تأثير جرعات متزايدة من الميثوتركسات (معاكس حمض الفوليك) في إنتاج النطاف عند ذكور الفأر

مصطفى بصـ ـل

قسم البيولوجيا الحيوانية ـ كلية العلوم ـ جامعة دمشق ـ سورية

تاريـخ الإيداع 2005/09/15
قبل للنشـر في 2005/12/08

الملخص

جربت جرعات متزايدة من مادة الميثوتركسات Methotrexate (25 mg /kg، 50 mg /kg، 100 mg /kg، 150 mg / kg، 200 mg / kg، 250 mg / kg، 300 mg / kg)، بحقنـة عـضلية intramuscular واحدة على الفأر من سلالة Swiss، وقدرت الفاعلية التكاثرية بتعداد عام للنطاف وحركيتهـا فـي كامـل الخصية اليسرى وبربخها بعد (15) يوماً من الحقن. كما أخذت أوزان الخصى وبربخها للحيـوانات فـي الجرعات المختلفة.

تشير النتائج إلى أن الميثوتركسات المعاكس لحمض الفوليك يؤثر سلبياً في إنتاج النطاف وبـصورة متناسبة مع الجرعة. كما تبين أن الجرعات العالية (200 mg / kg) تؤدي إلى حالة مـن قلـة النطـاف oligospermia .

ويقدر أن الميثوتركسات قد أدت إلى تثبيط الفاعلية التكاثرية للخلايا المكونة للنطاف وإلى نوع مـن السمية الخلوية cytotoxicity في الجرعات العالية. ويتطلب فهم ذلك دراسات أخرى.

الكلمات المفتاحية: سمية الميثوتركسات، العقم، الخصية، الفأر.

The effect of increasing doses of Methotrexate (Folate Antagonist) on sperm production in male Mouse

Mostafa Bassal

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

Received 15/09/2005
Accepted 08/12/2005

ABSTRACT

Increasing intramuscular doses of Methotrexate (25 mg / kg, 50 mg / kg, 100 mg / kg, 150 mg/ kg, 200 mg / kg, 250 mg / kg, 300 mg / kg) were tested on Swiss strain Mouse by intramuscular injection. The reproductive potency was evaluated by total sperm count and movement of the left testis and it's epididymis (15) days after injection. The weights of the latter of all tested animals were registered.

The result indicate that Methotrexate, a Folate antagonist, is a negative factor for sperm production in a dose related manner. It was evident that the high doses (ex. Dose 200 mg / kg) lead to oligospermia. It was concluded that Methotrexate inhibits the reproductive potency during spermatogenesis and causes cytotoxicity in high doses. Further investigations are needed.

Key Words: Methotrexate toxicity, infertility, testicle, Mouse.

المقـدمة

يعد حمض الفوليك Folic acid من مجموعة الفيتامينات B(B9)، ويتألف مـن حلقـة بتيريدين pteridine مرتبطة بالحمض بارا أمينوبنزويك Para – Amino Benzoic Acid (PABA) المقترن بمجموعة غلوتامات Glutamate أو أكثر[1]. والـشكل الـسائد لهـذا الحمض في البلاسما الدموية هو:

5 – Methyl tetrahydrofolate (5 – Methyl THFA). ويمكـن نقـل مجموعـة الميثيل منه في الخلية لإشراكها في تفاعلات المثْيلة Methylation فيتحول إلى (THFA) الذي يشترك في العديد من التفاعلات الأنزيمية اعتمادية الفولات [2]، ويتطلب هذا القلـب إلى (THFA) مركب الكوبالامين Cobalamine (فيتامين B12). ويؤدي (THFA) دوراً مفتاحياً في نقل وحدات وحيدة الكربون مثل: ميثيل، ميثيلين، فورميل إلى ركائز أساسـية ذات علاقة بتركيب الـ: DNA، RNA، وبروتينات، وغيرها [3]. ونظراً لهذه الأهميـة الاستقلابية تنصح منظمات صحية مثل إدارة الغذاء والدواء الأمريكيـة (FDA) بتنـاول الفرد نحو (400) ميكروغرام من حمض الفوليك يومياً، وهو متوافر ولاسيما فـي أوراق النباتات الخضراء وعصير الحمضيات والبذور وغيرها.

ولقد تبين، من جهة ثانية، أن الإهمال في تناول حمض الفوليك أو الامتناع عن تناوله يؤدي إلى حالة مرضية ترتبط بعوزه Folic Acid Deficiency من أهم أعراضها: تراكم الصفيحات الدموية وتشكل خثرات دموية، وتبدل بطانـة الأوعيـة الدمويـة وعـضليتها وحدوث أزمات قلبية، وتشوهات عصبية جنينية، وانخفاض معدل تكاثر الخلايا المولـدة، وفي الحالات المزمنة الحادة يظهر النحول وفقدان الـشهية والإقيـاء والـصداع علـى المريض، مع سمية خلوية Cytotoxicity كبيرة في عدة أعضاء، بما فـي ذلـك الكبـد والكلية والرئة [4,5].

كما تبين أن عوز حمض الفوليك يترافق بارتفـاع معـدل حمـض الهوموسيـستيئين Homocysteine فـي البلاسـما الدمويـة [3,4]، إذ إن أنزيمـاً يـدعى Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) يقوم بنقل مجموعة الميثيل إلـى جزيء الهوموسيستيئين ليتكون الحمض الأميني ميثيونين L – Methhionine، ويقوم هذا الأخير بدوره بنقل مجموعة الميثيل هذه إلى مركبات وسيطة أخرى مـن أجـل تـصنيع مركبات حيوية متنوعة. وبعـوز حمـض الفوليـك يقـل مـصدر الميثيـل ويتـراكم الهوموسيستيئين.

