير الميتوتركسات بعد التوقف عن تعاطيه.

الكلمات المفتاحية: التأثير التراكمي، الميتوتركسات، تكوين النطاف، ذكور الفئران، البراء.

Study of the Accumulative Effect of Methotrexate on Spermatogenesis in Male Mice and the Possibilities of Recovery

A. Ossman⁽¹⁾, B. AL-Zalek⁽²⁾,
A. AL-abdalla⁽²⁾ and A. Omary⁽²⁾

(1) Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Damascus University, Syria.

(2) Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

Received 08/05/2011

Accepted 08/08/2011

ABSTRACT

Intramuscular accumulative injection of Methotrexate was delivered to 40 individuals of 16-week old adult mice with a 32 g weight average. The given dose was 15 mg/kg and delivered twice a week. A decrease in the survival rate was noticed as a result after the second injection, and this decrease in the survival

rate continued to reach 10% after the fourth injection. This indicates that this 15 mg/kg dose has a lethal effect when it is used in an accumulative pattern.

The same previous experiment was repeated using a 10mg/kg dose and delivered to 45 adult mice, this delivery covered 8 weeks time in the experiment. All of the tested animals survived the given dose. This indicates that this accumulative dose is biologically tolerated by the tested mice.

Whereas the spermatogenesis indicators were rapidly decreased in the treated animals which affected the fertility abilities in the male mice; the testes weight decreased gradually compared to the control ones from 170 ± 7 mg/test to 135 ± 21 mg/test, and this was accompanied by a noticed reduction in the sperms count from $10^6 \times 18.25 \pm 2.02$ sperms/test to $10^6 \times 4.76 \pm 1.28$ sperms/test.

It is important to mention that spermatogenesis indicators (fertility) increased gradually after the injection was stopped, and returned to its normal levels after two months of stopping.

This indicates that the recovery from Methotrexate effects is possible after the injection was stopped.

Key Words: Accumulative effect, Methotrexate, Spermatogenesis, Male mice, Recovery.

المقدمة

الميتوتركسات Methotrexate هي مادة دوائية تستخدم لمعالجة العديد من الأمراض التي تصيب البشر، فهي من ضمن العقاقير المضادة للاستقلاب Anti-metabolism، يستخدم لمعالجة اضطرابات الأورام الخبيثة malignant tumors والتهاب المفاصل الرثياني Rheumatoid arthritis والصدف psoriasis وأمراض جلدية، كما أنها تؤثر في أجهزة الجسم المختلفة كجهاز الهضم (المجرى المعدي- المعوي) محدثة اضطرابات هضمية (1) و(2). ولهذا العقار تأثير سمي خلوي cytotoxic في السلالة المنوية للخصية (3) و(4). تحدث السمية الخلوية طفرات في الخلايا المنشئة germ cells حيث تتدخل مادة الميتوتركسات في عمل حمض الفوليك Folic acid، ويعزى هذا إلى التشابه الكبير في البناء الجزيئي بين حمض الفوليك ومادة الميتوتركسات (5)، فهذا الأخير هو من مضادات الفولات Folate antagonists، ويتمثل أثره الاستقلابي المضاد لحمض الفوليك (فيتامين B9) على نحو يحدث فيه (الشكل المشوه) لهذا الأخير خللاً في تركيب الـ DNA وخاصة في الأسس الأزوتية البيورينية purine والبيريميدينية pyrimidine عندما يدخل اليوراسيل (U) بدلاً من الثيمين (T) في جزيء الـ DNA فيحدث أديتات في الـ DNA الخلايا، ومن بينها الخلايا المنشئة (6) و(7).

إن الأثر الناتج عن الميتوتركسات في تكوين النطاف مشابه إلى حد بعيد للأثر الناتج عن استخدام مواد هرمونية وأدوية كيميائية وعوامل إشعاعية، فهناك سمية خلوية وانخفاض في عدد النطاف ناتج عن توقف الانقسام الخلوي (المنصف والخيطي) إلى حد ما، وصولاً إلى مرحلة الاستموات الخلوي Apoptosis التي ترافقها أديتات في البنية النسيجية للخصية (8).

يبدو أن معالجة السرطان (وبشكل مديد) له منعكسات سيئة على وظيفة الخصوبة وإنتاج النطاف، إذ إن له تأثيراً مباشراً في الخلايا الأمهات (المنسلبات المنوية spermatogonia أو الخلايا المنشئة germ cells في الأنابيب المنوية)، وإحداث اضطرابات في تكوين النطاف spermatogenesis الأمر الذي يؤدي إلى انخفاض في عدد النطاف وحركتها وذلك عقب خلل وظيفي في الهرمونات الجنسية FSH و LH (عبر المسلك تحت المهادي-النخامي)، يبدأ بتأثير سيئ في عمل خلايا سيرتولي وينتهي بسوء تغذية النطاف وتشكلها (9).

هَدَفَ هذا البحث إلى استقصاء التأثير التراكمي للاستخدام المديد لمادة الميتوتركسات في المعالجات التي تستمر مدة زمنية طويلة نسبياً في درجة الخصوبة عند ذكور الفئران البالغة، ومن ثم تأثير الميتوتركسات في إنتاج النطاف لديهم، وهل يحدث شفاء (براء

(recovery) بعد التوقف عن تناول هذا العقار؟ وإلى أي مدى؟ ومتى يحصل؟ وذلك بهدف معرفة تأثير هذا العقار في الرجال الذين يتناولونه، ومن ثم في خصوبتهم.

