

دراسة التشوهات الخلقية والنسجية للمعاملة بالعقار Methotrexate والعقار Rituximab في الفئران البيض

وجدي صبيح صادق ، نهى حسام عبد الوهاب

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

أجريت الدراسة الحالية بهدف تقييم التأثيرات الخلقية والنسجية للعقارين Methotrexate (MTX) و Rituximab (RTX) في الفئران البيض المختبرية المعاملة بالحقن داخل الخلب عند اليوم التاسع من الحمل والتضحية بالحيوانات عند اليوم الثامن عشر من الحمل ودراسة التشوهات المظهرية للأجنة. كما تم استخدام نماذج من أنسجة (الكبد، الكلية والقلب) في الإناث الحوامل وغير الحوامل و(الرئتين والطحال) في الإناث الحوامل للفئران البيض السويسرية *Mus musculus*. أظهرت النتائج أن المعاملة تسببت في إجهاض مع الجرعتين 5 و 10 ملغم/كغم وزن جسم من العقار MTX والجرعة 10 ملغم/كغم وزن جسم من العقار RTX و 5 ملغم/كغم وزن جسم MTX + 5 ملغم/كغم وزن جسم. كما تبين حدوث تشوهات في الهيكل العظمي للأجنة مع الجرعة 5 ملغم/كغم وزن جسم من العقار RTX. أما عند تجريعهما سوية فقد تبين ظهور تشوهات في الأجنة تمثلت بحصول تشوهات في الفقرات العنقية والقطنية وعظام الجمجمة وفي الأطراف والفقرات الذيلية. كما تبين حدوث تغيرات نسجية تمثلت بحصول توسف في خلايا النيبات الكلوية، النزف، الأحتقانات، وإرتشاح الخلايا اللمفية ومرحل مختلفة من التنخر والموت المبرمج للخلايا في الكبد والكلى والطحال والرئتين، تمزق جدران الحويصلات الهوائية وحصول تضخم في خلايا القلب وزيادة في الأتوية كانت أشد في الحيوانات المعاملة بالعقارين سوية مقارنة بالمعاملة بأحد العقارين عند الجرعة 5 و 10 ملغم/كغم وزن جسم منفصلة. تقترض الدراسة الحالية ان للعقارين MTX و RTX تأثيرات سمية وراثية وسمية خلوية بالاستناد على النتائج التي اوضحت ان المعاملة بالجرعة 5 و 10 ملغم/كغم وزن جسم MTX، 10 ملغم/كغم وزن جسم RTX و 5 ملغم/كغم وزن جسم MTX + 5 ملغم/كغم وزن جسم تسببت في حدوث الاجهاض وان الجرعة 5 ملغم/كغم وزن جسم RTX تسببت في حدوث تشوهات خلقية في الاجنة. ان المعاملة بالعقارين سوية كانت أقل تأثيراً على نشوء الأجنة اذ لوحظ عدم حصول اجهاض إلا انه سبب تشوهات نسجية وتيراتوجينية.

المقدمة

Active RA. إذ يرتبط بصورة مباشرة بعامل تتخر الورم الذائب Soluble tumor necrosis factor (sTNF) الموجود بالغشاء الخلوي، ويوقف فعالية السايبتوكاينيز ويحفز توقف دورة الخلية وحتى موت الخلية المحفز بالسايبتوكاينيز [3]. و RTX ضد موجه للخلايا البائية وبالتحديد المستضد CD20+ وهو بروتين سكري يعبر على سطح الخلايا البائية منذ المراحل الأولى لتطورها حتى تمايزها النهائي الى خلايا بلازمية مولدة للأضداد [4]. ويستخدم هذا العقار في معالجة مرضى RA بالتزامن مع MTX إذ يحسن من أعراض المرض ويعيق تقدم الضرر العظمي [5].

إن استخدام Rituximab و MTX يكون أكثر فعالية في علاج الروماتيزم وقد لوحظ تحسن في حالة المرضى المعالجين بالعقارين سوية [6]. وتم ملاحظة زيادة في خطر الإصابة بسرطان الخلايا اللمفية Lymphoma وتنشيط الأصابات الأنتهازية infections Opportunistic المسببة للتدرن الرئوي (Tuberculosis (TB) ومرض تليف الأكياس الرئوية Pneumocystitis والأمراض الأخرى في المرضى المعالجين بالأدوية المضادة لعامل تتخر الورم [7]. تهدف الدراسة الحالية الى تقييم التشوهات والنسجية للعقارين Methotrexate (MTX) و Rituximab (RTX) بصورة منفردة وسوية في الفئران البيض المختبرية من خلال دراسة التأثيرات النسجية

'يعد إتهاب المفاصل الرثوي (RA) Rhumatoid arthritis من أمراض المناعة الذاتية غير المتخصصة بعضو [1]. ويتميز هذا المرض بتلف متزايد ومتقدم للمفاصل نتيجة زيادة إفراز الحركيات الخلوية الإتهابية Inflammatory cytokines خصوصاً عامل تتخر الورم الفا (TNF- α) Tumor necrosis factor- α والأبيضاضي الخلوي الأول (IL-1) Interleukin-1. وتحفز هذه الحركيات الخلوية الإنزيمات المحللة للنسيج والتي تهاجم الكولاجين Collagen والبروتوكلايكان Protoglycan وهذا يقود لتحلل الغضروف والعظام القريبة منه والأنسجة المحيطة أيضاً [2]. وإن التدابير الواجب إتخاذها مع مرضى إتهاب المفاصل الرثوي تتضمن العلاج المبكر ببعض الأدوية، ومن بين أكثر هذه الأدوية شيوعاً عقار Methotrexate (MTX) الذي يعود إلى مجموعة الأدوية المضادة للروماتيزم المحورة للمرض Disease-modifying Anti-rhumatic drugs (DMARDs). خلال العلاج بالميتوتريكسيت MTX يحدث تسمم خلوي حاد، وهذا التسمم مرتبط بتأثيرات سريرية سلبية مثل التسمم الكبد والكلي والرئوي وأحداث معوية وعدم إنتظام تكاثر الخلايا اللمفية. ولوحظ تحسن في نتائج العلاج للروماتيزم بإستخدام علاجات جديدة تعادل السايبتوكاينيز الأتهابي IL-1 وعامل تتخر الورم الفا TNF- α . "إن العقار Rituximab هو ضد هجين (كايبري) أحادي النسيلة ويستخدم حالياً لمعالجة الروماتيزم النشط

- **التشريب:** - شربت العينات بمزيج من شمع اليرافين المنصهر والزليلين بدرجة 57-60°م

- **الظفر:** - طمرت العينات بنفس نوع الشمع المستعمل بالتشريب.