وتبين أيضاً أن الخلل بنقل مجموعة الميثيل نتيجة عوز الفولات يؤدي إلـى اندسـاس أساس اليوراسيل Uracil بدلاً من الثايمين Thymine في DNA الخلايا التي تقوم بتركيب الـ: DNA (الخلايا المتكاثرة) أو بترميمه[3] (الخلايا المتمايزة الوظيفية)، الأمـر الـذي

يؤدي إلى حصول أذيات في شريطَي جزيء الـ: DNA تؤدي في الحالات الحادة إلـى تكسرات أحادية أو ثنائية الشريط فيه، ومن ثم تكسر الصبغيات.

لقد بنيت فكرة هذا البحث على إحداث عوز حمض الفوليك بطريقة تجريبيـة، وذلـك بحقن حيوان التجربة (الفأر) بمركب الميثوتركسات Methotrexate الذي يعمل عمل مثبط تنافسي Competitive inhibitor بفضل تماثله في البناء الجزيئي لحمض الفوليك، والذي يصبح هكذا هدفاً لأنزيم إرجاع (MTHFR) يحوله إلى الـشكل الفعـال (THFA). وقـد اخترنا للتحري عن هذا التأثير المنسليات النطفية spermatogonia (أمهات النطاف) التي تعد كخلايا جذعية stem cells بتقصي نتاج هذه الخلايا وهو النطاف sperms. ومعروف أن الميثوتركسات هي من بين أولى العقاقير الفعالة في معالجـة اللوكيميـا والليمفومـا، وغيرها من أشكال السرطانات، وقد تم اصطناعها في عام 1949، وكانـت فعالـة جـداً بوصفها مضادة للفولات عند الجرذان، ومن ثم كانت ناجعة في تراجع اللوكيميـا، وفـي العام نفسه ظهرت فاعليتها عند الفئران في تراجع اللوكيميا، ومن ثم استخدمت لمعالجـة هذا المرض عند الأطفال. كما أنه معروف أيضاً أن الميثوتركـسات يـستخدم بوصـفه عقاراً في معالجة الكثير من أمراض المفاصل، كالتهاب المفاصل الرثياني Rheumatoid Arthritis (RA) الشائع الانتشار، ويصنف مع عدد آخر من المركبات التي تثبـت أنهـا معاكسات الفولات Folate Antagonists ضمن مجموعة العقاقير المـضادة للاسـتقلاب Antimetabolites [4,6].

وفي هذا البحث جربت جرعات متزايدة من الميثوتركسات على حيوانـات التجربـة، بدءاً من الجرعات المحمولة القابلة للتصحيح إلى الجرعات التي أدت إلى سـمية خلويـة غير عكوسة.

مواد البحث وطرائقه

1 ـ حيوانات التجربة:

استخدم في هذا البحـث (81) فأراً ذكراً صحيحاً أبيض من السـلالة السويـسـرية Swiss strain، بالغة جنسياً بعمر نحو (20) أسبوعاً، ووزن يتراوح بين (28.2) غرامـاً و(33.2) غراماً للفأر الواحد، ربيت في حظيرة حيوان قسم الأنسجة والتشريح والجنـين في كلية الطب بجامعة دمشق، وزعت على أقفاص مزودة بقوارير ماء خاصـة وبعلـف خاص (خليطة مديرية الأعلاف التابعة لوزارة الزراعة)، وتم تـوفير وسـائل النظافـة والتدفئة والتكييف للحظيرة، وروقبت الفئران يومياً طيلة فترة التجربة.

2 ـ جرعات الميثوتركسات Methotrexate:

استخدمت مادة الميثوتركسات على شكل محلول بعبوات سعة ml (5) تحتوي على mg (50) من مادة الميثوتركسات، صنع شركة: (EBEWE Azneimittel Ges.m.b.H – Austria) جلبت من الصيدلية المركزية في دمشق (أي أن التركيز الأولي كان 10 mg / ml). مدد محلول الميثوتركسات الأولي بمحلول كلور الصوديوم (0.15M Na Cl) أو بالمصل الملحي (0.9 % Na Cl)، وحضرت من المحلول الناتج محاليل ميثوتركسات بتراكيز (25، 50، 100، 150، 200، 250، 300) ملغ لكل واحد كيلو غرام من وزن حيوان التجربة.

3 ـ إجراء التجربة:

وزعت حيوانات التجربة على (9) أقفاص، وضع في كل منها (9) حيوانات:

أ ـ قفص واحد للشاهد control الأول، حيث لم تحقن الحيوانات بأي شيء.

ب ـ قفص واحد للشاهد الثاني، حيث تم حقن كل حيوان حقنة واحدة من السواغ (0.9 % Na Cl) بمعدل (1 ml) لكل حيوان.

ج ـ (7) أقفاص لجرعات الميثوتركسات المبينة أعلاه، إذ حقن كل حيوان من كل مجموعة في كل قفص حقنة واحدة من محلول الميثوتركسات (الجرعات من 25 إلى 300 ملغ / كغ) ممددة بالسواغ إلى (1 ml).

وقد كانت الحيوانات توزن بدقة قبل حقنها لتحديد الجرعة المناسبة، حيث تم حقنها في عضلتي الفخذ، مع مراعاة شروط التعقيم قدر الإمكان.

