مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (5) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (5) 2013

مؤشر انقسام المنسليات المنوية في خصى الفئران المعالجة بجرعات متزايدة من الميتوتركسات

الدكتورة أمل العبدالله*

(تاريخ الإيداع 24 / 3 / 2013. قبل للنشر في 30 / 5 / 2013)

□ ملخّص □

حُقنت الفئران الذكور من سلالة Swiss عضليّاً بجرعات متزايدة من عقار الميتوتركسات Methotrexate (MTX) (25، 50، 100، 150، 200 ملغ/كغ) لمرّة واحدة فقط، ثم دُرست بعد مرور 15 يوماً.

حُسبت متوسّطات مجموع المنسليات المنوية Spermatogonia في المقطع العرضي للأنبوب المنوي، كما حسبت متوسّطات مجموع المنسليات المنوية التي دخلت في الطور التالي من الانقسام الخيطي المتساوي، وحسب أيضاً المؤشّر الانقسامي Mitotic Index (MI) للمنسليات المنوية, و تمّ تحليل النتائج إحصائياً باستخدام برنامج IBM-Spss 19، و قورنت المتوسّطات باستخدام اختبار : one-way ANOVA: Post Hos Test, Multiple comparisons, Tukey HSD ، وحلّل المؤشّر الانقسامي (MI) باستخدام اختبار Target Variable.

أظهرت النتائج أن حقن الـMTX لم يؤدِّ إلى انخفاض ذي دلالة إحصائية في متوسّطات مجموع المنسليات المنوية للمجموعات التجريبية مقارنة بالشاهد، بينما أدّى إلى انخفاض تدريجي متناسب مع ازدياد الجرعة في متوسّط مجموع المنسليات المنوية التي دخلت في الطور التالي من الانقسام الخيطي، حيث وصل هذا المتوسط إلى قيمة متدنّية جدّاً في الجرعتين: 150، 200 ملغ/كغ (7.10±2.26 و 3.65±2.15 على التوالي) مقارنة بالشاهد (37.40±9.4)، ممّا أدّى إلى انخفاض شديد في المؤشّر الانقسامي (20.53% و 6.36% في الجرعتين 100 و200 ملغ/كغ على التوالي) مقارنة بالشاهد (61.79%).

الكلمات المفتاحية: الميتوتركسات، المنسليات المنوية، المؤشّر الانقسامي، خصى الفئران .

* مدرسة – قسم علم الحياة الحيوانية– كلية العلوم– جامعة دمشق – دمشق – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (5) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (5) 2013

Mitotic Index of Spermatogonia in Mice testis treated with increasing doses of Mithotrexate

Dr. Amal AL-ABDOULAH*

(Received 24 / 3 / 2013. Accepted 30 / 5 /2013)

□ ABSTRACT □

Increasing dose of Mithotrexate (25, 50, 100, 150, 200 mg/kg) were tested on Swiss strain mouse by one intramuscular injection, and their effects were studied (15) days later.

The mean values of total spermatogonia and those of them undergoing mitotic division (in the metaphase) were evaluated in seminiferous tubular cross section, and the mitotic index (MI) of the spermatogonia was also calculated.

Statistical analysis was performed by using IBM-Spss 19 program and for mean values comparison (one way ANOVA: post Hos Test, Multiple Comparison, and Tukey HSD) was used, while mitotic index was calculated by using Target Variable.

Our results showed that Methotrexate injection didn't lead to a significant decrease in spermatogonia mean values in the tested animals compared to the control, while it led to a dose dependent gradual decrease in the mean values of the spermatogonia undergoing mitotic division , and the greatest reduction was noticed in the two high doses: 150, 200, mg/kg (7.10±9.4, 3.65±2.15 respectively) compared to the control (37.40±2.26), and which led also to a severe reduction in the mitotic index (20.53%, 6.36% in the doses: 100, 200 mg/kg respectively) compared to the control (61.79%).

Keywords: Methotrexate, Spermatogonia, Mitotic Index, Mice testis.

* **Assistant Professor in Animal Biology Department- Faculty of sciences-University of Damascus-Damascus, Syria.**

مقدّمة:

ينتمي عقار الميتوتركسات Methotrexate (MTX) إلى فئة العقاقير المضّادّة للاستقلاب Antimetabolites [1]، ويستخدم لمعالجة العديد من أنواع السرطانات واللوكيميا وأورام العظام والمبايض وسرطان الثدي، كما يستخدم أيضاً في معالجة التهاب المفاصل الرثياني Rheumatoid Arthritis (RA) [2] والصدفية Psoriasis [3]. ويعتمد الاستخدام الواسع لـ MTX في علاج الأورام السرطانية على تأثيره المثبط للانقسام الخلوي، يتدخّل الـ MTX في عمل حمض الفوليك Folic acid بفضل تشابههما بالبناء الجزيئي، لذلك يكون MTX هدفاً لأنزيم إرجاع يسمى ديهيدروفولات ريدوكتاز Dihydrofolate reductase (DHFR) يرتبط به عوضاً عن حمض الفوليك، ويكون هذا الارتباط قوياً بحيث يثبّط الأنزيم FAR، ويمنع تحوّل حمض الفوليك إلى رباعي هيدرو فولات Tetrahydrofolate(THF)، ويوقف بالتالي اصطناع كوأنزيمات نوعية تركّب بدءاً من THF، وتتوسّط تفاعلات نقل لوحدات وحيدة الكربون مثل الميثيل، الميثيلين والفورميل وهي ضرورية في مرحلتين في أثناء اصطناع البيورينات وفي مرحلة واحدة في أثناء اصطناع البيريميدينات[4]، ويؤدي هذا التوقف في تحول المواد إلى نقص في الكميّات المتوافرة من حمض الثايميدين Thymidylic acid وحمض الأنوسينيك Inosinic acid الضروريّن لبناء الحموض النووية كالـ DNA والـRNA [5].