مواد البحث وطرقه

1- حيوانات التجربة:

استخدم في هذا البحث فئران ذكور بالغة من السلالة swiss strain، وهي بأعمار متوسطة 16 أسبوعاً، ومتوسط وزنها (32 غراماً) مستجرة من حظيرة هيئة الطاقة الذرية السورية.

بلغ عدد فئران التجارب 85 فأراً ذكراً، وزعت في مجموعات ضمن أقفاص، يحوي القفص 6-8 فئران ربيبة في حظيرة حيوان في كلية الطب معدة لهذا الغرض، وقدم إليها العلف المركب والماء في زجاجات خاصة، وأمنت لها النظافة والرعاية والتهوية والتكييف.

2- تحضير تركيز الدواء:

استخدمت مادة الميتوتركسات Methotrexate المسوق في عبوات سعة (5ml، 50mg) والمصنع في شركة: EBEWE Azneimittel Ges.m.b.H-Austria الأسترالية.

مدد محلول العقار بالسيروم الملحي (0,9% NaCl) وحضر من المحلول الناتج محاليل ميتوتركسات بتركيز (15 ملغ/كغ) لجرعات التجربة الأولى ثم بتركيز (10 ملغ/كغ) لجرعات التجربة الثانية بهدف دراسة التأثير التراكمي لهذا العقار في الاستخدامات التي تتم خلال مدد زمنية طويلة نسبياً. استندنا في اختيارنا لهاتين الجرعتين السابقتي الذكر على دراسة سابقة حققت فيها مادة الميتوتركسات مرة واحدة فقط وجرعات كانت تراوح بين 25 و300 ملغ لكل كيلوغرام من وزن الجسم (10). ولما كنا سنقوم في هذا البحث بحقن تراكمي متكرر خلال مدد زمنية طويلة نسبياً، فقد لجأنا إلى جرعة أقل من الجرعات المستخدمة في البحث السابق (10)، وبدأنا بالجرعة 15mg/kg وكانت جرعة عالية أدت إلى وفيات كثيرة خلال ثلاثة أسابيع، مما اضطرنا إلى اللجوء إلى الجرعة 10mg/kg، التي لم تسبب أية وفيات طيلة مراحل التجربة (4 أشهر).

* تركت مجموعة شاهدة من الفئران كانت تحقن بالسواغ (أو السيروم الملحي) فقط.

* حقنت المجموعة الأولى من الفئران (عددها 40) بجرعة 15 ملغ/كغ وجرعتين أسبوعياً (يوما الإثنين والخميس من كل أسبوع) في عضلة الفخذ مدة (3 أسابيع). وحقنت المجموعة الثانية (عددها 45) بجرعة 10 ملغ/كغ بجرعتين أسبوعياً (في اليومين نفسيهما) في عضلة الفخذ مدة (8 أسابيع).

* أخذت العينات للدراسة (الخصيتان والبربخ) بدءاً من الأسبوع الأول بعد الحقن (3 فئران في كل مرة)، مع استمرار أخذ العينات للدراسة كل أسبوع (مدة 8 أسابيع)، ثم توقفنا عن الحقن، وقمنا بأخذ عينات للدراسة بعد شهر وشهرين من أجل التحري عن إمكانية الشفاء. وهكذا استمر العمل المخبري مدة أربعة أشهر (شهران من الحقن وشهران من أجل دراسة الشفاء).

3- مراحل الدراسة:

* يضحي الحيوان المراد دراسته بقطع النخاع الشوكي بالضغط على منطقة الرقبة وتشد الذنب إلى الخلف بقوة.

* يوزن الحيوان ثم تستأصل الخصيتان مع بربخهما (لاحتوائهما على أعداد كبيرة من النطاف) وتوزن كل كل خصية على حدة بميزان إلكتروني حساس.

* تحسب وفيات حيوانات التجربة والنسبة المئوية للبقيا survivors للحيوانات الشاهدة، والمعالجة بمختلف مرات الحقن (الحقن المتكرر التراكمي).

* لعزل النطاف من الخصية والبربخ ينزع الغلاف الأبيض (أو القميص الأبيض Tunica albuginea) للخصية اليسرى، ثم تقطع الخصية مع البربخ إلى قطع صغيرة وتوضع القطع في بيشر يضاف إليه محلول كلور الصوديوم (0,15 M NaCl) حتى حجم (20ml)، ويجانس المحلول باستخدام جهاز مجانسة خاص (K-RW 10R) مدة دقيقة واحدة وبسرعة دوران بمعدل 10 دورات في الثانية بعد تغطية البيشر بورق السلوفان حتى نحصل على خليط متجانس homogenous بحيث تتوزع النطاف في الجناسة homogenate على نحو متساوٍ.

* يجري تعداد النطاف بشكل مباشر تحت عدسة المجهر الضوئي وبالتكبير المناسب لقطرة من الجناسة بعد تحريكها جيداً باستخدام تقانة التعداد الدموية التقليدية: conventional hemocytometer technique (صفحة تعداد الكريات الدموية)، وتقدر نسبة النطاف المتحركة، كما يقدر عدد النطاف في كامل الخصية مع بربخها بتقدير العدد في (1mm³) من صفحة التعداد، ومن ثم يُحسب عدد النطاف في حجم 20ml من الجناسة الكاملة للخصية وبربخها.

* أجريت التعدادات في الساعات المجهريّة الأربع من صفحة التعداد (الخاصة بتعداد الكريات البيض عادة) لكل عينة، وحسبت المتوسطات والانحرافات المعيارية SD لهذه الساعات. وكنا نكرر هذه العملية عدة مرات لكل عينة، ثم نحسب المتوسطات والانحرافات المعيارية لكامل العينة.