تركت الحيوانات (المجموعات التسع) في الأقفاص مدة (15) يوماً بعد الحقن، وروقبت يومياً لتسجيل الوفيات التي غالباً ما كانت تحصل في الأسبوع الأول فقط، ولاسيما في اليوم الثالث من الحقن، في حين لم تحصل وفيات خلال الأسبوع الثاني. وضحيت في اليوم الخامس عشر بقطع النخاع الشوكي بالضغط على منطقة الرقبة، وأجريت الأعمال الآتية:

أ ـ وزن كل خصية يسرى مع بربخها عند استئصالها.

ب ـ تعداد النطاف في كامل الخصية مع بربخها، وحساب نسبة النطاف المتحركة.

ج ـ حساب وفيات حيوانات التجربة، وحساب البقيا survivers للحيوانات الشاهدة والمعالجة بمختلف الجرعات طيلة فترة التجربة (15) يوماً.

ولعزل النطاف من الخصية والبربخ، نزع الغلاف الأبيض (tunica albuginea) للخصية اليسرى، وقطعت مع البربخ إلى قطع صغيرة، ووضع الناتج في بيشر يضاف إليه محلول كلور الصوديوم (0.15 M Na Cl) حتى حجم ml (20)، وجونس homogenized باستخدام مجانس homogenizer خاص

(K – RW 10R) مدة دقيقة واحدة وبسرعة دوران عظمى (10 دورات في الثانية)، بعـد تغطية البيشر بورق السلوفان، ليتم الحصول على خليط متجانس homogenous، بحيـث تتوزع النطاف في الجناسة homogenate على نحو متساوٍ[12].

يتم التعداد مباشرة تحت المجهر الضوئي وبالتكبير المناسب، لقطرة من الجناسة بعـد تحريكها جيداً، وباستخدام تقانة التعداد الدموية التقليدية conventional hemocytometer technique، وقدرت نسبة النطاف المتحركة. وقدر كامل عدد النطاف في خصية كاملـة مع بربخها بتقدير عدد النطاف في ($1mm^3$) من صفيحة التعداد، ومن ثم تم حساب عـدد النطاف في حجم (20 ml) من الجناسة الكاملة للخصية وبربخها.

أجري التعداد وتقدير نسبة النطاف المتحركة لثلاث عينات من الجناسة، وفـي أربـع ساحات مجهرية من صفيحة التعداد لكل عينة، وحسبت المتوسطات.

غالباً ما كانت النطاف تظهر كاملة دون نقص، وفي حالات نادرة كانت رؤوسها تُرى فقط مفصولة عن أذيالها، ولذلك عدت النطاف الكاملة والرؤوس المنفصلة على حد سواء، وأغفلت الذيول في حال وجودها.

وضعت الخصية اليمنى لكل حيوان من حيوانات المجموعات التسع في مثبـت بـوان Bouin، وحضرت للمقاطع النسيجية البارافينية لدراستها في بحث لاحق.

النتـائـج

يمكن ترتيب النتائج التي حصل عليها كما يأتي:

1 ـ التأثير في البقيا:

كانت نسبة بقيا حيوانات التجربة خلال فترة التجربة (أسبوعين)، مقارنة مع الـشاهد كما يأتي:

- الشاهد الأول (الحيوانات التي لم تحقن بشيء): بقيت جميع حيوانـات التجربـة لهـذه المجموعة (9 حيوانات) حية طيلة فترة التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت(% 100).
- الشاهد الثاني (الحيوانات المحقونـة بالـسواغ): بقيـت جميـع حيوانـات التجربـة (9 حيوانات) حية طيلة فترة التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت (% 100).
- الجرعة 25 mg / kg: بقيت جميع الحيوانات حية أيضاً (9 حيوانـات) طيلـة فتـرة التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت (% 100) أيضاً.
- الجرعة 50 mg / kg: ماتت (3) حيوانات من أصل (9) خلال الأسـبوع الأول مـن التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت (% 66.7).
- الجرعة 100 mg / kg: ماتت (6) حيوانات من أصل (9) خلال الأسبوع الأول مـن التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت (% 33.3).

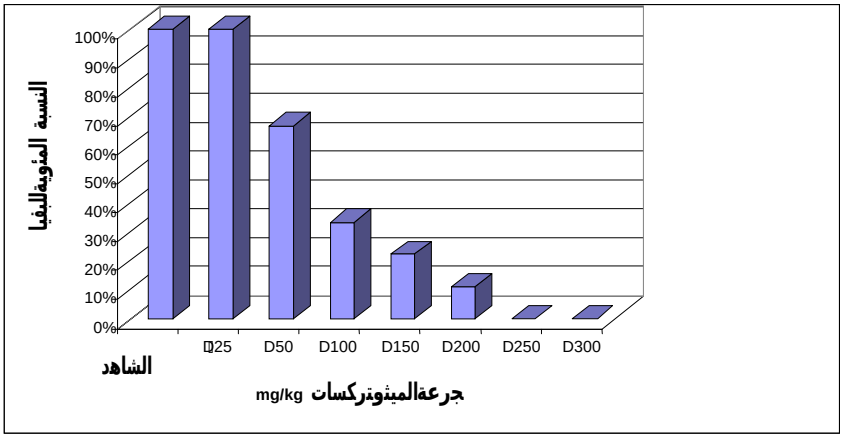
ـ الجرعة 150 mg / kg: ماتت (7) حيوانات من أصل (9) خلال الأسبوع الأول من التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت (22.2 %).