لذلك ربطت الدراسات السابقة بين عوز الفولات الناتج عن تأثير MTX والأذيات الحاصلة في الـDNA ومن ثم للصبغيات والمؤثرة حتماً في عملية الانقسام الخلوي. وقد أكّدت إحدى الدراسات[6] حدوث تكسّرات في شريطي الـDNA عند الجرذان التي تعاني من عوز الفولات، وترافق ذلك بنقص مثيلة المورثة P_{35} الكابحة للمورّثة الورمية. وقد تأكّدت هذه الأذيات لـ DNA في دراسات أخرى [7] حيث أشار هؤلاء الباحثون إلى أن عقار الـ MTX يثبّط عمل أنظمة إصلاح الـDNA مما يؤدّي إلى حدوث تلف في هذه الجزيئات وبالتالي تكسّر أشرطة الـDNA المفردة داخل الخلية وتراكمها، ويعزى ذلك بنظرهم إلى تأثير هذا العقار في تثبيط عمل الـDNA بوليميراز DNA-Polymerase الخاص بنظام الإصلاح عن طريق القص Excision Repair والذي يعود إلى نفاذ النكليوتيدات المتوافرة، وبالتالي إلى توقّف عملية إصلاح التلف.

كما تأكّدت هذه الأذيات للـDNA باستخدام MTX في دراسات أخرى، إذ أكّدت إحدى الدراسات[8] انخفاض معدّل الانقسام الخلوي في الخلايا المحدّدة لبشرة الزغابات المعويّة، كما أكّدت أخرى [9] حدوث أذيات خلوية في الخلايا المنشئة للفأر (المنسليات المنوية Spermatogonia) باستخدام معاكس الفولات Pyrimethamine.

وعُرف مؤخّراً أن عقار الـ MTX يؤثر سلباً في الإخصاب لدى الرجال عند استخدامه كعلاج للسرطان لأنه يثبّط الفاعلية التكاثرية للمنسليات المنوية التي تصبح هدفاً رئيساً لتأثيره [10]، ويُعدُّه بعضهم ذا سميّة تكاثرية Reproductive toxicant حيث يحدث تناقصاً في عدد النطاف يتناسب مع تناقص وزن الخصية وبربخها إجمالاً[11].

ثانياً - هدف البحث وأهميته:

يهدف البحث الحالي إلى دراسة التأثير المثبّط لـ MTX على الانقسام الخيطي (المتساوي) بدراسة المؤشّر الانقسامي Mitotic Index (MI) (وهو النسبة المئوية للمنسليات المنوية التي دخلت في الطور التالي من الانقسام الخيطي المتساوي بالنسبة لمجموع المنسليات المنوية) للمنسليات المنوية التي تعد خلايا جذعية سليمة غزيرة التكاثر، وتتأثّر عادة بالعقاقير المضادّة للسرطان كالـ MTX الذي يسبّب خللاً في تكوّن النطاف Spermatogenesis.

وفي هذا البحث جرّبت جرعات متزايدة من الـMTX على حيوانات التجربة بدءاً من الجرعات المتحمّلة القابلة للتصحيح إلى الجرعات التي أدّت إلى سميّة خلوية غير عكوسة.

طرائق البحث ومواده:

1- حيوانات التجربة

استخدم في هذه الدراسة ذكور فئران بالغة من السلالة Swiss Strain (60 فأراً)، تراوحت أوزانها بين 32 – 30 غراماً وأعمارها بين 15 و 20 أسبوعاً، وضعت في 6 أقفاص نظيفة مجهّزة بماء وعلف خاص، وتم تأمين الشروط المثلى من درجة الحرارة ونسبة الرطوبة والتهوية والنظافة. تمت التجارب في الفترة الضوئية الطبيعية خلال النهار، ولم يتم تعريضها في الليل لأي مصدر ضوئي كهربائي.

2- جرعات الميتوتركسات Methotrexate:

استخدمت مادة الميتوتركسات المسوّقة في عبوات سعة (50mg, 5ml) صنع شركة EBEWE Azneimittel Ges.m.b.H – Austria الأسترالية. مدّد محلول الميتوتركسات الأولي بمحلول كلور الصوديوم (0.1M NaCl) أو بالمصل الملحي (0.9% NaCl)، وحضّر من المحلول الناتج محاليل ميتوتركسات بتراكيز: 25، 50، 100، 150، 200 ملغ للكيلوغرام الواحد من وزن الحيوان على التوالي.

