

دراسة التغيرات الكميّة والنسيجيّة في مبايض الفئران البيضاء

المحدثة بعقار أدرياميسين

أنس طويلة، محمود قاسم، يحيى خانجي *

قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة حلب

الملخص

يُعدُّ عقار أدرياميسين Adriamycin من أكثر العقاقير المضادة للسرطان استخداماً في علاج الأورام السرطانية، وفي نفس الوقت أقلها سمية على المستوى الخلوي Cytotoxic، إلا أن تحديد تلك السمية والتأثيرات الجانبية النسيجية لهذا العقار لما تزل تحتاج إلى العديد من الأبحاث والدراسات، ومن هنا أتت هذه الدراسة لتبين التأثير السلبي الذي يُحدثه العقار على البنية النسيجية للمبايض والجريبات المبيضية فيها، وقد أظهرت هذه الدراسة تأثير البنية الخلوية والنسيجية للخلايا الجريبية حيث ظهرت العديد من التغيرات المرضية، فقد تفتت أنويتها وانكمش هيكلها والسيتوبلازماها، مع فقدان الارتباط فيما بينها، كما لوحظ ظهور تبدلات في بنية الغلاف الجربي من ناحية تليف وانضغاط أنويتها، حيث أصبحت ذات شكل مغزلي، أما الخلايا البيضة في الجريبات المبيضية فقد اختفت أنويتها وانكمش غشاؤها الخلوي مع انكماش هيولى البيضة. كما أظهرت الدراسة الكميّة أيضاً انخفاضاً تدريجياً في أوزان المبايض وأوزان أجسام وأحجام حيوانات التجربة عقب عملية الحقن مباشرةً، واستمرت حتى اليوم العاشر من بعد الحقن، ثم بدأ ظهور نوع من التعافي التدريجي بعد ذلك اليوم.

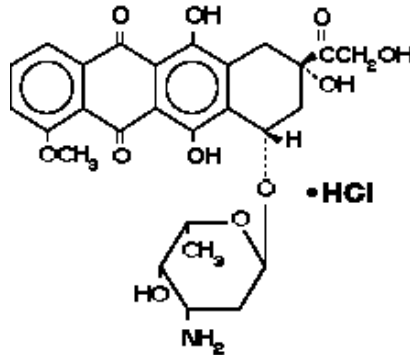
أولاً . المقدمة:

تُعدُّ المواد المستخدمة في العلاج الكيميائي للأورام السرطانية نوعاً خاصاً من السموم الخلوية Cytotoxic، وكذلك الأمر بالنسبة لأغلب المستحضرات

ورد البحث للمجلة بتاريخ ٢٠١٠//١

قبل للنشر بتاريخ ٢٠١٠//١

الكيميائية، رغم أن الهدف منها هو الحصول على تأثير موجه ضد العامل الممرض Pathogen أو مكان المرض [1]، ومعظم العقاقير التي تستخدم في المعالجة الكيميائية للسرطان لها تأثير سميّ على كل من الأنسجة الطبيعية والورمية على حد سواء وحتى في أثناء تطبيق الجرعات المثلى، كما أن الأنسجة الطبيعية السريعة التكاثر هي وللأسف من أكثر المناطق عرضة للتأثر السميّ بهذه العقاقير الكيميائية مقارنة مع الأنسجة الأخرى وهي في طور الراحة، ومن أكثر هذه الأنسجة تأثراً المبايض والخصى [2]. فهما من أهم مناطق الجسم التي يتم وضعها في عين الاعتبار عند إنتاج أي نوع من العقاقير المعالجة للخلايا السرطانية، وعلى الطبيب المختص أن يكون على دراية تامة بالاحتمالات المتوقعة نتيجة استخدام عقار معين، ليحدد السعة والقدرة التناسلية للشخص المعالج بهذا العقار [3]، إذ إن التأثيرات العكسية للعقاقير الكيميائية على الأعضاء التناسلية قد تؤدي إلى تدمير هذه الأنسجة وإلى تبدل في شكل وتركيب الخلايا الجنسية أو تثبيط وظائفها [3]، وخاصة الهرمونية مما ينعكس على الدورة الطمثية عند الأنثى، وعلى عدد الحيوانات المنوية عند الذكر [4]، وفي السنوات الأخيرة ظهرت العديد من العقاقير المضادة للسرطان، ولعل عقار Adriamycin أحد أهم هذه العقاقير المضادة للسرطان وأكثرها استخداماً في العلاج الكيميائي للأورام السرطانية المختلفة [5,6].



شكل رقم (1) يوضح التركيب الكيميائي الفراغي لعقار Adriamycin.