- **التشذيب والتقطيع:** - جرى تشذيب القوالب بواسطة شفرة حادة وبعدها تمت عملية التقطيع بواسطة المشراح الدوار.

- **التلوين:** - تم التصبيغ باستخدام صبغة الهيماتوكسيلين نوع هارس لمدة 5 دقائق وصبغة الأيوسين لمدة (15 - 30) ثانية.

- **الأرساء:** - تم تغطية الشرائح بمادة ال D.P.X. لغرض الأرساء لكونها أسرع جفافاً .

وتم فحص المقاطع النسجية المحضرة بإستعمال المجهر الضوئي التصويري Olympus Light Microscope وتصوير البيانات الأحصائية بإستخدام برنامج الحقيبة الإحصائية للعلوم الاجتماعية Statistical Package Social Science (SPSS) والاختبار التائي (t-test).

النتائج والمناقشة

1- التشوهات الخلقية

يبين الجدول (1) متوسط عدد الاجنة في قرني الرحم لكل من مجاميع السيطرة السالبة والمعاملة بالجرعات المحددة من العقارين MTX و RTX ويبين الشكل (1) جنين لحيوان من مجموعة السيطرة السالبة و جنين لفأرة معاملة بالجرعة 5 ملغ/كغم وزن جسم من العقار RTX و جنين لفأرة معاملة بالجرعة 10 ملغ/كغم وزن جسم MTX و جنين لفأرة معاملة بالجرعة 10 ملغ/كغم وزن جسم MTX + 5 ملغ/كغم وزن جسم RTX و جنين لفأرة معاملة بالجرعة 5 ملغ/كغم وزن جسم MTX + 10 ملغ/كغم وزن جسم RTX و جنين لفأرة معاملة بالجرعة 5 ملغ/كغم وزن جسم MTX + 10 ملغ/كغم وزن جسم RTX.

اظهرت النتائج أن المعاملة بالعقار MTX تسببت في حدوث نسبة عالية من الأجهزة مع الجرعتين 5 و 10 ملغم/كغم وزن جسم ويمكن ان يعزى ذلك بسبب خفضه لهرمون الحمل Chorionic gonadotropin (CG) إذ يستخدم العقار MTX لتحفيز الأجهزة طبيعياً قبل إعطاء ال Misoprostol [10]. كما تبين حدوث تشوهات في العمود الفقري في الفقرات العنقية والصدرية والقطنية والعجزية الشكل (1). وتكون الفقرات الذيلية مشوهة وصغيرة ويكون الذيل معقوفاً. كذلك فان الأطراف الأمامية والخلفية تكون قصيرة مقارنة بالسيطرة السالبة. وكان عدد الفقرات الذيلية في 5 أجنة 24 فقرة وفي جنينين 20 فقرة، وبالنسبة للتشوهات في الجمجمة والعمود الفقري فكانت جميعها متشابهة. وتتفق هذه النتائج مع ما لاحظته [11]. إذ لاحظ حصول تخلف في النمو، تشوهات في اليد، إختلالات قحفية وجهية Carniofacial anomalies، عظمية وخلقية. وتتضمن الأختلالات القحفية الوجهية الأنف الصغير، غياب لهأة الحلق، كبر حجم الرأس، 11 زوج من الأضلاع، وفقرات قطنية غير مرتبة.

في الاناث الحوامل وغير الحوامل و دراسة التشوهات الخلقية لاجنة الامهات الحوامل بعد معاملتها في اليوم التاسع من الحمل.

المواد وطرائق العمل

تصميم التجارب: 1. مجموعة السيطرة السالبة، 2. مجموعة الجرعة 5 ملغم MTX، 3. مجموعة الجرعة 5 ملغم RTX، 4. مجموعة الجرعة 5 ملغم MTX + 5 ملغم RTX، 5. مجموعة الجرعة 10 ملغم MTX، 6. مجموعة الجرعة 10 ملغم RTX، 7. مجموعة الجرعة 5 ملغم MTX + 10 ملغم RTX، 8. مجموعة الجرعة 10 ملغم MTX + 5 ملغم RTX.

طرائق العمل: تم اعطاء الجرعات لإناث الفئران غير الحوامل وتم تشريحها بعد مرور 24 ساعة بطريقة فصل الفقرات العنقية وإناث الفئران الحوامل في اليوم التاسع من الحمل وشرحت في اليوم 18 من الحمل. وتم تصبيغ الهيكل العظمي بطريقة الصبغ التائي بالأليزارين الحمراء و الأليسين الزرقاء للأجنة [8]. مع بعض التحويرات وكما يأتي:

* **عملية تحضير الأجنة و تثبيتها:** - بعد قتل الفأرة تم اخراج الرحم وعزلت الأجنة منها وتم وضعها لمدة 10 أيام في كحول أثيلي 95%، ثم إخراج الأجنة من الكحول ووضعها في الأسيوتون المطلق لمدة 24 ساعة لأزالة الدهون منها. وكانت نسبة الكحول والأسيوتون أكبر من حجم الجنين بعشرة أضعاف.