3- إجراء التجربة:

وزّعت حيوانات التجربة على (6) أقفاص، وضع في كل منها (10) حيوانات:

1- قفص لمجموعة الحيوانات الشاهدة Control. التي حقنت بـ 1ml من المحلول الفيزيولوجي فقط.
2- قفص لمجموعة الفئران المحقون كل منها بـ 25 ملغ/كغ من محلول الميتوتركسات ولمرّة واحدة فقط.
3- قفص لمجموعة الفئران المحقون كل منها بـ 50 ملغ/كغ من محلول الميتوتركسات ولمرّة واحدة فقط.
4- قفص لمجموعة الفئران المحقون كل منها بـ 100 ملغ/كغ من محلول الميتوتركسات ولمرّة واحدة فقط.
5- قفص لمجموعة الفئران المحقون كل منها بـ 150 ملغ/كغ من محلول الميتوتركسات ولمرّة واحدة فقط.
6- قفص لمجموعة الفئران المحقون كل منها بـ 200 ملغ/كغ من محلول الميتوتركسات ولمرّة واحدة فقط.

تركت حيوانات المجموعات الست في الأقفاص مدّة (15) يوماً بعد الحقن، وضحيت كل مجموعة بصورة منفصلة في اليوم الخامس عشر بقطع النخاع الشوكي بالضغط على منطقة الرقبة، وذلك من أجل استئصال الخصيتين مع بربخيهما. غُسلت الخصيتان في محلول فيزيولوجي، ثمّ وضعت في مثبّت كارنوا لمدّة 4 ساعات. حضّرت منها مقاطع نسيجية بالطريقة التقليدية: مكعّبات برافينية، مقاطع بثخانة 5 ميكرون بمقطاع مجهري دوّار Microtom موديل cut4050، لوّنت المقاطع بكاشف شيف من أجل الكشف عن الـ DNA. درست المقاطع بالمجهر الضوئي (Olymbus CX40) بتكبير 1000 مرّة.

4- طريقة التحليل الإحصائي:

تم تحليل نتائج البحث إحصائيّاً باستخدام برنامج (IBM-SPSS 19)، حيث تم استخدام الرزمة الإحصائية one-way ANOVA: Post Hos Test, Multiple comparisons, Tukey HSD للمقارنة بين متوسطات المجموعات المستخدمة. وتم استخدام اختبار Graphs لرسم المخطّطات البيانية. وتمّ استخدام الرزمة Compute: Target Variable لحساب المؤشر الانقسامي Mitotic Index (MI).

النتائج والمناقشة:

النتائج:

1- متوسّطات مجموع المنسليات المنوية في المقطع العرضي للأنبوب المنوي:

تم عدُّ المنسليات المنوية في خمسة أنابيب منوية لمقطع عرضي نموذجي للخصية اختيرت بصورة عشوائية لكل من حيونات التجربة، ثم حسب متوسط التعداد للأنابيب الخمسة في كل خصية، وتمّ أخيراً حساب متوسّط المتوسّطات للحيوانات العشرة في الشاهد والمجموعات التجريبية.

بلغ متوسط مجموع المنسليات المنوية في الأنبوب المنوي لدى الشاهد المحقون بالمحلول الفيزيولوجي فقط (60.05±9.63 منسلية نطفية)، في حين بلغ هذا المتوسّط (49 – 51 – 58 – 57 – 56 منسلية نطفية) في المجموعات التجريبية (25 – 50 – 100 – 150 – 200 ملغ/كغ) على التوالي (الجدول رقم 1 والمخطط البياني رقم 1). تشير الأرقام السابقة إلى وجود نقص في التعدد في كل الجرعات المستخدمة، ولكن لدى مقارنة هذه المتوسّطات باستخدام اختبار: one-way ANOVA Tukey لم تظهر فروق معنوية ذات دلالة إحصائية بين الشاهد وكل من مجموعة الفئران المحقونة بـ: 100 و 150 و 200 ملغ/كغ (P-value = 0.97 , 0.92, 0.73 > 0.05)، بينما كانت هذه الفروق دالّة إحصائياً بين الشاهد والمجموعتين التجريبيتين: 25 و 50 ملغ/كغ (P-value = 0.00, 0.02 < 0.05). ولا يمكننا أن نعزو، بأي شكل من الأشكال، هذه الدلالة الإحصائية للفروق في المجموعتين الأخيرتين إلى تأثير جرعة الميتوتركسات، وإنّما إلى فروق فردية بين أفراد المجموعات التجريبية المستخدمة.

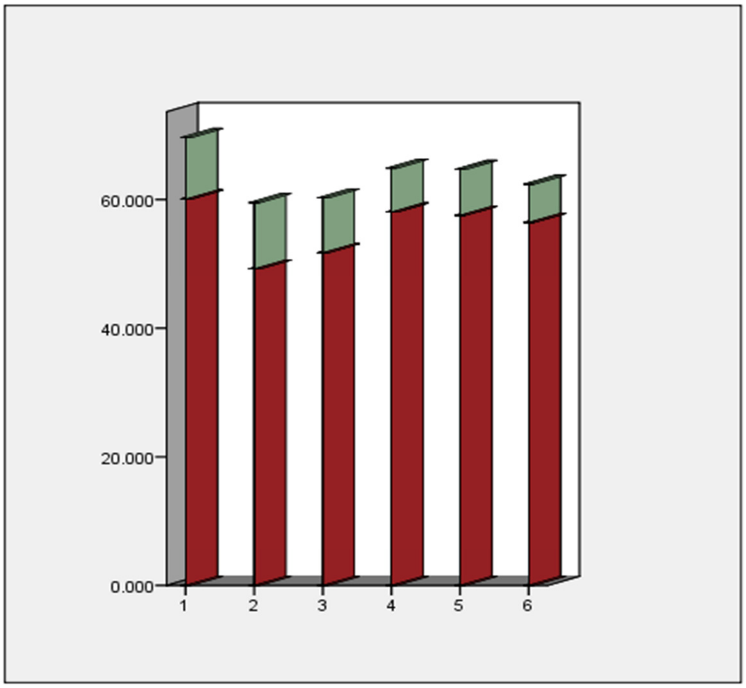
2- متوسطات مجموع المنسليات المنوية التي دخلت الطور التالي Metaphase من الانقسام الخيطي المتساوي في المقطع العرض للأنبوب المنوي:

يتوضح لنا من الجدول رقم 2 ومن المخطط البياني رقم 2 أنّ متوسّط مجموع المنسليات المنوية التي دخلت في الطور التالي للانقسام الخيطي لدى الشاهد المحقون بالمحلول الفيزيولوجي فقط قد بلغ (37.40±9.4). وقد انخفضت هذه القيمة بصورة تدريجية ومتناسبة طرداً مع ازدياد جرعة الميتوتركسات. وبينما بلغ المتوسط (25.15±4.83) في الجرعة 25 ملغ/كغ، وصل هذا الانخفاض إلى قيمة متدنّية جدّاً في الجرعتين: 150 و 200 ملغ/كغ (7.10±2.26 و 3.65±2.15 على التوالي).

ولدى مقارنة هذه المتوسّطات باستخدام الاختبار السابق نفسه يلاحظ ظهور فروق معنوية ذات دلالة إحصائية بين متوسّطات كل من الشاهد وبقية المجموعات التجريبية، حيث بلغت قيمة (P-value = 0.00 < 0.05)، ممّا يؤكّد وجود انخفاض كبير جدّاً في متوسطات مجموع المنسليات المنوية التي دخلت في الطور التالي من الانقسام الخيطي المتساوي ضمن مجموع المنسليات المنوية لدى المجموعات التجريبية مقارنة بالشاهد.

الجدول رقم (1): يبين متوسّطات مجموع المنسليات المنوية في المقطع العرضي للأنبوب المنوي وانحرافاتها المعيارية لدى الشاهد (1) والمجموعات التجريبية (من 2 إلى 6):

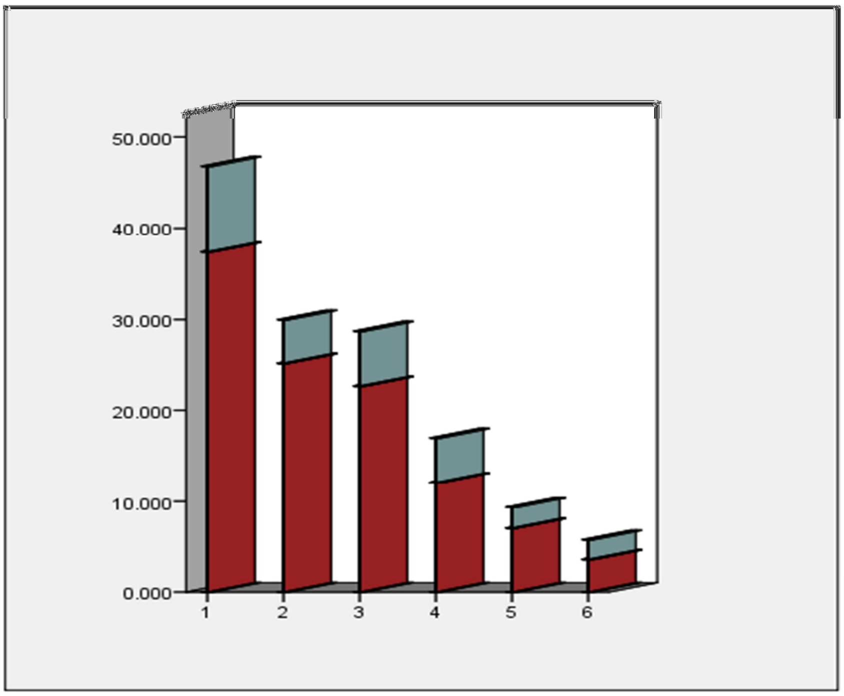
المجموعة	الشاهد والمجموعات التجريبية	المتوسّط والانحراف المعياري
1	الشاهد	60.05 ± 9.63
2	25 ملغ / كغ	49.25 ± 10.25
3	50 ملغ / كغ	51.75 ± 8.48
4	100 ملغ / كغ	58.05 ± 6.78
5	150 ملغ / كغ	57.55 ± 7.08
6	200 ملغ / كغ	56.45 ± 5.9



المخطط البياني (1): متوسّطات مجموع المنسليات المنوية وانحرافاتها المعيارية في المقطع العرضي للأنبوب المنوي لدى الشاهد (1) والمجموعات التجريبية (من 2 إلى 6).