ـ الجرعة 200 mg / kg: ماتت (8) حيوانات من أصل (9) خلال الأسبوع الأول من التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت (11.1 %).

ـ الجرعتان 250 mg / kg و 300 mg / kg: ماتت جميع الفئران خلال الأسبوع الأول من التجربة، أي أن نسبة البقيا كانت (0 %).

هذا ولم تبدِ الحيوانات التي بقيت حية في الشاهد أو المعالجة بجرعات متزايدة أيـة تبدلات تشريحية ظاهرة للعيان في أثناء تشريحها.

ويمكن تلخيص النتائج التي حصلنا عليها بخصوص البقيا في التمثيل البياني (المنَسج histogram) الموضح بالشكل (1):



الشكل (1) تأثير الميثوتركسات في نسبة البقيا للفئران الشاهدة والمحقونة بالميثوتركسات بجرعات متزايدة بعد 15 يوماً من الحقن

2 ـ التأثير في وزن الخصية والبربخ:

وزنت حيوانات التجربة، وحسب متوسط وزنها لكل مجموعة، وتراوحت المتوسطات من (28.2 ± 3 g) إلى (33.2 ± 1.7 g)، وبذلك فهي حيوانات على درجة جيدة من التجانس من حيث الوزن والعمر.

استؤصلت خصيتا كل حيوان مع بربخها بعد (15) يوماً من الحقن، ووزنتا، واستعملت اليسرى منهما لتعداد النطاف وتقدير حركيتها كما ورد في فقرة المواد والطرائق، وتركت اليمنى للدراسة النسيجية في بحث لاحق. ولا بد من التنويه هنا إلى أن

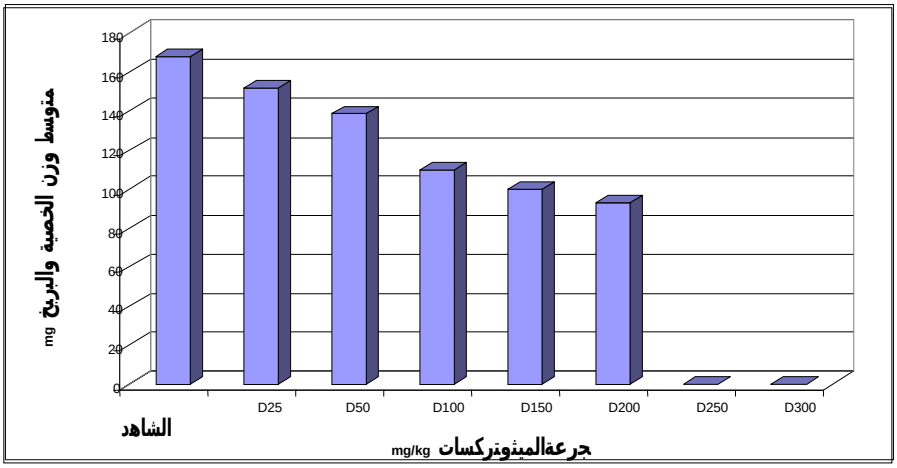
النتائج جميعاً للشاهد الأول (الطبيعي) وللشاهد الثاني (المحقونة بالـسواغ فقـط) كانـت متشابهة لدرجة كبيرة بحيث جمعا معاً في شاهد واحد.

وتبين انخفاض متوسط وزن الخصية ويربخها بازدياد الجرعة كما في الجدول (1).

الجدول (1) متوسط وزن الخصية ويربخها للفئران الشاهدة والمحقونة بالميثوتركسات بجرعات متزايدة بعد 15 يوماً من الحقن

المجموعة	متوسط وزن الخصية ويربخها
الشاهد	168 ± 21 mg
الجرعة 25 mg / kg	152 ± 12 mg
الجرعة 50 mg / kg	139 ± 13 mg
الجرعة 100 mg / kg	110 ± 10 mg
الجرعة 150 mg / kg	100 ± 10 mg
الجرعة 200 mg / kg	93 ± 5 mg
الجرعتان 250 mg / kg 300 mg / kg	لا بيانات لأن الحيوانات لم تبق حية حتى اليوم (15)

ويمكن تلخيص النتائج التي حصلنا عليها بخصوص تأثير الميثوتركسات فـي أوزان الخصى والبربخ في التمثيل البياني الموضح بالشكل (2):



الشكل (2) تأثير الميثوتركسات في متوسط وزن الخصية والبربخ (بالنـسبة لـوزن الحيـوان الشاهد) للفئران المحقونة بجرعات متزايدة بعد 15 يوماً من الحقن

3 ـ التأثير في عدد النطاف وحركيتها:

عدت النطاف وقدرت حركيتها لخصية كاملة مع بربخها لكل حيوان من حيوانات التجربة في اليوم (15) بعد بدء التجربة، وكانت متوسطات التعداد والانحرافات المعيارية على النحو المبين في الجدول (2).