* **عملية التصبيغ الهيكل العظمي للأجنة:** - تم التصبيغ بدرجة حرارة 40 م° لمدة 4 أيام، وتم استخدام 100 مل من محلول الصبغ المزدوج لكل جنين، وتم غسل الأجنة المصبوغة بماء الحنفية لمدة ساعتين.

* **عملية الترويق:** - جرى نقل الأجنة إلى محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 2% لمدة 3 أيام ونقلت الأجنة بعدها إلى جليسيرين 20 % يحتوي على 1% KOH حتى يصبح الهيكل واضح من بين الأنسجة المحيطة. نقلت الأجنة بعدها إلى تراكيز تصاعدية من الجليسيرين 50%، 80%، وأخيراً 100% لمدة 7 أيام في كل خطوة. * تم حفظ العينات في جليسيرين 100% مضافاً له بلورات من الثايمول لمنع تكون الأعفان وتمت القراءة بالأعتقاد على إستمارات قياسية.

كما تم تحضير المقاطع النسيجية حسب ما ذكر [9] وكما يأتي.

- **التثبيت:** - تُبَتَّ الاعضاء بمثبت الفورمالين 10 % لمدة 24 ساعة.
- **الغسل:** - غسلت العينات بماء الحنفية الجاري لمدة نصف ساعة لإزالة أكبر قدر ممكن من بقايا المثبت من النسيج.
- **الأنكاز:** - مررت العينات بسلسلة تصاعدية من تراكيز الكحول الأثيلي الأثيلي 70 %، 80 %، 90 % و 100% ولمدة 30 دقيقة لكل تركيز.

- **الترويق:** - أستعمل الزليلين لغرض الترويق، وذلك لخاصيته في جعلها أكثر شفافية إذ وضعت العينات فيه على مرحلتين كل منها 20 دقيقة.

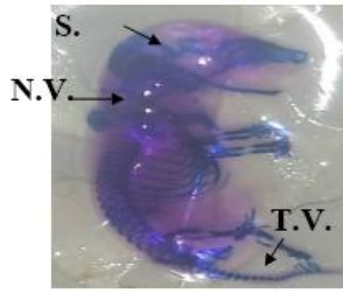
جدول (1) يوضح أعداد الأجنة في كل من مجموعة السيطرة والمجموعات المعاملة بالعقار MTX والعقار RTX.

ت	معاملة جرعة ملغم/كغم. وزن جسم	عدد الحيوانات	عدد الاجنة في الرحم متوسط \pm خطأ قياسي	عدد الاجنة في القرن الايمن متوسط \pm خطأ قياسي	عدد الاجنة في القرن الايسر متوسط \pm خطأ قياسي
1	السيطرة السالبة	5	0.67 \pm 6.40	0.48 \pm 3.20	0.48 \pm 3.20
2		5			
3	5ملغ MTX	5	**0.67 \pm 6.40	*0.48 \pm 3.20	**0.37 \pm 3.20
4	10ملغ MTX	5	2.01 \pm 4.60	2.01 \pm 0.60	1.90 \pm 0.60
5	5ملغ RTX	5	1.06 \pm 1.12	0.66 \pm 0.20	**0.63 \pm 1.00
6		5			
7	10 ملغ RTX	5	0.67 \pm 6.40	*0.48 \pm 3.20	**0.37 \pm 3.20
8	5 ملغ RTX + 5 ملغ MTX	5	0.67 \pm 6.40	*0.48 \pm 3.20	0.37 \pm 3.20
	10ملغ RTX + 5 ملغ MTX	5	1.63 \pm 2.40	0.80 \pm 0.20	0.67 \pm 0.60
	5ملغ RTX + 10ملغ MTX	5	**1.31 \pm 0.80	0.92 \pm 1.60	0.73 \pm 0.80

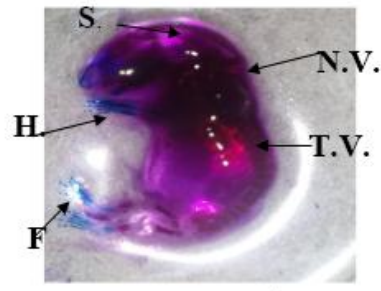
* معنوي عند مستوى $p \leq 0.05$, ** معنوي عند مستوى $P \leq 0.01$.

RTX + 5 ملغم/كغم (RTX) لم يترافق مع حدوث الإجهاض. بالوقت نفسه كانت هناك تشوهات في الجمجمة والهيكل العظمي والطرفي مع الجرعة 5 ملغم /كغم MTX + 10ملغم/كغم RTX وكانت الأطراف غير طبيعية إذ تكون الأصابع طبيعية ولكن الخلل بمناطق الأتصال في جميع الأجنة المعرضة لهذه الجرعة ويمكن ان يعزى ذلك الى التأثير المتعارض للعقارين فيكون التأثير المشترك اقل حدة على الاجنة النامية وما يعزز هذا الافتراض حدوث تشوهات خلقية في اجنة الاناث الحوامل التي تمت معاملتها بالعقارين سوية. كما يلحظ إن الفقرات الذيلية تكون غير طبيعية إذ تكون قليلة العدد مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (13منها تحتوي على 11 فقرة ذيلية، 5 أجنة تحتوي على 9 فقرات ذيلية، وجنينين يحتويان على 15 فقرة ذيلية وجنين يحتوي على 20 فقرة ذيلية) وشكل الفقرات غير طبيعي إذ تكون بيضوية أما بالنسبة للأطراف الأمامية والخلفية فتكون موجودة وغير طبيعية في جميع الأجنة.