ينتمي هذا العقار إلى مركبات الأنثراسكليينات Anthracyclines والتي تتبع مجموعة المضادات الحيوية المضادة للأورام Antitumer antibiotics، وقد قام العالم

أركامون Arecamone سنة 1969م بعزل الأدرياميسين (الدكسورييسين) من فطر var. *Streptomyces peucetius caesius* [8,7]، وتم تحديد التركيب الكيميائي له فتمثلت صيغته الكيميائية على النحو التالي: $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ ، ووزنه الجزيئي 579.99 M.W.، أما شكله الفراغي فهو يتألف من أربع حلقات سداسية مرتبطة بواسطة حزمة جليكوسيدية Glycosidic band بسكر أميني Amine sugar يسمى الداينوسامين.

وبصورة إجمالية يصنف عقار أدرياميسين من المجموعة الثالثة التي تعمل على قتل الخلايا التي تقوم بالتكاثر مفضلة إياها على الخلايا المتواجدة في طور الراحة، لذلك تُصنّف مع العقاقير ذات السمية الخلوية cytotoxic القليلة [10,9]، إلا أنه يتمتع بتطبيقات علاجية كثيرة في علاج أنواع عديدة من السرطانات الخبيثة، فهو من أكثر فئات العقاقير المضادة للسرطان نجاحاً في علاج السرطانات التي تصيب الإنسان ومنها [11,8].

الجدول رقم (1) يبين مدى قدرة عقار Adriamycin على إحداث التعافي والمدة الزمنية اللازمة لحدوث

التعافي في بعض أنواع الأمراض السرطانات عند الإنسان [8]

الخط الأول في العلاج الكيميائي	متوسط الفترة الزمنية للعلاج (بالأشهر)	معدل الاستجابة (%)	نوع الورم	
√	3-6	35	سرطان الثدي	استجابة كاملة للعلاج بعقار أدرياميسين
?	3-6	38	سرطان المبيض	
?	3	30	سرطان الرئة	
√	4	30	ساركوما	
√	4	66	أورام وليم	
?	4-6	28	سرطان المثانة	
√	4	41	الأورام الأرومات العصبية	
?	4-6	36	أمراض هودجكن	
√	4-6	40	لمفويّات لا هودجكين	
?	3	35	لوكيميا حاد (ابيضاض الدم)	
√	4-6	32	ورم كبيدي	

√?	2-4	30	سرطان المعدة	بعض الاستجابة للعلاج بعقار أدرياميسين
?	2-6	32	سرطان عنق الرحم	
	2-4	20	سرطان الرأس والعنق	
	3-6	19	سرطان الخصية	
√?	3	33	سرطان نخاع العظم المتعدد	
	4-6	36	سرطان بطانة الرحم	عدم حصول استجابة بالمعالجة بعقار أدرياميسين
			سرطان الكولون	
			سرطان البنكرياس	
			أورام الكلى	
			أورام الفيتاميني	
			أورام الدماغ	

ثانياً . هدف البحث :

على الرغم من أهمية عقار Adriamycin في معالجة الأورام السرطانية المختلفة، إلا أن الأبحاث التي درست تأثيراته النسيجية مازالت قليلة، وخاصة على أنسجة المبايض، وهذا ما دفعنا في هذا البحث إلى التركيز على دراسة التبدلات الشكلية النسيجية Morphological changes، والتغيرات الخلوية Cytological changes، والتغيرات الكميّة لمبايض الفئران البيضاء المحقونة بهذا العقار، وانعكاس هذه التأثيرات على قدرتها التناسلية .

ثالثاً . مواد وطرائق البحث:

أُجريت هذه الدراسة على الفئران البيضاء التي تم تزويجها خلال شهر كانون الأول / ديسمبر واستخلاف سلالتها في مختبرات حيوانات التجربة والبحث العلمي في كلية العلوم بجامعة حلب، وبعد فترة الحمل Gestation التي استمرت من 18 إلى 20 يوماً وُضعت كل أنثى مع صغارها في قفص بلاستيكي مستقل لمدة شهر كامل ليتسنى للأُم الاعتناء بصغارها وإرضاعهم حتى الفطام، ثم عُزلت الإناث عن الذكور لكيلا يحصل تزاوج بينهما، وبعد أن أصبح عمرها أربعة أشهر تم انتخاب 72 أنثى منها تراوحت أوزانها ما بين 20 إلى 24 gm، وأطوالها ما بين 6 إلى 8 Cm، ثم وضعت في مجموعة من الأقفاص خُضعت جميعها لظروف بيئة متماثلة، حيث تم وضعها بجوار

قفس يحتوي على عدد من ذكور الفئران ليتسنى لها اشتتام رائحة الفورمونات الذكرية والتي تُعدُّ بمثابة تحريض للإناث على الإباضة والنشاط الجنسي، كما وضعت بدرجة حرارة 25 م°، وفترة ضوئية متماثل (12 سا نهارًا /12 سا ليلاً وهي الفترة المثلى للنشاط الجنسي)، وتناولت غذائها ذا القيمة الغذائية المتكاملة وبشكل حر .