الجدول (2) متوسط تعداد النطاف في خصية الفأر اليسرى وبربخها للفئران الشاهدة والمحقونة بجرعات متزايدة

المجموعة	متوسط التعداد والانحراف المعياري
الشاهد	$4.5 \pm 32.03 \times 10^6$ نطفة
الجرعة 25 mg / kg	$2.1 \pm 17.8 \times 10^6$ نطفة
الجرعة 50 mg / kg	$1.4 \pm 13.9 \times 10^6$ نطفة
الجرعة 100 mg / kg	$2.3 \pm 11.6 \times 10^6$ نطفة
الجرعة 150 mg / kg	$0.5 \pm 8.1 \times 10^6$ نطفة
الجرعة 200 mg / kg	$1.2 \pm 5.5 \times 10^6$ نطفة
الجرعتان 250 mg / kg و 300 mg / kg	لا بيانات بسبب موت الحيوانات قبل اليوم (15)

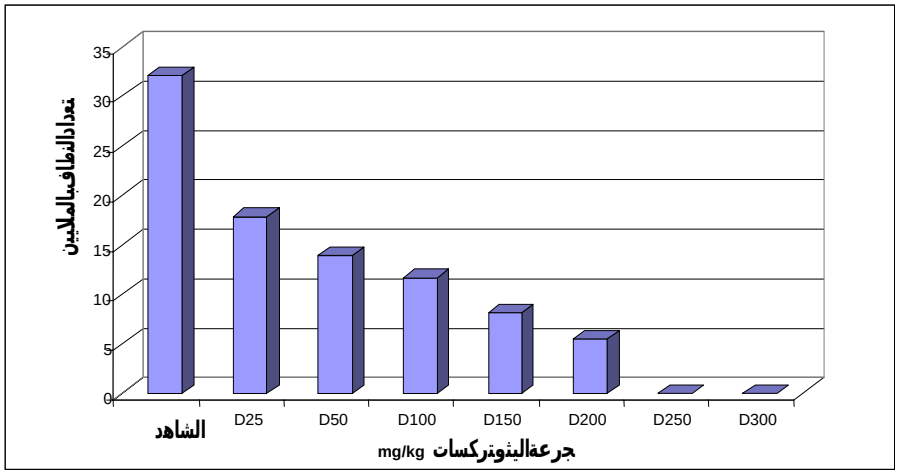
أما متوسطات النسبة المئوية للنطاف المتحركة فكانت على النحو المبين في الجدول (3).

الجدول (3) متوسط النسبة المئوية لحركية النطاف عند الحيوانات الشاهدة والمحقونة بجرعات متزايدة

المجموعة	النسبة المئوية للنطاف المتحركة
الشاهد	4.8 %
الجرعة 25 mg / kg	4.8 %
الجرعة 50 mg / kg	9.8 %
الجرعة 100 mg / kg	4.7 %
الجرعة 150 mg / kg	4.7 %
الجرعة 200 mg / kg	0 %
الجرعتان 250 mg / kg و 300 mg / kg	لا بيانات بسبب موت الحيوانات قبل اليوم (15)

يتضح من البيانات السابقة تناقص تعداد النطاف بتأثير جرعة الميثوتركسات، كما يتضح أن حركية النطاف ضعيفة جداً ومتقاربة إلى حد ما (باستثناء الجرعة 50 mg / kg حيث تضاعفت تقريباً، والجرعة 200 mg / kg حيث انعدمت)، فهناك إذاً تناقص تعداد

النطاف في الخصية وبربخها مع ازدياد جرعة الميثوتركسات. هذا وقد وضـعت نتـائج التعداد بدلالة الجرعة في التمثيل البياني الموضح بالشكل (3):



الشكل (3) تأثير جرعة الميثوتركسات في تعداد النطاف في خصية الفأر اليسرى وبربخها بعـد 15 يوماً من الحقن عند الحيوانات الشاهدة والمحقونة بجرعات متزايدة

كما حسبت نسبة تعداد النطاف بالملايين لكل جرعة تبعاً لوزن الخصية بالميليغرامات:

الجرعة	الشاهد	25	50	100	150	200	250	300
النسبة	0.19	0.117	0.10	0.105	0.08	0.059	ـ	ـ

لوحظ أن تناقص عدد النطاف يتناسب مع تناقص وزن الخصية وبربخها إجمالاً، حيث يتوافق الأثر في تناقص عدد النطاف مع الأثر في تناقص وزن الخصية وبربخها.

المناقشـــة

إن أسهل طريقة لاكتشاف أثر الميثوتركسات المؤدي إلى عوز الفولات هـي حـساب معدل بقيا survivers حيوانات التجربة. وتبين النتائج أن الجرعة (25 mg / kg) كانـت جرعة متحملة لم تؤدِ إلى وفيات في الحيوانات، وبدءاً من الجرعة (50 mg / kg) لـوحظ تزايد الوفيات مع ازدياد الجرعة، حتى نفوق جميع الحيوانـات فـي الجرعـات العاليـة (الجرعة 250 mg / kg وما فوق). ومن هذه النتائج يمكن تقـدير أن الجرعـة المميتـة

لنصف حيوانات التجربة (LD_{50}) تقع بين الجرعتين (50 – 100 mg / kg). ونظراً لقلة عدد حيوانات التجربة (9 فئران ذكوراً لكل خط تجريبي)، فإن هذا التقدير يحتاج إلى تجربة أخرى يستعمل فيها عدد أكبر من الحيوانات لمعالجتها بجرعات متدرجة في تزايدها بين القيمتين (50 mg / kg) و(100 mg / kg)، وإن نفوق الحيوانات ناتج عن الآثار المرضية لعوز الفولات كما ذكر في المقدمة، وهي آثار معممة تصيب عدة أعضاء، كالكبد والكلية والرئة [5, 4].