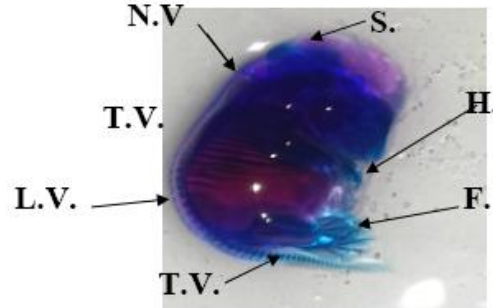
تبين حدوث إجهاض في المجموعة المعاملة بالجرعة 10 ملغ RTX. كما تسببت المعاملة بالجرعة 5 ملغم/كغم وزن جسم من العقار RTX في حدوث تشوهات في العمود الفقري والجمجمة وكانت الفقرات العنقية أثرية والأطراف الخلفية مشوهة و تتفق هذه النتائج مع ما ذكره [12]. إذ أشار الى حدوث الإجهاض عند النساء الحامل مع التعرض لل RTX بجرع عالية خصوصاً خلال الأشهر الثلاثة الأولى من الحمل. وبعد RTX غلوبين مناعي IgG عابر للمشيمة وتم تسجيل حالات ولادة مبكرة وإستنفاد للخلايا البائية للأجنة المعرضة لل RTX وكان مستوى التشوهات كبيراً عند التعرض خلال الأشهر الثلاثة الأولى من الحمل ولم تسجل تشوهات كبيرة عند تعرض الأجنة للعقار خلال الأشهر الثلاثة الثانية والثالثة من الحمل. و يبدو واضحاً إن إستخدام العقارين سوية وبجرعات متساوية سبب إجهاضاً لدى الفئران المعاملة بالجرعة 5 ملغم /كغم +5ملغ/كغم MTX RTX بينما تظهر نتائج هذه التجربة إن إستخدام MTX و RTX بجرعات مختلفة (5ملغم /كغم MTX + 10ملغم/كغم RTX; 10ملغم /كغم



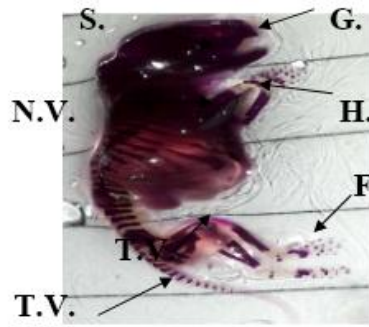
B- جنين لفأرة معاملة بالجرعة 5 ملغ RTX



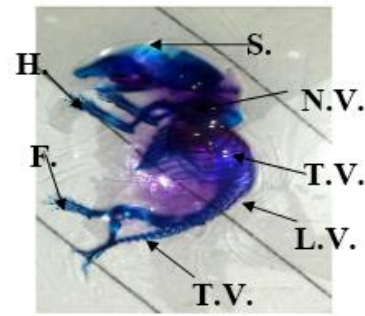
A- جنين لفأرة من مجموعة السيطرة السالبة



C - جنين لفأرة معاملة بالجرعة 10 ملغ/كغ MTX



E- جنين لفأرة معاملة بالجرعة 10 ملغ/كغ MTX + 5 ملغ/كغ RTX



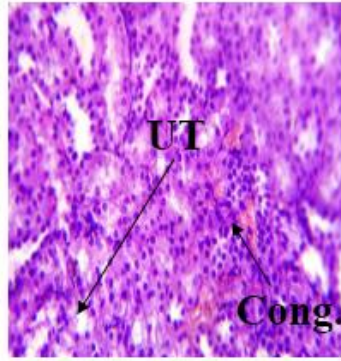
D- جنين لفأرة معاملة بالجرعة 5 ملغ/كغ MTX + 10 ملغ/كغ RTX

الشكل (1) (Alizarin red + Alcian blue). 1. فقرات عنقية (N.V.). 2. الفقرات الصدرية Thoracic vertebrae (T.V.). 3. الفقرات الذيلية (T.V.). 4. الفقرات القطنية (L.V.). 5. الجمجمة (S.). 6. القدم (F.). 7. اليد (H.). 8. الفك (G).

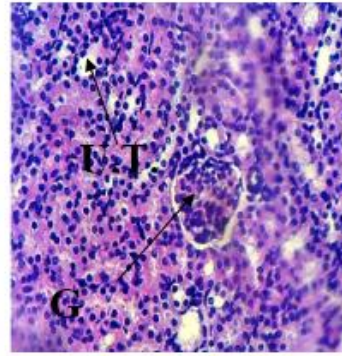
بالنسبة للعقار RTX إذ تبين ان قابليته على احداث الموت الخلوي بنوعيه ومراحلهما المختلفة لا تختلف عن العقار MTX فضلا عن تدمير الأوعية الشعرية الدموية الذي تسبب في حدوث النزف في نسيج الكلية والأحتقان الدموي وإرتشاح الخلايا اللمفية الشكل (2). وإن هذه الاضطرابات ترجع لكون الكلية من الأعضاء الحساسة في الجسم وهي الموقع الرئيس لطرح السموم من الجسم [13].

التأثيرات النسرجية

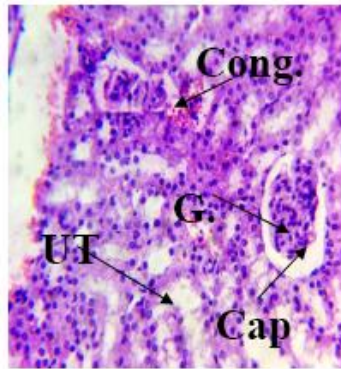
اظهرت النتائج ان العقارين MTX و RTX سببا سمية كلوية بدرجات مختلفة بعد المعاملة بصورة منفردة أو سوية وازدادت الاضرار الناتجة في الكلى مع زيادة الجرعة اذ كانت الاضرار عند الجرعة 5 ملغم/كغ وزن جسم أقل من الاضرار التي سببتها الجرعة 10 ملغم/كغ MTX. وعند مقارنة الاضرار التي حصلت في كلى غير الحوامل مع كلى الحوامل كان العقار اشد فتكاً بالحوامل وكذا الحال