الجدول رقم (2): يبيّن متوسّطات مجموع المنسليات المنوية التي دخلت في الطور التالي من الانقسام الخيطي المتساوي في المقطع العرضي للأنبوب المنوي وانحرافاتها المعيارية لدى الشاهد (1) والمجموعات التجريبية (من 2 إلى 6):

المجموعة	الشاهد والمجموعات التجريبية	المتوسّط والانحراف المعياري
1	الشاهد	37.40 ± 9.4
2	25 ملغ / كغ	25.15 ± 4.83
3	50 ملغ / كغ	22.65 ± 6.08
4	100 ملغ / كغ	12.00 ± 4.97
5	150 ملغ / كغ	7.10 ± 2.26
6	200 ملغ / كغ	3.65 ± 2.15



المخطط البياني (2): متوسّطات مجموع المنسليات المنوية التي دخلت في الطور التالي من الانقسام الخيطي المتساوي في المقطع العرضي للأنبوب المنوي وانحرافاتها المعيارية لدى الشاهد (1) والمجموعات التجريبية (من 2 إلى 6).

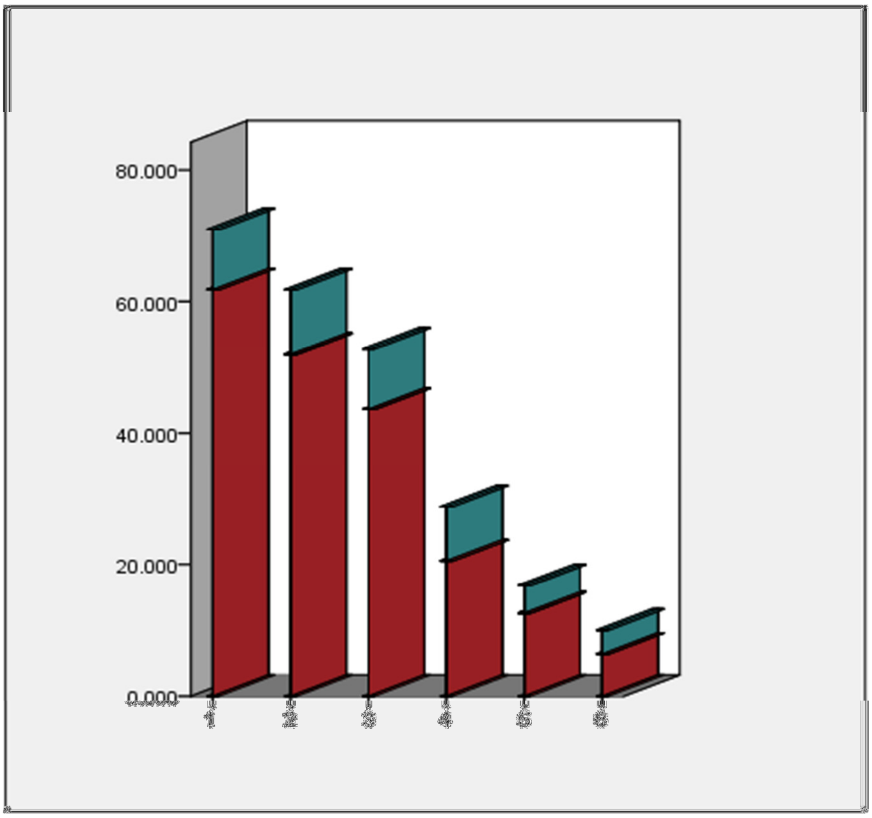
3- المؤشر الانقسامي Mitotic Index (MI):

يتوضح لنا من (الجدول رقم 3) و(المخطط البياني رقم 3) أن متوسّط المؤشّر الانقسامي عند الشاهد المحقون بالمحلول الفيزيولوجي فقط قد بلغ (61.79%). وقد انخفضت هذه القيمة بصورة تدريجية متناسبة طرداً مع ازدياد جرعة الميتوتركسات، حتى وصل الانخفاض إلى الثلث في الجرعة 100 ملغ/كغ (20.53%) وإلى العشر في الجرعة 200 ملغ/كغ (6.36%).

ولدى مقارنة متوسطات المؤشر الانقسامي باستخدام الاختبار السابق نفسه نلاحظ ظهور فروق معنوية ذات دلالة إحصائية بين متوسّطات كل من الشاهد وبقية المجموعات التجريبية، حيث بلغت قيمة $P\text{-value} = 0.00 < 0.05$، ممّا يؤكّد وجود انخفاض كبير جدّاً في متوسّطات المؤشّر الانقسامي لدى المجموعات التجريبية مقارنة بالشاهد.

الجدول رقم (3): يبيّن متوسطات المؤشّر الانقسامي والانحرافات المعيارية لدى الشاهد (1) والمجموعات التجريبية (من 2 إلى 6):

المجموعة	الشاهد والمجموعات التجريبية	المؤشر الانقسامي والانحراف (%)
1	الشاهد	61.79 ± 9.15
2	25 ملغ / كغ	51.93 ± 9.85
3	50 ملغ / كغ	43.59 ± 9.15
4	100 ملغ / كغ	20.53 ± 8.22
5	150 ملغ / كغ	12.58 ± 4.18
6	200 ملغ / كغ	6.36 ± 3.62



المخطط البياني (3): المؤشّر الانقسامي (%) للمنسليات المنوية المنقسمة بالنسبة لمجموع المنسليات المنوية وانحرافاتها المعيارية لدى الشاهد (1) والمجموعات التجريبية (من 2 إلى 6).