* وتعدّ النطاف في مربعات العدد التي تظهر فيها رؤوس النطاف فقط بغض النظر عن أنيالها.

* تثبت الخصى اليمنى للحيوانات في مثبت بوان Bouin تحضيراً لدراسة نسيجية للخصية في بحث لاحق.

النتائج

التجربة الأولى: (جرعة 15 ملغ/كغ)

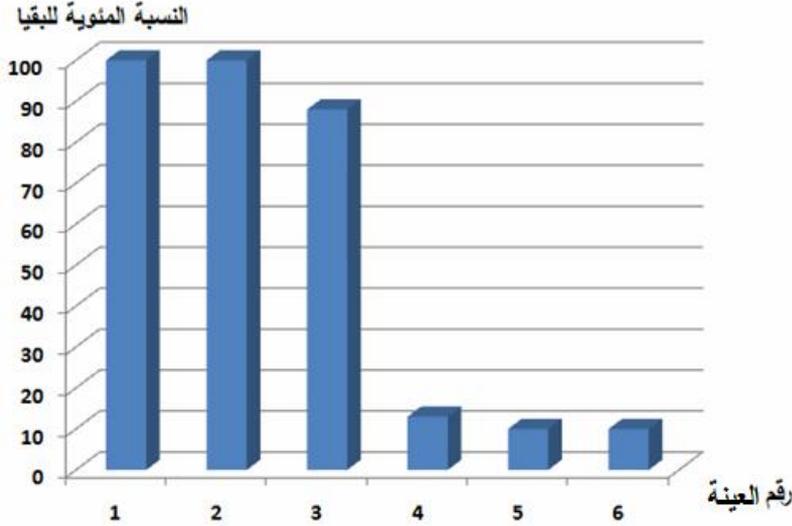
استخدم في هذه التجربة 40 فأراً ذكراً متوسط أوزانهم 32 غراماً بعمر 16 أسبوعاً عند بدء التجربة، وهي فئران بيضاء من سلالة سويسرية، قسمت إلى مجموعات ضمن أقفاص. استمر الحقن مدة 3 أسابيع، ثم توقفنا عن الحقن. وكنا نأخذ 3 فئران للدراسة في كل مرة.

1-دراسة التأثير التراكمي في البقيا:

سجلت وفيات مرتفعة في هذه التجربة وخاصة بعد الحقن الرابع، حيث ماتت أغلبية الفئران (النسبة المئوية للبقيا 10%)، إذ إن للجرعة 15ملغ/كغ بشكلها التراكمي تأثير سمي معمم مميت. ويظهر المخطط (1) (التمثيل البياني المنسج Histogram) دراسة النسب المئوية للبقيا وفق المراحل التجريبية إذ نجد أن الشواهد التي حققت بالسواغ الملحي فقط لم يحدث فيها موتاً، أي بقيت الفئران جميعها سليمة (النسبة المئوية للبقيا كانت 100%)، في حين كان تأثير الجرعة 15 ملغ /كغ من الميتوتركسات مميتاً بشكل حاد ولاسيما بعد الحقن الثاني. وهكذا كانت النسبة المئوية للبقيا: 100%، 87,5%، 12,5%، 10% و 10% بعد الحقن الأول والثاني والثالث والرابع والخامس على التوالي. ولا بدّ من الإشارة إلى أن النسبة المئوية للبقيا كانت تحسب على أساس العدد المتبقي من الحيوانات بعد كل عملية حقن .

2-الأثر التراكمي في تعداد النطاف:

بُدئ بتعداد النطاف في الخصية مع بربخها لدى الحيوانات الشاهدة، حيث بلغ متوسط تعداد النطاف في الخصى والبربخ لثلاثة فئران: $24,5 \pm 6 \times 10^6$ نطفة (10^6 =مليون)، في حين بلغ متوسط عدد النطاف (3 فئران) بعد الحقن الثالث : $4,8 \pm 2,4 \times 10^6$ نطفة. ولم تدرس أوزان الخصى ولا تعداد النطاف عند الفئران المحقونة كلها بسبب الموت الناجم عن الجرعة 15 ملغ/كغ. ولهذا أجرينا التجربة الثانية البديلة باستخدام جرعة أقل سمية (10 ملغ/كغ)، وكان اختيارنا لهذه الجرعة موقفاً إذ لم تحصل وفيات طيلة مدة التجربة (4 أشهر).



المخطط (1) تأثير الميتوتركسات في النسبة المئوية للبقيا لدى الفئران الشاهدة والمحقونة بجرعة 15 ملغ/كغ (1-الحيوانات الشاهدة. أما 2 و3 و4 و5 و6 فهي بعد الحقن الأول والثاني والثالث والرابع والخامس على التوالي.

التجربة الثانية:

استخدمنا في هذه التجربة 45 فأراً ذكراً بالغاً بعمر 16 أسبوعاً عند بدء التجربة، ثم قمنا بعد ذلك بالعمل التجريبي بإجراء حقن عضلي لمادة الميتوتركسات بالتركيز 10 ملغ/كغ من وزن الحيوان. كان كل فأر يحقن مرتين في الأسبوع، وفي الأسبوع التالي، وتؤخذ عينات للدراسة (بداية الأسبوع)، أجريت حقنات متتالية على مدى 8 أسابيع بمعدل حقنتين في الأسبوع الواحد، وفي كل مرة تؤخذ 3 عينات للدراسة. وبعد 16 حقناً أوقف الحقن. درست 3 عينات شاهدة ثم أخذت 3 عينات بعد شهر من توقف الحقن ودرست مع 3 عينات شاهدة. كرر هذا العمل التجريبي بعد شهرين من توقف الحقن (3 فئران شاهدة و3 محقونة كما في الجداول 2 و3 و4).