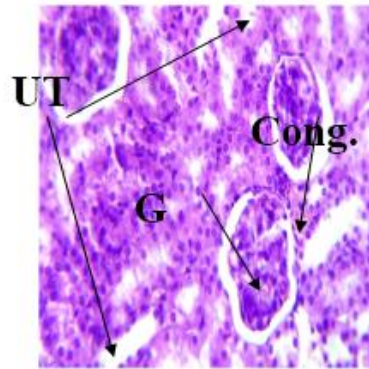
B- معاملة بالجرعة 5 ملغم/كغم وزن جسم MTX



A- مجموعة السيطرة السالبة



D- معاملة بالجرعة 5 ملغم/كغم MTX + 5 ملغم RTX

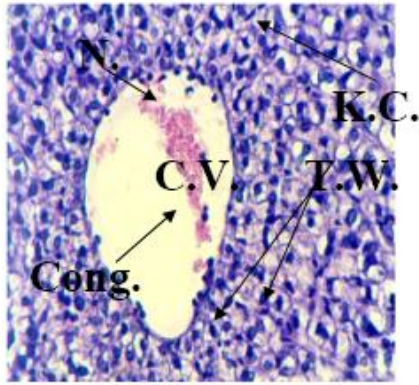


C- معاملة بالجرعة 10 ملغم/كغم RTX

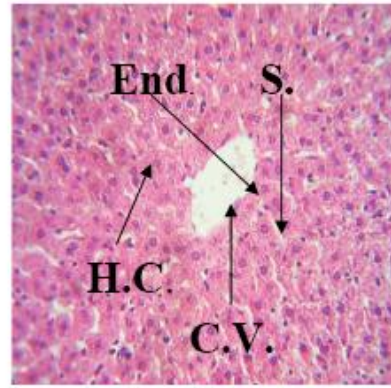
الشكل (2) مقطع نسيجي كلوية فأرة 1. الكبيبة G 2. النبيبات البولية UT 3. احتقان Cong. 4. النبيبات البولية U.T. محفظة بومان (400X)H & E . Cap.

ويتضح من الشكل (3) إن العقارين لهما أضرار شديدة على الكبد عند المعاملة بكل عقار لوحده وسوية وجرعات مختلفة وكانت الأضرار معتمدة على الجرعة إذ يلاحظ حدوث الأرتشاح الخلوي ويرى [15]. ان هذا ما يدل على حدوث ضرر في الكبد أدى الى إفراز عوامل الجذب الكيمياوي للخلايا اللمفية الى مناطق الضرر . وكذلك حصول أنتفاخ للخلايا الكبدية الذي قد يعود الى حصول خلل في الغشاء البلازمي مؤدياً الى دخول المواد بشدة أو خروجها وبالتالي تضخم الخلية أو إنكماشها حسب اتجاه الخلل في التوازن بين العناصر الموجودة وأملحها وهذا يؤثر في التراكيب الخلوية الداخلية مما يتسبب في مرور الخلية بمراحل الموت المبرمج [16] .

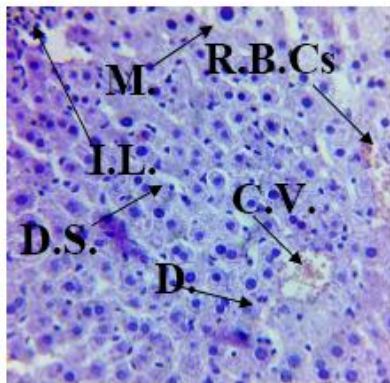
وأشار [14] إلى أن من أسباب نخر النبيبات الكلوية هو تسمم وموت الخلايا النبيبية نتيجة عدم حصولها على كفايتها من الأوكسجين إذ أن فعاليتها الأيضية تعتمد على الأوكسجين الذي تزودها به الأوعية الدموية وإن أي ضرر يحدث للأوعية الدموية من تخر أو ضيق يؤدي الى ضعف جريان الدم وبالتالي قلة تزود الخلايا بالأوكسجين. وأشار [13]. بأن الضرر ممكن أن يصيب النبيبات الكلوية والكبيبات على حد سواء نتيجة التسمم أو الأمراض الأخرى وعزى سبب ذلك الى نقص الترشيح الكبيبي نتيجة إنخفاض جريان الدم في الكلية وفرط الضغط بسبب ضرر الأوعية الدموية وأن الأذى الكبيبي يؤدي الى تسرب كريات الدم الحمر والتي تظهر في الأدرار عند وجود أرتشاح كبيبي حاد كما يحدث في بعض أشكال التهاب الكبيبات الكلوية.



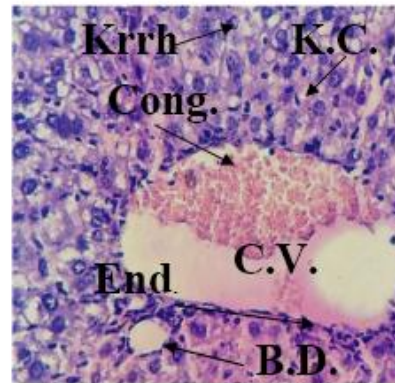
B- معاملة بالجرعة 10 ملغ MTX



A- مجموعة السيطرة السالية



D- معاملة بالجرعة 5 ملغم MTX + 10 ملغم RTX

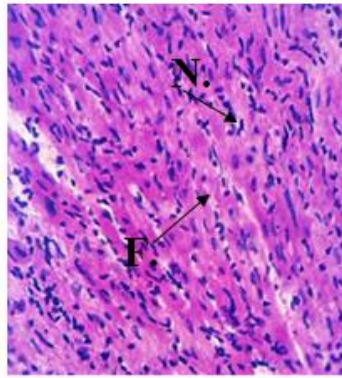


C - معاملة بالجرعة 5 ملغم وزن جسم

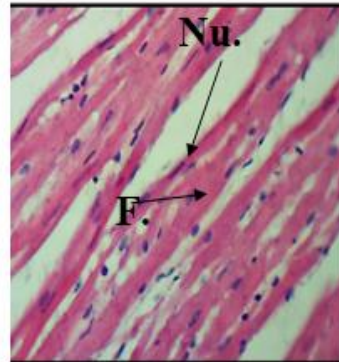
الشكل (3) مقطع نُسجي لكبد فأرة 1 . خلايا كوففر .K.2.الوريد المركزي .C.V. 3 . كريات الدم الحمراء R.B.Cs. 4 . خلايا بلعمية M. 5 . جيبانيات متوسعة .D.S. 6. إرتشاح خلايا لمفية .I. L.