وتشير النتائج إلى ثبات أوزان حيوانات التجربة بازدياد الجرعة مقارنة مع الشاهد، وكان من المتوقع انخفاض هذه الأوزان بظهور الأعراض المرضية لمتلازمة عوز الفولات Folate Deficiency Syndrome المحرض بالميثوتركسات. وربما كانت فترة التجربة (15) يوماً غير كافية لظهور هذه الأعراض، على الرغم من وضوح التأثير السام بالجرعات العالية المتمثل بانخفاض معدل البقيا.

بيد أن أوزان الخصى في النقاط التجريبية أبدت انخفاضاً ملحوظاً بازدياد جرعة الميثوتركسات، ويمكن تفسير هذا الانخفاض بتأثير عاملين [3,6,7]: ازدياد التأثير في تكوين النطاف عن طريق التأثير في الانقسامات الخلوية، وازدياد الأثر المؤذي والسام على كامل الجسم لحيوانات التجربة والمتجسد بمعدلات البقيا.

ولا بد من الإشارة هنا إلى أن اختيار اليوم (15) لتعداد النطاف، وحساب المعايير الأخرى، كان بالاعتماد على مدة دورة تكوين النطاف من المنسلية النطفية spermatogonia إلى النطفة الكاملة spermatozoon والتي تدوم نحو (54) يوماً. وتسمح فترة الـ (15) يوماً بإنهاء تمايز النطاف والإقلاع بالانقسام المنصف Meiosis المميز لتكوين النطاف بدءاً من المنسليات النطفية.

ويتمثل الأثر الأكثر وضوحاً لمتلازمة عوز الفولات المحرض بالميثوتركسات في هذه التجربة في تعداد النطاف مقارنة مع الشاهد، إذ انخفض هذا التعداد من (32.03×10^6) نطفة عند الشاهد إلى (17.8×10^6) نطفة للجرعة (25 mg / kg) إلى (5.5×10^6) نطفة للجرعة (200 mg / kg)، ولم تعد نطاف الجرعتين (250 mg / kg و300 mg / kg) بسبب نفوق كل الحيوانات قبل اليوم (15).

أما معيار حركية النطاف، وقيمته منخفضة جداً (بالمقارنة مع حالتها في نطاف القذف الطبيعي)، ومتقاربة في الجرعات (باستثناء الجرعة 50 mg / kg حيث تضاعفت) فليس ذا دلالة في هذه التجربة، على الرغم من الحرص على تماثل سرعة الدوران ومدته في كل عينات الخصى المدروسة في أثناء إجراء عملية التجانس، لتقطّع سياط الغالبية العظمى من النطاف نتيجة المجانسة في الخلاط المجانس. هذا ولم نجد تفسيراً لتضاعف الحركية في الجرعة السابقة الذكر، على الرغم من تأكدنا منها في العينات المدروسة.

ويتضح من هذه الدراسة الأثر المثبط لتكوين النطاف في حالة عوز الفولات المحرض بالميثوتركسات، وتشير الدراسات التجريبية المرجعية الأخرى إلى أسباب محتملـة لهـذا التأثير:

ففي دراسة تجريبية قديمة لعام 1976[8] بعنوان التشوهات الجنينية العصبية المحرضة بعوامل كيميائية مختـارة (أزرق التريبـان، اليوريثـان، الـسيكلوفوسفاميد) بمـا فيهـا الميثوتركسات عند الفأر، وتقدير محصول الحمل، تبين أن نجاح التعـشيش واسـتمرارية حياة الأجنة قد انخفضت إلى 28%، وكان من الصعوبة بمكان تقدير التأثيرات المحرضة بالميثوتركسات بسبب الموت الجنيني embryolethality الناجم عن الجرعة السامة التـي تم حقنها. وعلى الرغم من أنه لم يتم العثور على تشوهات واضحة مرئية علـى الأجنـة التي بقيت حية، إلا أن التأثيرات المشوهة للجملة العصبية لا يمكن استبعادها بأي شـكل من الأشكال. واقترحت بناء عليه بعض الآليات العامة للتأثير: كالقصور الغذائي والتثبيط الأنزيمي، وتعديل وظائف الغشاء الخلوي، والتدخل في الجهـاز الانقـسامي واسـتقلاب الحموض النووية، والاستقلاب الطاقي، والتوازن الحلولي. كما أوضحت الدراسة المـشار إليها أعلاه[8] ضـعف تـأثير الميثوتركـسات فـي الفـأر مقارنـة بـالمواد الأخـرى (كالسايكلوفوسفاميد)، وهي نتيجة مهمة ولاسيما ما يتعلق بالميثوتركسات الأكثر استخداماً في أمراض المفاصل والتي تشير قرائن سريرية إلى أن استعماله بالجرعات المقـررة لا يؤدي إلى ظهور أعراض مرضية ذات دلالة، ولاسيما عند الحوامل [1,9,10,11].