1-دراسة التأثير التراكمي في وزن الخصي:

يلاحظ في أثناء دراسة متوسط وزن الخصية مع بربخها لـ 3 فئران شاهدة (المحقونة بالسواغ فقط) عدم تأثر الخصية بالسواغ الملحي، ومن ثم ثبات وزنها تقريباً (مع زيادته تدريجياً بتقدم العمر من 170 ملغ عند بدء التجربة إلى 185 ملغ عند نهايتها بعد مرور 4 أشهر، كما هو موضح في الجدول (1) في العينة 1 والعينة 14). بينما أبدت الحيوانات المحقونة تراكمياً بالميتوتركسات وعلى مدى 6 أسابيع تناقصاً تدريجياً في متوسط وزن

الخصية من 170 ملغ لدى الشاهد إلى 85 ملغ بعد 6 أسابيع و 12 حقناً (من العينة 1 إلى العينة 7 في الجدول (1))، مما يشير إلى التأثير السلبي للاستخدام المتكرر لمادة الميتوتركسات في وزن الخصية. ثم لاحظنا زيادة قليلة في متوسط وزن الخصية في الأسبوعين السابع والثامن (من 85 ملغ إلى 135 ملغ في العينتين 8 و 9 من الجدول (1))، على الرغم من استمرارنا في عملية الحقن. ولكن الخصية استعادت وزنها الطبيعي بشكل واضح مقارنة بالشاهد بعد شهر من توقف عملية الحقن (147,5 ملغ، العينة 10 من الجدول (1))، وبعد شهرين (175 ملغ، العينة 11 من الجدول (1)). ويمكننا تتبع سير الأحداث التجريبية فيما يخص أوزان الخصى في المخطط (2).

2- التأثير التراكمي في تعداد النطاف: (الجدول 2 والمخطط 3)

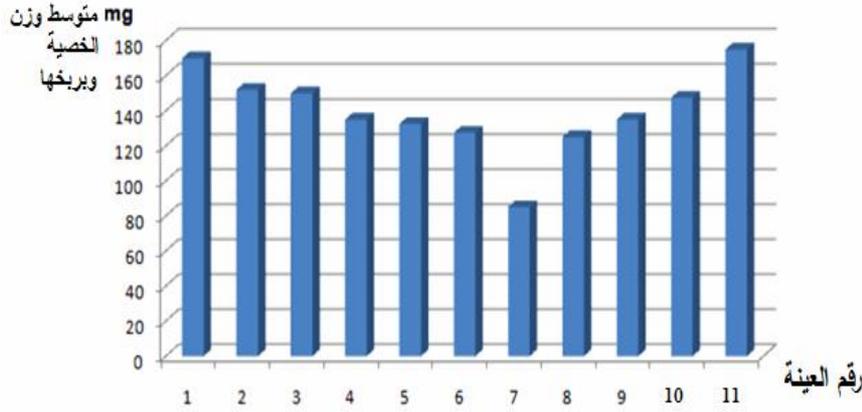
يظهر تأثير الحقن التراكمي للميتوتركسات في متوسط تعداد النطاف في الخصية وبربخها بتناقص تدريجي في أعدادها مع تزايد عدد مرات الحقن، حتى الحقن العاشر (بدءاً من 18 مليون نطفة عند الشاهد في العينة 1 من الجدول (2) إلى 0,8 مليون نطفة بعد الحقن العاشر في العينة 6 من الجدول نفسه). أي إنَّ للاستخدام المتكرر لهذا العقار تأثيراً سلبياً في عدد النطاف وإنتاجها في الخصية. ثم يزداد العدد قليلاً وبصورة تدريجية في الأسابيع من 6 إلى 8 ليصبح 4,76 مليون نطفة في العينة 9 من الجدول (2))، على الرغم من استمرار عملية الحقن خلال هذه الأسابيع الثلاثة. ولكن أعداد النطاف تعود إلى ما كانت عليه عند الشاهد، لا بل تتخطاه، بسبب تقدم العمر بعد شهر واحد من توقف عملية الحقن (52,12 مليون نطفة في العينة رقم 10 من الجدول (2))، وبعد شهرين من هذا التوقف (5,28 مليون نطفة في العينة رقم 11 من الجدول (2)). ويمكننا تتبع سير الأحداث التجريبية فيما يخص أعداد النطاف في الخصية في المخطط (3).

3- استخدام الميتوتركسات المديد ودرجة البراء:

توضح النتائج المشار إليها في الجدولين (1 و 2) والمخططات البيانية (2 و 3) أن التأثير السلبي للميتوتركسات في أوزان الخصى وتعداد النطاف يتبع بعد مدة زمنية بعودة تدريجية للنمائل للشفاء أي الوصول إلى البراء بعد توقف الحقن، فبعد توقف الحقن بشهر واحد ثم شهرين تستعيد الخصى وزنها وتصبح مماثلة لخصى الحيوانات الشاهدة (الجدول 1)، ويترافق ذلك بزيادة في عدد النطاف في الخصية (الجدول 2) حتى يصبح مشابهاً للعدد في خصى الحيوانات الشاهدة (العينتان 10 و 11 من الجدول 2)، أي إنَّ الفئران وصلت إلى درجة البراء Recovery بعد انقضاء قرابة شهرين من التوقف عن استخدام العلاج.