متحللة، أما بالنسبة للجرعة 10 ملغ MTX + 5 ملغم RTX فسببت فقدان الألياف لترتيبها والأنوية في مراحل مختلفة من التحلل في قلب غير الحامل، أما بالنسبة لقلب الفأرة الحامل المعاملة بالجرعة المذكورة فهناك تنكس في حزم العضلات القلبية إذ أن الحزمة تكون غير مستمرة كالحالة السوية والأنوية تكون صغيرة في بعض الأماكن بسبب تلف العضلات القلبية إذ تتجمع الخلايا العضلية والتي تكون موزعة على طول أشرطة العضلات القلبية في الحالة الطبيعية ولم تجد دراسات نُسجية عن تأثير العقارين على القلب لعرضها.

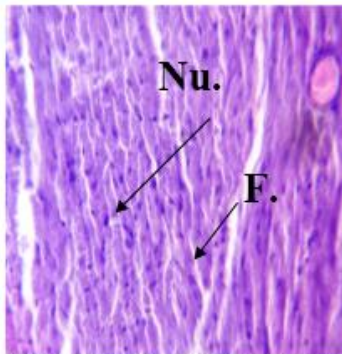
ويظهر الشكل (4) إن المعاملة بالعقارين MTX و RTX تتسبب في أضرار على القلب في إناث الفئران الحوامل وغير الحوامل ويكون التأثير معتمدا على الجرعة، إذ إن المعاملة بالجرعة 5 ملغم MTX زادت من كثافة الألياف والأنوية وأغلب الأنوية صغيرة الحجم أو متقلصة وهناك إرتشاح خلايا الدم البيض الالتهابية. أظهر الفحص النُسجي لقلب الفئران الغير حامل المعاملة بالجرعة 10 ملغم RTX عدم وضوح الألياف وأمتازت بكثافة الأنوية الكبيرة الحجم، أما بالنسبة للحامل فتكون الألياف العضلية القلبية فاقدة للترتيب والأنوية أغلبها



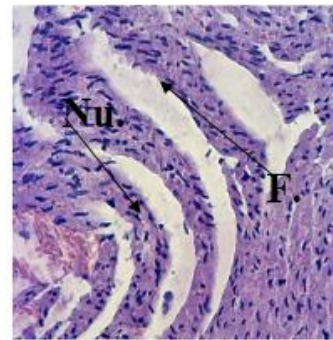
B - معاملة بالجرعة 5 ملغم/كغم وزن جسم MTX



A - مجموعة السيطرة السالبة



D - معاملة بالجرعة 10 ملغم/كغم MTX + 5 ملغم/كغم RTX

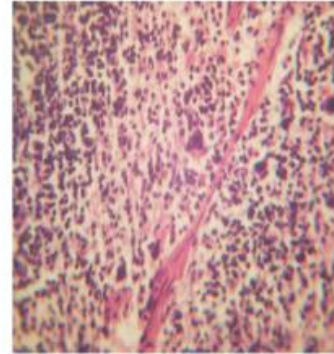
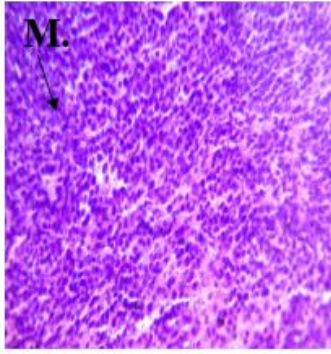


C - معاملة بالجرعة 10 ملغم/كغم RTX

الشكل (4) مقطع نُسجي للقلب D - 1. الياف F. 2. نواة Nu. H & E (400X)

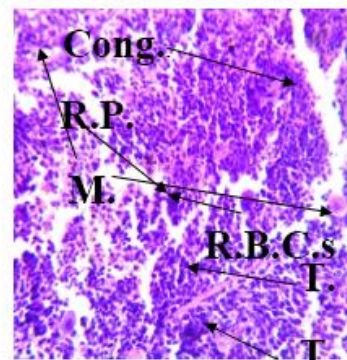
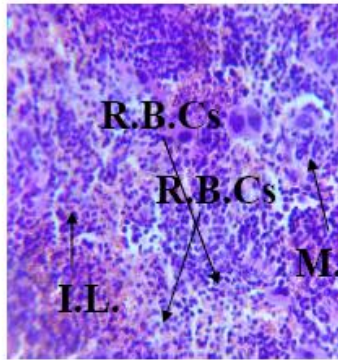
ويبين الشكل (5) تأثير المعاملة بالعقارين على الطحال إذ سببت الجرعة 10 ملغم MTX كثافة في الخلايا ووجود النزف الدموي والخلايا البلعمية منتشرة في عموم النسيج وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل إليه [17]. إذ لاحظ وجود الأحتقان وتضخم للطحال عند المعاملة مع MTX مع وجود تدرجات من تراكم صبغة الهيموسيدرين

ويعتقد أن سبب وجود نزف دموي في عموم النسيج وانتشار واسع للخلايا اللمفية والبلعمية مع وجود تحلل للخلايا في نسيج الطحال لاناث الفئران المعاملة وتظهر المعاملة بالعقارين سوية إنتشار نزف دموي في عموم النسيج وكثرة وجود الخلايا البلعمية العملاقة.