بيد أن تجربة أخرى أجريت علـى الجـرذ[12] باسـتخدام جرعـات متزايـدة مـن الميثوتركسات من (0 – 700 mg / kg) أظهرت نتائج مشابهة لنتائج تجربتنا هذه، ولاسيما ما يتعلق بالبقيا وتعداد النطاف وصولاً إلى قلتها oligospermia، وكانت الجرعة نـصف المميتة (LD_{50}) عند الجرذ بحدود (300 mg / kg). وتؤكد التجربة على الجـرذ صـحة البيانات في تجربتنا على الفأر، كما تؤكد اختلاف الحساسية لعـوز الفـولات المحـرض بمعاكسـاته مختلفة من متعضيـة إلى أخرى، ففي تجربتنا هـذه كانـت (LD_{50}) بـين القيـمتين (50 – 100 mg / kg) وهي أقل من مثيلتها عند الجرذ، ولم تتحمـل الفئـران جرعـات أعلى من (250 mg / kg). وفي حين كـان تعـداد النطـاف متقاربـاً بـين الجرعتين (100 mg / kg) و(300 mg / kg) عند الجرذ (33.2×10^6 نطفـة للجرعـة الأولى و35.4×10^6 نطفة للجرعة الثانية)، فإن هذا التقـارب في تجربتنـا هذه علـى الفـأر كـان بين الجرعتيـن (50 mg / kg) و(100 mg / kg)، حيـث كـان التعـداد (13.9×10^6 نطفة للجرعة الأولى و11.6×10^6 نطفة للجرعة الثانية). وما بين هاتين الجرعتين، سواء أكان ذلك عند الجرذ أم عند الفأر، تقـع عتبـة التحمـل الفيزيولـوجي لمتلازمة عوز الفولات المحرض بالميثوتركسات. وبعد هذه الجرعـات يلاحـظ التـأثير المدمر لهذه المتلازمة ولعقار الميثوتركسات، والذي تؤكده منحنيات البقيا.

ولقد أوضحت دراسات عديدة تأثير معاكسات الفولات المؤدية إلى عوز الفولات في الفاعلية التكاثرية عند متعضيات عديدة. فانخفضت هذه الفاعلية معبراً عنها بتعداد النطاف عند الجرذ باستخدام جرعات متكررة من الـ Pyrimethamine [13]. وتم الحصول على نتائج مشابهة باستخدام معاكس الفولات Trimethoprim - Sulfamethoxazol على فحل الحصان غير المخصي Stallions [14]. وأكثر من ذلك، أجريت تجارب لضبط خصوبة ذكور الفئران باستخدام جرعات أمينة من الـ Pyrimethamine [15]، وأيضاً عند الرجال[15]، وهذه تجارب واعدة لأسلوب جديد من منع الحمل عند الرجال.

كما أجريت تجارب عديدة، وجمعت ملاحظات سريرية كثيرة، لفهم تأثير عوز الفولات في الخلايا. فأظهرت إحدى الدراسات [16] حدوث سمية خلوية Cytotoxicity في الخلايا الكبدية نتيجة المعالجة بالميثوتركسات عند مريضات مصابات بسرطان الثدي. وأكدت دراسة تجريبية أخرى [17] حدوث ظاهرة الموت الخلوي المبرمج Apoptosis المحرض بالميثوتركسات بعد قطع كبدي جزئي. كما أكدت دراسة أخرى[18] ملاحظة أذيات تبدت بتحلل نخاعيني جسري مركزي central pontine myelinolysis بعد إحداث عوز الفولات. وتأكّد بدراسات عديدة[3,4] أن عوز الفولات يرتبط دائماً بارتفاع معدل حمض الهوموسيستيئين في الدم، وهو المتهم الأول في إحداث مثل هذه الأذيات. ولكن يجب عدم استبعاد السمية الخلوية أيضاً الناجمة عن الجرعات المرتفعة لمعاكسات الفولات كالميثوتركسات.

وربما كانت الدراسات الأكثر أهمية هي تلك التي ربطت بين عوز الفولات وبين الأذيات الحاصلة للـ: DNA ومن ثم للصبغيات والمؤثرة بالتأكيد في عملية الانقسام الخلوي. فقد أكدت إحدى الدراسات [19] حدوث تكسرات بشريطي الـ: DNA عند الجرذان التي تعاني من عوز الفولات، وترافق ذلك بنقص مثلّثة المورثة P_{53} الكابحة للمورثة الورمية. وقد تأكدت مثل هذه الأذيات للـ: DNA في دراسات أخرى، إذ أكدت إحدى الدراسات[20] انخفاض معدل الانقسام الخلوي في الخلايا المحددة لبشرة الزغابات المعوية، كما أكدت أخرى[21] حدوث أذيات خلوية وراثية في الخلايا المنشئة للفأر باستخدام معاكس الفولات Pyrimethamine.

واستناداً إلى مثل هذه الدراسات، يمكن تفسير النتائج التي حصلنا عليها في تجربتنا هذه بحدوث ارتفاع تدريجي لحمض الهوموسيستيئين في فئران التجربة أدى إلى ازدياد في السمية الخلوية المعممة على جميع أعضاء الحيوانات وأجهزتها حتى عتبة تحمل تلاها موت الحيوانات. كما أن هذا الارتفاع قد أدى بازدياد الجرعة إلى شذوذات جزيئية في الـ: DNA والصبغيات تبدت بانخفاض في معدلات الانقسامات الخلوية المرافقة لعملية تكوين النطاف، ومن ثم انخفاض تعداد النطاف. وهنا لا يمكن استبعاد السمية الخلوية الناجمة عن عقار الميثوتركسات نفسه والذي يمكن أن يؤذي الخلايا بسويات أخرى.

لقد اقتصرنا في هذه التجربة التي تعتمد علـى إحـداث عـوز الفـولات المحـرض بالميثوتركسات، على دراسة تأثير هذه المادة في إنتاج النطاف عند الفأر، ولا بد أن تتبعها دراسات أخرى خلوية ونسيجية وجزيئية لفهم أعمق لهذه الظاهرة.