الجدول (1) دراسة الأثر التراكمي لمادة الميتوتركسات في وزن الخصية للفئران المحقونة بتركيز 10ملغ/كغ.

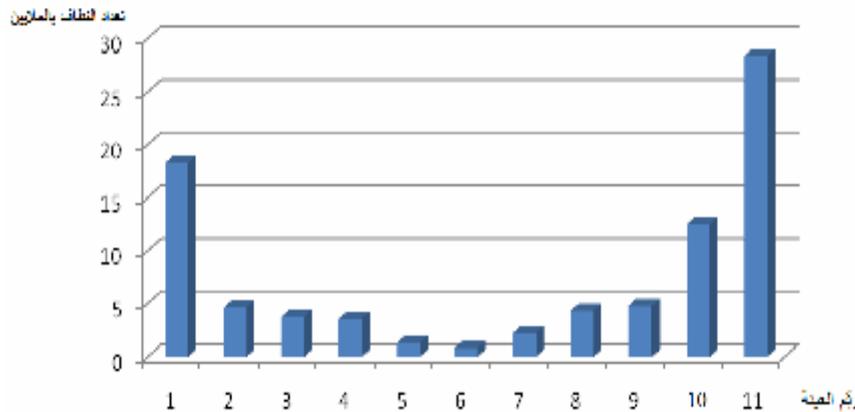
رقم العينة	المجموعة	متوسط وزن الخصية مع البربخ/ ملغ
1	الشاهد (3 فئران)	170 ± 7 mg
2	بعد أسبوع وحقتين (3 فئران)	152 ± 3,5 mg
3	بعد أسبوعين و 4 حقنات (3 فئران)	150 ± 20 mg
4	بعد 3 أسابيع و 6 حقن (3 فئران)	135 ± 7 mg
5	بعد 4 أسابيع و 8 حقن (3 فئران)	132 ± 3,5 mg
6	بعد 5 أسابيع و 10 حقن (3 فئران)	127,5 ± 17,5 mg
7	بعد 6 أسابيع و 12 حقنة (3 فئران)	85 ± 7 mg
8	بعد 7 أسابيع و 14 حقنة (3 فئران)	125 ± 7 mg
9	بعد 8 أسابيع و 16 حقنة (3 فئران)	135 ± 21 mg
10	بعد شهر واحد من توقف الحقن (3 فئران)	147,5 ± 17,6 mg
11	بعد شهرين من توقف الحقن (3 فئران)	175 ± 7 mg
12	بعد توقف الحقن - شاهد (3 فئران)	176,6 ± 9,4 mg
13	بعد شهر واحد من توقف الحقن شاهد (3 فئران)	173,3 ± 9,3 mg
14	بعد شهرين من توقف الحقن شاهدة (3 فئران)	185 ± 7 mg



المخطط (2) تأثير الميتوتركسات في متوسط وزن الخصية وبربخها (بالنسبة إلى الوزن عند الحيوان الشاهد) للفئران المحقونة بـ 10 ملغ/كغ تراكمي، بالنسبة إلى مدلولات الأرقام يرجع إلى الجدول السابق.

الجدول (2) متوسط تعداد النطاق والانحراف المعياري للأثر التراكمي لمادة الميتوتركسات عند الفئران المحقونة بتركيز 10ملغ/كغ بمعدل حقنتين أسبوعياً. 1، 12، 13، 14، فئران شاهدة، أما البقية فهي فئران محقونة

رقم العينة	المجموعة	تعداد النطاق (متوسط و الإحراق المعياري)
1	الشاهد (3 فئران)	$10 \times 18,25 \pm 2,02$ نطفة
2	بعد أسبوع وحقنتين (3 فئران)	$10 \times 4,6 \pm 2,5$ نطفة
3	بعد أسبوعين و 4 حقنات (3 فئران)	$10 \times 3,71 \pm 1,6$ نطفة
4	بعد 3 أسابيع و 6 حقنات (3 فئران)	$10 \times 3,54 \pm 0,28$ نطفة
5	بعد 4 أسابيع و 8 حقنات (3 فئران)	$10 \times 1,3 \pm 0,54$ نطفة
6	بعد 5 أسابيع و 10 حقنات (3 فئران)	$10 \times 0,8 \pm 0,47$ نطفة
7	بعد 6 أسابيع و 12 حقنة (3 فئران)	$10 \times 2,21 \pm 1,01$ نطفة
8	بعد 7 أسابيع و 14 حقنة (3 فئران)	$10 \times 4,31 \pm 0,48$ نطفة
9	بعد 8 أسابيع و 16 حقنة (3 فئران)	$10 \times 4,76 \pm 1,28$ نطفة
10	بعد شهر واحد من توقف الحقن (3 فئران)	$10 \times 1,252 \pm 1,84$ نطفة
11	بعد شهرين من توقف الحقن (3 فئران)	$10 \times 28,5 \pm 3,9$ نطفة
12	بعد توقف الحقن مباشر (3 شواهد)	$10 \times 28,6 \pm 1,60$ نطفة
13	بعد شهر واحد من توقف الحقن (3 فئران شاهدة)	$10 \times 27,39 \pm 2,34$ نطفة
14	بعد شهرين من توقف الحقن (3 فئران شاهدة)	$10 \times 29,5 \pm 2,2$ نطفة



المخطط (3) تأثير جرعة الميتوتركسات في تعداد النطاق في خصية الفأر اليسرى وببريخها عند الحيوانات الشاهدة والمحقونة (10ملغ/كغ تراكمي). بالنسبة إلى مدلولات الأرقام يرجع إلى الجدول السابق