الجرعة 10 ملغم/كغم وزن جسم MTX -B

مجموعة السيطرة السالفة -A



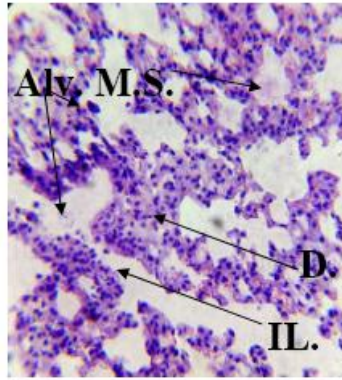
الجرعة 5 ملغم/كغم MTX + 5 ملغم/كغم RTX -D

الجرعة 5 ملغم/كغم RTX -C

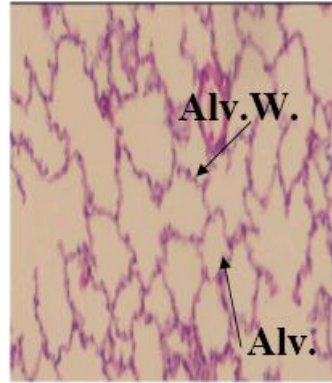
الشكل (5) مقطع نُسجي للطحال 1. خلايا بلعمية M. 2. كريات الدم الحمراء. R.B.Cs. 3. ارتشاح الخلايا اللمفية IL. 4. الحويصلات T. 5. اللب الأحمر R.P. H & E (400X).

القصبية الهوائية مع تسمك جدران الحويصلات الهوائية وعند المعاملة بالعقارين سوية تكون أحجام أغلب الحويصلات الهوائية طبيعية مع بعض الاستثناءات من تلف في جدران الحويصلات الهوائية وهناك أنتشار لكريات الدم الحمر والخلايا اللمفية في عموم النسيج الخلاي للثة مع وجود طبقة خفيفة من المادة المخاطية في بطانة الحويصلات الهوائية مع وجود قسم من الخلايا الحويصلية التي يظهر فيها النخر الساييتوبلازمي والتحلل النووي، أما القصبية الهوائية فتظهر فيها المادة المخاطية بكثافة مؤدية الى انسداد كلي أو جزئي للقصبية مع وجود الفجوات وفي أماكن أخرى يظهر تثخن لجدار الحويصلات الهوائية نتيجة أنتفاخ الخلايا المتكونة من الساييتوبلازم والنواة.

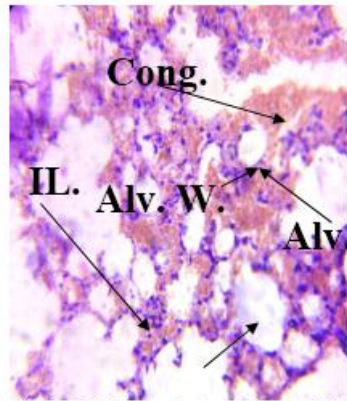
كما يظهر الشكل (6) التأثيرات الناتجة عن المعاملة بالعقارين MTX و RTX في انسجة الرئة لاناث الفئران الحوامل إذ ظهر الفحص النُسجي لرئة فأرة معاملة ب 5 ملغم MTX زيادة في سمك الحويصلات الهوائية وقلة أعدادها والخلايا في جدران الحويصلات تعاني من النخر الساييتوبلازمي والتحلل النووي ووجود طبقة رقيقة من المادة المخاطية في بطانة قسم من الحويصلات الهوائية مع انتشار النزف في نسيج الرئة المتمثل بوجود كريات الدم الحمر و الخلايا اللمفية في جدران الحويصلات الهوائية وكذلك حدوث ارتشاح للخلايا اللمفية. أما في الفئران المعاملة ب RTX فتكون الحويصلات الهوائية سميكة الجدران ويوجد نزف شديد ومنتشر في عموم نسيج الرئة، وكذلك وجود المادة المخاطية Mucous substance في النسيج وفي



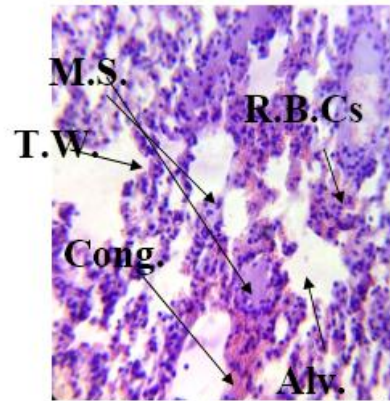
B- معاملة بالجرعة 5 ملغم/كغم وزن جسم MTX



A- مجموعة السيطرة السلبية



D - معاملة بالجرعة 10 ملغم/كغم RTx



C- معاملة بالجرعة 5 ملغم/كغم RTx

الشكل (6) مقطع نُسجي للرئة 1 . الحويصلات الهوائية. Alv. 2. إحتقان. Cong. 3 . إرتشاح الخلايا اللمفية. IL. 4. مادة مخاطية . M.S 5 . جدار الحويصلة. Alv. W. 6. كريات دم حمراء. R.B.Cs. 7. جدار متسك. T.W. 8. تحلل نووي. D. (400X) H & E

وجودهما سوية يقود الى التخفيف من التأثير السمي الوراثي لهما لكنه يترك تأثيرات سمية خلوية تقود الى تشوهات خلقية أي ان تأثيرهما المشترك يكون تيراتوجيني.