4- قياس حجم الأثر:

وللتأكّد من النتائج السابقة تم تطبيق اختبار ويلكس لمبادا Multivarate Tests: wilks' Lambda لمعرفة حجم الأثر للعقار المستخدم على المعايير المدروسة حيث تبيّن أنّ P-value = 0.00 < 0.05 في الاختبار السابق، مما يعني أنّها دالّة إحصائية بالنسبة لقيمة F، وهذا يشير إلى أنّ هناك أثراً للعقار المستخدم، ونستطيع التعرّف على حجم هذا الأثر من ارتفاع قيمة Partial Eta squared أو ما يسمّى مربع إيتّا التي بلغت قيمتها على المعايير الثلاثة (0.56) (الجدول رقم 4). ويمكن التعرّف على حجم الأثر لكل معيار على حدة من خلال Tests of Between – subject Effects (الجدول رقم 5)، حيث تبيّن أنّ حجم الأثر على تعداد المنسليات المنوية كان ضعيفاً مقارنة مع ما دخل منها في الطور التالي من الانقسام الخيطي، وبالتالي مع المؤشّر الانقسامي،حيث أشارت نتائج هذين الأخيرين إلى حجم أثر كبير للعقار المستخدم، حيث بلغ في طور المنسليات المنوية (0.18) بينما بلغ في الطور التالي للانقسام (0.82) وفي المؤشّر الانقسامي (0.88) (الجدول رقم 5).

الجدول رقم (4): يبيّن حجم أثر العقار المستخدم على المعايير الثلاثة المدروسة:

Multivariate Tests[a]									
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power[d]
مجموعات	Wilks' Lambda	.084	29.989	15.000	309.584	.000	.562	397.349	1.000

a. Design: Intercept + مجموعات

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

d. Computed using alpha = .05

الجدول رقم (5): يبيّن حجم أثر العقار المستخدم على كل معيار من المعايير الثلاثة المدروسة.

Tests of Between-Subjects Effects									
Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power[d]
مجموعات	المنسليات المنوية	1708.667	5	341.733	5.109	.000	.183	25.545	.982
	الطور التالي للانقسام	16196.742	5	3239.348	105.926	.000	.823	529.632	1.000
	لمؤشر الانقسامي	51625.806	5	10325.161	170.615	.000	.882	853.074	1.000

a. R Squared = .183 (Adjusted R Squared = .147)

b. R Squared = .823 (Adjusted R Squared = .815)

c. R Squared = .882 (Adjusted R Squared = .877)

d. Computed using alpha = .05

المناقشة:

تشير النتائج التي حصلنا عليها في هذه الدراسة إلى أنّ تأثير الـ MTX كمثبّط للانقسام الخلوي على متوسّط تعداد المنسليات المنوية التي دخلت الطور التالي من الانقسام الخيطي كان متناسباً طرداً مع ازدياد جرعة الميتوتركسات، فبينما انخفض متوسّط تعدادها إلى 25.15±4.83 في الجرعة 25 ملغ/كغ مقارنة بالشاهد 37.40±9.4، بلغ هذا الانخفاض في الجرعات العالية 7.10±2.26 و 3.65±2.15 في الجرعتين 150 و 200 ملغ/كغ على التوالي، وبالتالي فإنّ للـ MTX تأثيراً سلبياً على تكاثر المنسليات المنوية والذي تأكّد أيضاً من خلال دراسة المؤشر الانقسامي (MI) للمنسليات المنوية الذي انخفض هو أيضاً بازدياد جرعة الميتوتركسات، فبينما كان متوسّط المؤشّر الانقسامي عند الحيوانات الشاهدة (61.79%) انخفضت هذه القيمة إلى الثلث في الجرعة 100 ملغ/كغ (20.53%) وإلى العشر في الجرعة 200 ملغ/كغ (6.36%). وهكذا تؤكّد النتائج التي تم الحصول عليها أنّ للـMTX تأثيراً سلبياً فاعلاً على تكاثر المنسليات المنوية، وما لهذا من أهمية على الخصوبة عند الرجال. ولقد توافقت

نتائجنا هذه مع الكثير من الدراسات السابقة التي تناولت تأثير الـMTX على التكاثر الخلوي، وعلى تكاثر المنسليات المنوية خاصةً.

ففي دراسة أجريت لمعرفة تأثير الـMTX على تكاثر خلايا بشرة الجرذ المستنبتة في الزجاج in vitro (12) تبين أن إضافة الـMTX بتركيز 1µg/ml إلى هذا المستنبت يثبّط بشكل دال إحصائياً الانقسام الخيطي لهذه الخلايا.

كما أظهرت دراسة أخرى (13) أجريت على الجرذان أيضاً أن الجرعات المنخفضة من الميتوتركسات قد أدّت إلى اختفاء الأطوار الانقسامية المختلفة لخلايا الظهارة المعوية، مع تقاصر زغاباتها.

وفي دراسة أحدث [14] للتحري عن تأثير أدوية مضادة للسرطان متنوّعة بما فيها الـ MTX على المؤشّر الانقسام والحركية التكاثرية الخلوية (CPK) لمستنبتات خلايا لمفاوية بشرية، تبين أنّ جميع هذه الأدوية تثبّط وبوضوح المؤشّر الانقسامي لهذه الخلايا.

وفي دراسة أجريت من قبل الباحث Maskaleris وآخرين [15] لمعرفة التأثيرات السمية والوراثية لعقار الـMTX مترافقاً مع الكافيين Caffeine أو بفرط الحرارة Hyperthermia في الزجاج على مستنبتات خلايا لمفاوية بشرية وفي الحي على فئران محقونة بخلايا سرطانية مأخوذة من سائل الحبن، تبين أنّه يثبّط المؤشّر الانقسامي ومؤشّر التكاثر الخلوي، كما يحرّض على زيادة تكوين النوى الصغيرة وزيادة التبادل الكروماتيدي الشقيق.