المناقشة

يشكل حساب معدل البقاء survival إثر الحقن المتكرر للميتوتركسات دليلاً معبراً عن خطر هذه المادة على حياة الكائنات الحية ولاسيما عند استخدام جرعات عالية. لم تمت الفئران بعد الحقن الأول بتركيز 15 ملغ/كغ، وبقيت المجموعة الحيوانية بحالة سليمة، ولكن عندما تكرر الحقن على مدى عدة أسابيع وبمعدل حقنتين أسبوعياً بدأت الفئران بالموت (المخطط 1). فكلما زاد عدد الجرعات المتتالية مع الزمن زادت أعداد الحيوانات الميته. تتوافق هذه النتيجة مع النتائج التي استخدمت فيها جرعات متزايدة التركيز من مادة الميتوتركسات حقنت فيها فئران بيضاء، وكانت خلاصة هذه الدراسة أن موت الفئران كان عند استخدام جرعات عالية التركيز 250 ملغ/كغ وما فوق (حيث ماتت جميع الفئران)، بينما تركزت الجرعة الميته (LD 50) بين الجرعتين 50 و100 ملغ/كغ (10) كما يشير إلى ذلك باحث آخر (6). أي إن التأثير التراكمي للميتوتركسات باستخدام 15 ملغ/كغ يعادل استخدام جرعة واحدة تفوق الـ 250 ملغ/كغ.

في التجربة الثانية التي استخدم فيها تركيز 10 ملغ/كغ (بمعدل حقنتين أسبوعياً) وعلى مدى عدة أسابيع كانت الجرعات التراكمية متحملة ولم يحدث الموت إلا في حالات نادرة تكاد لا تذكر، وقد مكنت هذه الجرعة الملائمة من متابعة العمل التجريبي.

أوضحت الدراسات حول التأثير التراكمي لمادة الميتوتركسات المطبقة في الفئران ظهور هذا التأثير خلال 28 يوماً عبر عنه بانخفاض في وزن جسم الحيوان (مقارنة بالحيوانات الشاهدة)، وحدث سمية خلوية في أجهزة الجسم الأخرى تطل خلايا الكبد والرئة (11)، إذ يسبب الميتوتركسات ضغطاً تأكسدياً مولداً للسمية Genotoxicity في أمعاء الجرذ تظهر على شكل التهابات وتبدلات نسيجية وصولاً إلى التمثول الخلوي Apoptosis، ويمكن تحسين أثر السمية بتناول الحمض الدهني α -lipoic acid (12).

تتناقص أوزان الخصى تدريجياً خلال المراحل التجريبية كلما زاد عدد مرات الحقن (بجرعة 10 ملغ/كغ مرتين في الأسبوع وعلى مدى 6 أسابيع) (التجربة الثانية). ويمكن أن يفسر هذا النقص في الوزن بازدياد أذيات الميتوتركسات على تشكل النطاف والنقص في عددها، وذلك من خلال سمية المادة وتأثيرها المعاكس لحمض الفوليك Folic acid. فنقص وزن الخصى يتماشى مع نقص عدد النطاف.

يتضح أثر سمية الميتوتركسات في الخلايا المنشئة germ cells (الخلايا المشكلة للنطاف) خاصة، وهذه السمية يمكن قياسها بالتبدلات التي تحدث في وزن الخصية إذ يترافق نقص الوزن مع انخفاض تكون النطاف إثر شذوذات تحدث في الخلايا المنوية الأولية Primary spermatocytes (مرحلة مهمة من تطور السلالة المنوية) مما يؤدي إلى نقص في عدد النطاف وذلك بعد 4 أسابيع من بدء المعالجة، ويظهر تشوه كبير في شكل النطاف بعد 8 أسابيع من بدء المعالجة (13).

يبدأ تناقص عدد النطاف في الخصية بعد الأسبوع الأول (أي بعد حقن بتركيز 10 ملغ/كغ)، ثم يأخذ العدد بالتناقص كلما زادت الجرعة تراكمياً ويصل النقص حده الأعظمي بعد الحقن التراكمي 10 (بعد الأسبوع الخامس). و يوضح هذا أن الاستخدام المديد للميتوتركسات (في أثناء معالجة السرطان) يكون له تأثير مؤذ في خصوبة الرجل يتمثل بانخفاض كمية القذف (تقدر بـ 50%) وانخفاض في عدد النطاف (ملاحظات تشخيصية) وتشكلها يرجع إلى تباطؤ في سرعة انقسام خلايا السلالة المنوية المشكّلة للنطاف (14). وقد وجد أيضاً أن معالجة سرطان الخصية Testicular cancer يمكن أن توقف إنتاج النطاف مؤدية إلى إحداث أذيات وتخریب كيمي وكيمي في النطاف تكون حصيلته العقم وتشوه النطاف وتخریب مادة الـ DNA (15). كما أن معالجة الأطفال المصابين بابيضاض الدم اللمفي (المعالجة الشعاعية) يكون لها تأثير مشابه لما تحدثه مادة الميتوتركسات، أي يسبب العقم لدى الأطفال، وتكون شدة الإصابة أو ضعفها حسب المرحلة العمرية، ويظهر العقم عندما يصبح الطفل رجلاً (16).

وجد أن معالجة الرجال المصابين بداء الصدف والسرطان بالميتوتركسات (مضاد حمض الفوليك) تؤدي إلى كبح عدد من الحموض الأمينية (مثل السيرين serine والميثيونين methionine) وتعطيل تركيب الـ DNA والبروتين، وتقود خلايا السلالة المنوية إلى الموت أو التوقف عن الانقسام (أي توقف تشكل النطاف) ويحدث نتيجة المعالجة المديدة بهذا العقار انخفاض كيمي وكيمي في النطاف بعد 12 إلى 14 يوماً من الحقن (17).