إستنتجت الدراسة الحالية ان للعقارين تأثيرا منفردا أدى الى الاجهاض بينما أدى تأثيرهما المشترك الى تشوهات نُسجية في الامهات وتشوهات خلقية في الاجنة النامية للامهات الحوامل وان هذا يمكن ان يعزى الى الخصائص السمية الوراثية والسمية الخلوية للعقارين وان

المصادر

- E. C.; Loveless J. E.; Burmester, G.; Cravets, M.W. Hesse, E.W.; Shaw T. and Mark C. Totoritis. (2006). Rituximab for Rheumatoid arthritis refractory to Anti-Tumor necrosis factor therapy. ACR. Vol. 54. No.9. PP2793-2806.
- [7] Jarmalaite, S.; Dedonytė, V.; Mierauskiene, J.; Simkutecot, L. J. Ranceva, J. and Butrimiene, I. (2008). Cytogenetic effects of treatment with methotrexate and infliximab in rheumatoid arthritis patients. BIOLOGIA. 54. No. 1. PP. 7–11.
- [8] Erdogan, D.; Kadiodla D. and Peker T. (1995). vsualisation of fetal skeletal system by double staining with alizarin red and alcian blue. Gazi Medical J. 6:55-8.
- [9] الحاج، حميد احمد (2010). التحضيرات المجهرية الضوئية (التقنيات المجهرية). الاسس النظرية والتطبيقات ط1. مركز المكتب الاردني. عمان- الاردن.
- [10] King Edward Memorial Hospital (KEMH). (2016). Abnormalities of early pregnancy; Ectopic

- [1] الحفاظي, سناء رحمن (2005). دراسة بعض الجوانب المناعية للمرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي وعلاقتها ببدء النوبات الاحمراري. رسالة ماجستير - علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة بغداد.
- [2] Strand V.; Kimberly, R. and Issacs J. D. (2007). Nature Reviews Drug Discovery;75-92.
- [3] Keshava, C.; Keshava N.; and Wong W et al. (1998). Mutate Res;60:729-35.
- [4] Looney, R.J.; Anolik, J. and Sanz I. (2004). B lymphocytes in systemic lupus erythromatuses in Looney RJ, Huggins J. (2006). Use of intravenous immunoglobulin G. Best Pract Res Clin Haematol;19:3–2.
- [5] Reff, M. E.; Carner, K.; Chambers, K.S.; Chinn, P.C.; Leonard, J.E. and Raab, R. et al. (1994). Depletion of B-cells invivo by achimeric mouse human monoclonal antibody to CD20+. Blood. 83:435-45.
- [6] Stanly, B.; Emery, C. P.; Greenwald, M. |W.; Dougados, M.; Furie, R.A.; Genovese, M.C.; Keystone,

[14]Krishna, V. (2004). Text book of pathology. 1st ed. Orient Longman Private Limited. India. Pp:538,564. [15] Laksin, D.L.; Laksin, J. D.(2001). Role of Macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology* .160,pp:111-118.

[16] الدليمي, حسن علي مطر(2004). دراسة تأثير السيلينيوم والزنك في بعض الجوانب المناعية والنسجية في خنازير غينيا. أطروحة دكتوراه-كلية العلوم-جامعة الأنبار.

[17]Patel, N. N.; Ghodasara, D. J.; Sunanda Pandey, Priya D. Ghodasara, J. H. Khorajiya, B. P. Joshi and C. J. Dave. (2014). Subacute toxicopathological studies of methotrexate in Wistar rats. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.

pregnancy. Medical managment of ectopic pregnancy .Rev.

[11]MacDonald, K.; Norman, W.V. and Popescu, O.(2013) New anomalies due to methotrexate and misoprostol exposure in early pregnancy. *Brief communications.*: wendy. norman@ubc.ca(W.V. Norman).

[12] Chakravarty, E. F.; Murray, E.R.; Kelman A. and Pamela F. (2010). Pregnancy outcomes following maternal exposure to rituximab. *bloodjournal. hematologylibrary. org. doi: 10.1182/ blood - 2010-07-295444.*

[13]Anderson, C.B.E. (1980). *Murins Text book of pathology*. British library cataloging in publication data, London.

The Study of Teratogenic and Histological effects of treatment with Methotrexate and Rituximab in Swiss White Mice

Wajdi SabeH Sadek , Nuha Hussam Abed el-Wahab

Biology Department , Collage of Science, Tikrit University , Tikrit , Iraq

Abstract

The present study was conducted to evaluate teratogenic and histopathological effects of two drugs Methotrexate (MTX) and Rituximab (RTX)) in Swiss white mice *Mus musculus* by intra-peritoneal injectioning at 9 day after gestation, sacrificing of pregnant females at 18 day of pregnancy to study features abnormalities of embryos. (Liver, Kidney and Heart) of pregnant and non pregnant females of mice (Lungs and spleen) of pregnant females used in Histopathological study. The results showed that abortion caused by MTX at 5, 10 mg/kg bw., RTX at 10 mg/kg bw., and 5 mg/kg bw MTX +5 mg/kg bw RTX. The treatment with RTX at 5 mg/kg bw. induces features of skeletal abnormalities in embryos of treated pregnant females. When the pregnant females treated with the both drugs embryos of treated females showed abnormalities in neck, lumbar vertebrae, skull bones and tail vertebrae. Histopathological effects, represented as desquamation in epithelium of kidney tubules, hemorrhage, congestions, infiltration of lymphocytes, necrosis and apoptosis of cells in liver, kidney, spleen, and lungs, damage of alveolar wall, enlargement of heart cells and increasing of nuclei, in treated pregnant females was more than that of non pregnant females. The current study suggest that MTX and RTX had genotoxic and cytotoxic effects, based on indication that 5, and 10 mg/kg.b.wt of MTX, 10 mg/kg b.wt. of RTX and 5 mg/kg bw MTX +5 mg/kg bw RTX caused abortion, 5 mg/kg b.wt. of RTX caused teratogenic features. Treatment with the two drugs simultaneously has less impact on development of embryos as we found no abortion but it caused histopathological effects and congenital abnormalities.