كما أشار حسن [16] إلى أن تجريع الفئران عقار الميتوتركسات يؤدّي إلى حدوث تأثيرات مطفرة وسمية من خلال خفض مؤشّر الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية، كما يؤدّي أيضاً إلى رفع نسبة الزوغان الكروموسومي، وتحفيز تشكّل النوى الصغيرة، وزيادة ظهور التشوّهات في رؤوس النطاف المتمايزة.

وفي دراسة حديثة جداً (2010) من قبل Akira Hara وآخرين [17] أجريت على خلايا جذعية جنينية بشرية تم نقلها ودمجها مع شبكية عارية للفئران التي عولجت بالميتوتركسات، تبيّن أن هذا الأخير يخفض النشاط التكاثري للخلايا الجذعية الجنينية المنقولة، كما يخفّف قدرتها المولّدة للأورام الخبيثة، ويحفّز تمايزها إلى خلايا عصبية.

وقد أظهرت الدراستان [18][19] أن الـ MTX يستنزف المدّخرات الخلوية من الفولات المرجعة بتثبيطه لأنزيم ديهيدروفولات ريدوكتاز (DHFR) مؤدّياً بذلك إلى تثبيط اصطناع الـ RNA والـDNA ويوقف الخلايا في الطور G1 من الدارة الخلوية مانعاً إيّاها من الدخول في الطور S.

وفي دراسة (20) حول تأثير الميتوتركسات على المؤشّر الانقسامي لخلايا نقي العظم (كخلايا جسمية) ولخلايا جنسية، تبين أنّ الميتوتركسات قد خفض معنوياً مؤشّر انقسام خلايا نقي العظم إلى 7% مقارنة بالشاهد 16%، في حين خفّض المؤشّر الانقسامي للخلايا الجنسية معنوياً من 9.63% في الشاهد إلى 4.53%. كما لوحظ أنّ إعطاء الفئران العقار قد أدّى إلى إحداث زيادة معنوية في معدّل ظهور التغيّرات الكروموسومية وزيادة في التردد التلقائي لظهور النوى الصغيرة، وتحريض ظهور التشوّهات في رؤوس النطاف.

وتتّفق هذه النتائج مع ما وجده حسن [16] و Maskaleris [15]. ويمكن أن يعزى تأثير الميتوتركسات إلى قابليته في التداخل مع المادّة الوراثية، حيث تكون السبب في ظهور التأثيرات السمية الخلوية والتطفيرية. وقد أشار الباحث Hunnkens [21] إلى أنّ الميتوتركسات يؤدّي إلى نقص في أنزيم ديهيدروفولات ريدوكتاز(DHFR) الذي يعد المفتاح الرئيس في عملية انقسام الخلايا، كما إنّه يؤدّي إلى نفاذ النكليوتيدات الداخلة في تركيب الـDNA ممّا يؤدّي إلى توقّف عملية إصلاح التلف الحاصل في جزيئة الـDNA، حيث أشار جوهانستون [22] وآخرون (2005) إلى أنّ الميتوتركسات يثبّط عمل الأنزيمات التي تتحكّم في استقلاب البيورينات ممّا يؤدّي إلى تراكم الأدينوزين بالإضافة إلى

حدوث تلف في الجزيئة نفسها [7] و يؤدي هذا التلف بالنتيجة إلى إحداث تغيّرات كروماتينية وتكوين نوى صغيرة [15] أو ربّما للميتوتركسات القدرة على إحداث طفرات في المورّثة المسؤولة عن شكل رؤوس النطاف، وبالتالي إلى إنتاج نطاف مشوّهة (23) (16) (20).

واستناداً إلى هذه الدراسات يمكن تفسير النتائج التي حصلنا عليها في تجربتنا هذه بحدوث ارتفاع تدريجي لحمض الهيموسيستيئين في فئران التجربة أدّى إلى ازدياد السمّية الخلوية المعممّة على جميع أعضاء الحيوانات وأجهزتها، كما إنّ هذا الارتفاع قد أدّى بازدياد الجرعة إلى شذوذات جزيئية في الـDNA والصبغيات تجلّت بانخفاض في معدّلات الانقسامات الخلوية للمنسليات المنوية، و بالتالي انخفاض تعداد النطاف [23].

الاستنتاجات والتوصيات:

يلفت هذا البحث الانتباه إلى نقاط عدّة رئيسة يمكن تلخيصها بما يأتي:

1. ضرورة مراقبة العقاقير والمواد الدوائية، وإجراء الدراسات الكافية على الآثار الجانبية السلبية لها.
2. ضرورة ترشيد استخدام عقار الميتوتركسات في علاج الأمراض المختلفة.
3. ضرورة التعمّق في دراسة أسباب العقم الذكري الجزئي والكامل.
4. أخذ عوز الفولات بعين الاعتبار لدى دراسة أسباب العقم عند الذكور.

المراجع :

1- THRELKELD, D.S. ed: *Antineoplastic, Antimetabolites, Methhoterxate. In Facts and Comparisons Drug Information.* St Louis Mo. Facts and Comparisons: Aug. 1990:653-654.