يبدأ ظهور البراء Recovery في هذه التجربة في المراحل الأخيرة من الحقن، ربما بسبب تكيف الحيوان مع المادة الدوائية، ولكن يتضح هذا البراء بعد التوقف عن الحقن التراكمي لمادة الميتوتركسات، ويكون أكثر وضوحاً بعد شهرين من هذا التوقف. يتمثل هذا البراء (أو الشفاء) بعودة الخصى إلى وزنها الطبيعي بعد أن تناقص وزنها تدريجياً بازدياد عدد مرات الحقن (بالجرعات ذات التركيز 10 ملغ/كغ) بالمقارنة مع المشاهد. وغالباً ما يزيد وزن الخصى لدى هذه الفئران المحقونة عن وزن خصى الحيوانات الشاهدة، ويمكن تفسير ذلك بزيادة عمر الحيوان بعد 4 أشهر من بدء التجربة.

أكد بعض الباحثين أن المعالجة بالميتوتركسات (المعالجة الكيميائية chemotherapy) يمكن أن تسبب خللاً في تشكل النطاف spermatogenesis يلحقه نقص في وزن الخصية ووزن الجسم، ويلاحظ نقص في قطر الأنبوب المنوي مع ثخانة في الظهارة المنشئة لجدار الأنبوب، كما يؤثر ذلك في تركيز هرمون التستستيرون لدى الجرذ. ويجد هؤلاء الباحثون أن معالجة الجرذان بهرمون النمو GH بعد استخدام الميتوتركسات يمكن أن يكسب الحيوانات البراء بعد 14 إلى 28 يوماً من بدء العلاج (18). ونشير في تجربتنا هذه إلى التحري عن البراء تبعاً لتعداد النطاف في الخصية إلى أن نقص أوزان الخصى قد ترافق بنقص في عدد النطاف بعد حقن تراكمي استمر لـ 5 - 6 أسابيع بتركيز 10 ملغ/كغ، ورغم ذلك فقد أخذت الحيوانات تتماثل للشفاء (أو البراء) بعد

شهرين من التوقف عن الحقن، حيث عاد التعداد إلى ما هو عليه عند الشاهد تقريباً. يمكن تشبيه الحقن المتكرر الذي اتبعناه بالاستخدام المتعدد لعقار الميتوتركسات المستخدم عند مرضى السرطان وغيره من الأمراض البشرية.

يحدث الميتوتركسات إذا عقم مؤقتاً لدى الإنسان، ثم يتمثل للشفاء بعد مدة قد تطول أو تقصر، وقد يحتاج الأمر إلى اتباع معالجة هرمونية تلي الاستخدام المتعدد للعقار وفق ما يتطلبه الوضع الصحي للشخص (14). إن المعالجة الكيميائية والإشعاعية Radiation therapy للرجال المصابين بسرطان الخصية testicular cancer تؤدي إلى انخفاض كبير في عدد النطاف، وقد يؤدي الأمر إلى فقدان كلي للنطاف aspermia مع مرور الوقت (عقم كامل)، وتختلف مدة البراء (بين حالة عقم آني أم دائم)، ففي حالة العقم الآني يحتاج البراء إلى عدة أشهر حتى سنة. أما في حالة العقم الدائم فيحتاج البراء إلى عدة سنوات (5 سنوات) (19) (20).

ويرى آخرون أن معالجة رجال مصابين بسرطان الخصية المعتمدة كلياً على المعالجة الكيميائية أو الكيميائية - الإشعاعية (وتحديداً المعالجة عن بعد) يمكن أن يحصل لديهم براء وتتشكل لديهم النطاف، أما في حال المعالجة الإشعاعية (القريبة) فإن هؤلاء الرجال يفقدون النطاف بشكل دائم (21).

تؤثر المعالجة الكيميائية في عمل الغدد الخلاقية الخصوية (خلايا ليديك) فضلاً عن خلايا سيرتولي (الخلايا المغذية والمساعدة على تشكل النطاف) محدثة عقمًا بنسبة 30-50% من عدد الرجال المعالجين (22).

ويوضح بعض الباحثين أن المعالجة بالميتوتركسات لها تأثير في وظيفة الخصية (وظيفة تشكل النطاف) بشكل غير مباشر عن طريق إحداث خلل في الهرمونات الجنسية المؤثرة في تشكل النطاف مثل FSH و LH والتستسترون، ويحدث البراء بعد العقم الآني بعد سنة من بدء المعالجة (23).

توصل باحث آخر (14) إلى أن البراء من تأثير المعالجة بالميتوتركسات يحدث بعد 6-12 شهراً، ويرى أيضاً أن المعالجات الكيميائية بـ 20 عقاراً كيميائياً تؤثر بالفعل في خصوبة الرجال، ويختلف زمن البراء من العقم من عقار إلى آخر، فبعضها يحتاج إلى سنة وبعضها الآخر يحتاج إلى عدة سنوات، كما يرى الباحث ضرورة استخدام بعض الهرمونات مثل الإستروجين والأندروجين وغيرها، إذ إن استخدام مثل هذه الهرمونات يمكن أن يحقق نجاحاً وأن يعيد الأمل بالبراء والخصوبة.

يرى بعض الباحثين إمكانية تخفيف السمية عن الخلايا المنشئة (المشكلة للنطاف) بإعطاء المريض جرعات من حمض الفوليك Folic acid لمنع تشوه النطاف وتجنب تأثير الميتوتركسات في العقم (5).