الاستنتاجات

تلفت هذه التجربة الانتباه إلى نقاط عدة رئيسية يمكن تلخيصها بما يأتي:

1. ضرورة مراقبة العقاقير والمواد الدوائية، وإجراء دراسات كافيـة علـى الآثـار الجانبية السلبية لها.
2. ضرورة ترشيد استخدام عقار الميثوتركسات على المرضى المختلفين.
3. ضرورة التعمق في دراسة أسباب العقم الجزئي والكامـل المـذكر، ويعـد عـوز الفولات أحد هذه الأسباب الأكيدة.

REFERENCES

1. **Herbert, V: Development of Human Folate Deficiency. In: Picciano, M. F., Stokstool, E. L. R., Georgy, J. F., eds: Folic acid metabolism in health and disease (contemporary issue in Clinical Nutrition). Vol.13, New York: 1990, 13: 195 – 210.**
2. **Lindenbaum, J., Allen, R. H: Clinical Spectrum and Diagnosis of Folate Deficiency in: Bailey, L. B., ed. Folate in health and disease. New York, NY: Marcel Dekker, inc, 1995: 43 – 73.**
3. **Herbert, V: Biochemical and hematological lesions in Folic acid deficiency. Am. J. Clin. Nutr. 20: 562 – 569, 1967.**
4. **Molloy, A. M: Folate bioavailability and health. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 2002, Jan, 72 (1): 46 – 52.**
5. **Threlkeld, D. S., ed: Antineoplastic, Antimetaboites, Methhotrexate. In Facts and Comparisons Drug Information. St Louis Mo. Facts and Comparisons: Aug. 1990: 653 – 654.**
6. **Stanger, O: Physiology of Folic acid in health and disease. Curs. Drug. Metab: 2002, Apr, 3 (2): 211 – 223.**
7. **Bevill, R. F. (1988). Sulfonamides in Veterinary Pharmacology and Therapeutic, eds: Booth, N. H., and McDonald, L. E., Iowa State University Press, Ames, IA. Chapter 48.**
8. **Bressmal, P. L., and Seto, F: Neural abnormalities induced by selected chemical agents. Proceeding of Oklahoma Academy of Science. Vol. 56 (1976).**
9. **Pietrzik, K. F., Thorand, B: Folate economy in pregnancy. Nutrition (1997), Nov. – Dec., 13 (11 – 12): 975 – 2007.**
10. **Scholl, T. O., Johnson, W. G: Folic acid: Influence on outcome of pregnancy. Am. J. Clin. Nutr. 2002, 71 (5 supll): 1295 – 1303.**
11. **Morgan, S. L., Bagott, J. E., Vaughn, W. H., et al: Supplementation with folic acid during Methotrexate therapy for Rheumatoid Arthritis. A double – blind, placepo – controlled trial. Ann. Intern. Med. 1994, 121: 833 – 541.**
12. **Johnson, F. E., Farr, S. A., Mawad, M.,Woo, Y. C: Testicular Cytotoxicity of intravenous Methotrexate in Rats. J. Surg. Oncol. 1994, Mar., 55(3): 175 – 178.**
13. **Murakami, Y., Takeda, M., Suzuki, Y., Fujie, H., Ogasawara, H., Masuda, T: Colloborative Work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose study in Rat Comparison of the effects of 2 and 4 weeks Pyrimethamine treatment in Rats. 2: J. Toxicol. Sci. 2002, Oct, 25, Spec. No: 203 – 210.**
14. **Bedford, S. J., McDonnell, S. M: Measurements of reproductive function in Stallions treated with Trimethprim – Suffamethoxazole and Pyrimethamine. 5: J. Am. Vet. Med. Assoc. 1999, Nov. 1, 215(9): 1317 – 1319.**

15. **Kalla, N. R., Saggar, S. K., Puri, R., Mehta, U: Regulation of male fertility by Pyrimethamine in adult Mice. 7: Res. Exp. Med. (Berl) 1997, 197(1): 45 – 52.**
16. **Van Outryve, S., Schrijvers, D., Van Den, B. J., Wilmes, P., Bogers, J., Van Mark, E., Vermorken, J. B: Methotrexate – associated liver toxicity in a patient with breast cancer: Cas Report and Literature Review. 2: Neth. J. Med. 2002, Jan, 60 (5): 216 – 222.**
17. **Kobayashi, K., Terada, C., Tsukamoto, L: Methotrexate – induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. Eur. J. Pharmacol. 2002, Mar. 1, 438(1 -2): 19 – 24.**
18. **Ramaekers, V. T., Reul, J., Kusenbach, G: General Pontine myelinolysis associated with aquired Folate depletion. Neuropediatrics (1997) Apr., 28(2): 126 – 130.**
19. **Kim, Y. I., Pogribny, I. P., Basnakiam, A. G: Folate deficiency in Rats induced DNA strand breaks and hypomethylation within the P_{53} tumor suppressor gene. Am. J. Clim. Nutr, 1997, Jan., 65 (1): 46 – 52.**
20. **Renes, I. B., Verburg, M., Bulsing, N. P., Ferdinandousse, S., Buller, H. A., Dekker, J., Einerhand, A. W: Protection of Payer's patch associated crypt and villus epithelium against Methotrexate – induced damage is based on it's distinct regulation of proliferation. 32: J. Pathol. 2002, Sept., 198 (1): 60 – 68.**
21. **Aydemir, N., Bilaloglu, R: The cytogenetic effects of Pyrimethamine on male Mouse germ cells. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 1996, 15 (2–4): 79 – 83.**