2- EDWIN, S.L. CHAN and BRUCE, N. CRONSTEIN. *Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases.* Arthritis Res. 2002 Vol 4 No 4:266-273 (review).

3- JEFFES, E.W.; McCULLOGH, J.I.; PTTELKOW, M.R.;McCORMICK, A.; ALMANZOR, J.; DANG, M.; Voss, J.; SCHLOTZHAUER, A. *Methotrexate therapy of psoriasis: differential sensitivity of proliferating lymphoid and epithelia cells to the cytotoxic and growth-inhibitory effects of methotrexate.* J Invest Dermatol. 1995 Feb; 104(2):183-8

4-ROZENSZAJN, L.A; and RADNAY, J. *The Effect of Methotrexate on Transformation and Mitosis of Normal Human Blood Lymphocytes In Vitro.* Blood.1997, 43: 401-409

5- CARTER, S.K; and LIVINGSTON, R.B. *Drugs available to treat cancer.* In: Carter, S., Glatestein, R.B. (Eds). *Principles of cancer treatment,* McGraw-Hill, New York,1982 ,111-145.

6- 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.

7- BORCHER, A.H.; KENNEDY, K.A; STRAW, J.A. *Inhibition of DNA excision repair by methotrexate in Chinese hamster ovary Cell following exposure to ultra violet irradiation or ethyl methane sulfonate.* Cancer Res.,1990, 50:1786-1789.

8- RENES, I. B.; VERBURG, M. BULSING, N. P.; FERDLNANDOUSSE, 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 refulation of proliferation.* 32: J.Pathol. 2002, Sept., 198 (1): 60-68.

9- 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.

10-PADMANABHAN, S.; TRIPATHI, D.N.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G.B. *Cytotoxic and effects of methotrexate in germ cells of mice.* Elsevier B.V, 2008, Vol.655,issue 1-2

11- بصل مصطفى. *تأثير جرعات متزايدة من الميتوتركسات (معاكس حمض الفوليك) في إنتاج النطاف عند ذكور الفأر.* مجلّة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، 2006. مجلد 22 – العدد الأول.

12-TYLOR, J.R.; HALPRIN, K.M; LEVINE, V.; WOODYARD, C. *Effects of methotrexate in vitro on epidermal cell proliferation.* Br J dermatol 1983 Jan,108(1):45-61.

13- SULLKOWSKA, A.; LEWICKI, Z.; FIGURSKI, R. *Intestinal epithelium regeneration in rats receiving methotrexat and a trial of regulating this generation in rats with pentagastrin and glucagon.* Materia Medica Polona. Polish Journal of Medicine and Pharmacy 1989, 21(3):189-193

14- ROJAS, E.; HERRERA, L.A.; SORDO, M.; GONSEBATT, M.E.; MONTERO, R.; RODRLGUEZ, R.; OSTROSKY- WEGMAN P. *Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineioplastic activity.* Mexico. Anti-cancer drugs 1993, 4(6):637-640

15- MASKALERIS, T.; LIALIARS, T.; TRIANTAPHYLLIDIS, C. *Induction of Cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and anti neoplastic effects in ehrlich aseites tumor Cells in vivo treated by methotrexate, hyperthermia and/or Caffeine.* Mutat. Res,1998,422: 229-236.

16- حسن، مفيد قائد أحمد. *تثبيط الأثر السمي الوراثي لبعض المسرطنات الكيميائية باستعمال مستخلصات نباتية،* أطروحة دكتوراه، جامعة بابل 2002.

17- AKIRA HARA, AYKO TAGUCHI, HITOMI AOKI, YUICHIRO HATANO, MASAYUKI NIWA, YASUHIRO YAMADA, TAKAHIRO KUNISADA. *Folate antagonist, methotrexate induces neuronal differentiation of human embryonic stem cells transplanted into nude mouse retina.* Neuroscience Letters 2010-06-25

18- FAIRCHILD, C.R.; MAYBAUM, J.; STRAW, J.A. *Enhanced cytotoxicity with methotrexate in conjunction with hypoxanthine in L1210 cells in culture.* Cancer Chemother Pharmacol 1988, 22(1):26-32.

19- GONCHAROVA, S.A.; FRANKFURT, O.S. *Effect of methotrexate on the cell cycle of L1210 leukemia. Cell Tissue Kinet.* 1976 Jul,9(4):333-40

20- الربيعي عباس حسين مغير. *العسل الطبيعي مضاداً للطفرة المحدثة بعقار الميثوتركسيت في الفئران البيض.* كلية التربية الأساسية، مجلة جامعة بابل 2011.

21- HUENNEKENS, F.M. (1994). *The methotrexate Story: a Paradigm For development of cancer chemotherapeutic agents.* adv. Enzyme. Regul. 34:397-419.

22- JOHNSTON, A.; GUDJONSSON, J.; SIGMUDSDOTTIR, H.; LUDVIKSSON, B.; VALDIMARSSON, H. *The anti-inflammatory action of MTX is not mediated by lymphocyte apoptosis, but the suppression of activation and adhesion molecules.* Clin. Immunol. 2005, 114: 154-163.

23-KASAHARA, Y.; WAKATA, A.; NAKAI, Y.; YAGI, K.; HIRABAYSHI, K. and MAKITA, T. Mechanism of induction of micronuclei and chromosome aberrations in mouse bone marrow by multiple treatment of methotrexate. Mutat. Res. 1992, 280:117-128.