المراجع REFERENCES

- 1-French, A. E., and Koren, G. (2003). Effect of Methotrexate on male Fertility. Canadian Family physician, vol.49,issue 5, 577-578.
- 2-Balk, R. A. (2011). Methotrexate-induced lung injury. Uptodate Marketing profesional. 19.1(ecappo6 vtd.com-84/137 200.56 FFCi D9C76-14.
- 3-Padmanabhan, S., Tripathi, D. N., Vikram, A., Ramarao, P. and Jena, G. B. (2008). Cytotoxic and effects of methotrexate in germ cells of mice. Copyright © Elsevier B. V. All right reserved. Vol. 655, issue 1-2.
- 4-Molloy, A. M. (2003). Folate bioavailability and health. Int. J. Vitam. Nutr Res. 72(1):46-52.
- 5-Fitzakerley, J. (2011). Antineoplastic. A-Folic acid analogues: Methotrexate, Pemertexed. Prevent DNA/ Antimetabolites Folic acid analogues/ Mechanism. Univ. of Minuesota Medical school.. Duluth/Las modified 3-mar 11 4:28 PM.
- 6-Padmanadbhan, S., Tripathi, D. N., Vikram, A., Ramarao, P. and Jena, G. B. (2009). Methotrexate-induced cytotoxicity and Genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic acid. Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, vol. 673 issue 1,19 43-52.
- 7-Threlkeld, D. S. ed. (1990). Antineoplastic, Antimetaboites. Methotrexate. In Facts and comparisons Drug Information. St. Louis Mo. Facts and comparison .653-654.
- 8-Hales, B. F. and Robaire, B. (2010). The male germ cell as a Target for Toxicants Comprehensive chapter. 11.06,115-129.
- 9-Magelssen, H., Brydoy, M., and Fossa, S. D. (2006). The effect of cancer and cancer Treatments on male Reproductive Function physiology of male Fertility. Nat.Clin Pract. Urology ,3(6): 212-322.
- 10 - بصل مصطفى. (2006). تأثير جرعات متزايدة من الميتوتركسات (معاكس حمض الفوليك) في إنتاج النطاف عند ذكور الفأر. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية-مجلد (22) - العدد الأول.
- 11-Kushwaha, S., Tripathi, D. N., Vikram, A., Ramaro, P., Jene, G. B. (2010). Repeated dose Oral toxicity test in mice: A practical Approach for test integration. Reulatory Toxicology and pharmacology. Vol. 58, issue 1,145-154.
- 12-Dadhania, V. P., Tripathi, D. N., Vikram, A., Ramaro, P., Jene, G. B. (2010). Intervention of α -lipoic acid ameliorates methotrexate- induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rate intestine. Chemico-Biological interaction, vol. issue 1,5:85-97.
- 13-Choudhury, R.C., Ghosh, S. K., Palo, A. K. (2001). Potential transmission of the cytogenetic toxic effects of Methotrexate in male germline cells of swiss mice .Environmental Toxicology and pharmacology. Vol.10 ,issue, 3: 81-88.
- 14-Turek, P. (2011). Male Fertility preservation. Optimized website Design by fertility. Marketing the Turek Cilnic. com.
- 15-DLDowney, A. (2008). Abc's of Male infertility. A rticlesbase. Free online article Directory comment : 0 I View: 1, 349.

- 16-Byrne, J., Fears, T. R., Mills, J. I., Zeltzer, L. K., Shlar, C., Meadows, A. T., Reaman, G. H., Robison, L. L. (2003). Fertility of long-term male survivor of acute Lymphoblastic leukemia diagnosed during Childhood. Article first publ. Online: 18 DOC:10, 1002/phc. 1044 Vol.42, 364-372.
- 17-Frend, A. E., Koren, G., Frepc, M. D. (2006). Effect of Methotrexate on male fertility. Clinical challenge Motherisk update. The collage of Family physicians of Canada 2630 Skmark. Ave Mississange.
- 18-Nouri, H. S., Azami, Y., Moyathedin, M. (2009). Effect of grow hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rate. Islamic Azad .Univ. Tabriz Iran. 4(2):105-110.
- 19-Howell, S. J. and Shalet, S. M. (2005). Spermatogenesis after cancer Treatment Damage and Recovery. J. of National cancer institute Monographs N°34.
- 20-Kanthrow, M. (2009). Cancer treatment and infertility. American Fertility Association (AFA) WW.cancerpoint.com .
- 21-Shamberger, R. C., Sherins, R. J., Rosenberg, S. A. (1981). The effect of postoperative adjuvant chemotherapy and radiotherapy on testicular function in men undergoing treatment for soft tissue, Sarcoma cancer. Medline 47: 2368-2374.
- 22-Efsthiou, E., and Logothetis, C. J. (2006). Review of late complication of treatment and relapse in testicular cancer. Pubmed. gov. J. Natl. comp. canc. Netw 4(10): 1059-1076. Univ. Of texas ,U.S.A.
- 23-Pectasides, D., Pectasides, E., Papaxoinis, G., Kondra, M., Gerostathou, M., Karageorgpoulow, S. Kamposioras, C., Tountas, N., Koumarianow, A., Psyrria, A., Macheras, A. and Economopoulos, G. (2009). Testicular Function in poor-Risk nonseminomatus Methotrexate, paclitaxed, ifosfamind, and Cisplatin combination chemotherapy. Journal of Andrology Vol. 30 N°3. American Society Andrology.