قسمتُ الإناث المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين:

المجموعة الشاهدة: تتألف من أربع وعشرين أنثى من إناث الفئران البيضاء، تم حقنها بمحلول فيزيولوجي (RingerLactate) داخل التجويف البريتواني Intraperitoneal Injection. (تم أخذ ستّ من إناث الفئران كشاهد لكل مجموعة ثانوية تم حقنها بالعقار).

مجموعة التجربة: قُسمت بقية الإناث إلى أربع مجموعات ثانوية، تتألف كل مجموعة من اثنتي عشرة أنثى من إناث الفئران البيضاء، حُقِنَتْ جميعها داخل التجويف البريتواني بجرعة مفردة من عقار Adriamycin، تم الحصول عليه من صيدليات مستشفى الرعاية في جمعية مكافحة السرطان وتحت الاسم التجاري Doxorubicin من شركة Ebewe Pharma استرالية المنشأ.

تم حقن الإناث بالعقار في شهر ابريل/ نيسان وهي بعمر أربعة أشهر والذي يمثل منتصف فترة النشاط الجنسي عند الفئران البيضاء.

وقد تم حساب كمية الجرعة اللازم إعطائها لكل أنثى، بدلالة الجرعة التي تُعطى للشخص البالغ الطبيعي $60-75\text{mg}/\text{m}^2$ كجرعة مفردة تعطى كل 15 إلى 21 يومًا، حيث تُقدر كمية الجرعة اعتمادًا على الوزن أو على مساحة سطح الجسم [12,8].

وقد تم حساب مساحة سطح جسم كل أنثى بعد حساب وزنها وطولها وباستخدام معادلة دوبوي (Dubois) [13]:

$$\text{مساحة سطح الجسم (م}^2\text{)} = 0.007184 \times \text{الوزن (كجم)}^{(0.425)} \times \text{الطول (سم)}^{(0.725)}$$

طرق العمل المخبرية:

I. وزن حيوانات التجربة: تمّ وزن كل أنثى على حدة وذلك قبل الحقن وبعد الحقن،

وذلك كل حسب مجموعته الثنائية (3,5,10,15) يوماً، باستخدام ميزان رقمي ذي حساسية تقدر بواحد من مئة، ثم تم أخذ المعدل الوسطي لكل مجموعة وذلك بغية مراقبة اختلاف الأوزان على المستوى الزمني.

II. تم تشريح الحيوانات Animal dissecting المحقونة خلال فترات زمنية مختلفة من بعد بدء الحقن على النحو التالي:

المجموعة الأولى بعد مرور ثلاثة أيام على الحقن

المجموعة الثانية بعد مرور خمسة أيام على الحقن.

المجموعة الثالثة بعد مرور عشرة أيام على الحقن

المجموعة الرابعة بعد مرور خمسة عشر يوماً على الحقن

III. وزن المبايض: تم عزل المبايض ووضعها في محلول فيزيولوجي، حيث جُرِفَتْ

الطبقة الدهنية المحيطة بها ونُزعت القنوات الناقلة للبييضات، وذلك بالاستعانة

بمكبرة ثابتة قوة تكبيرها 20X، ثم تم تحديد وزنها باستخدام ميزان حساس تقدر

حساسيته واحد من عشرة آلاف.

IV. الدراسة النسيجية: وذلك وفق الطريقة الروتينيّة، وتمّ تلوين المقاطع النسيجية

باستخدام صبغة هيماتوكسلين و ايوزين (H & E).

النتائج والمناقشة:

١- الدراسة الكمية لأجسام ومبايض حيوانات التجربة المعالجة بعقار

:Adriamycin

١-١- دراسة تغيرات وزن الجسم:

بينت الدراسة حدوث نقصان تدريجي ملحوظ في أوزان الحيوانات المعاملة

بجرعة مفردة من عقار Adriamycin مقارنة بحيوانات المجموعة الشاهدة والتي

أظهرت زيادة بالوزن طيلة فترة التجربة، وقد استمر النقصان التدريجي لأوزان

الحيوانات المعالجة خلال معظم فترة التجربة التي تلت عملية الحقن مباشرة وامتدت

إلى اليوم العاشر من بعد الحقن، ثم بدأت أوزانها بالازدياد بشكل تدريجي بعد اليوم

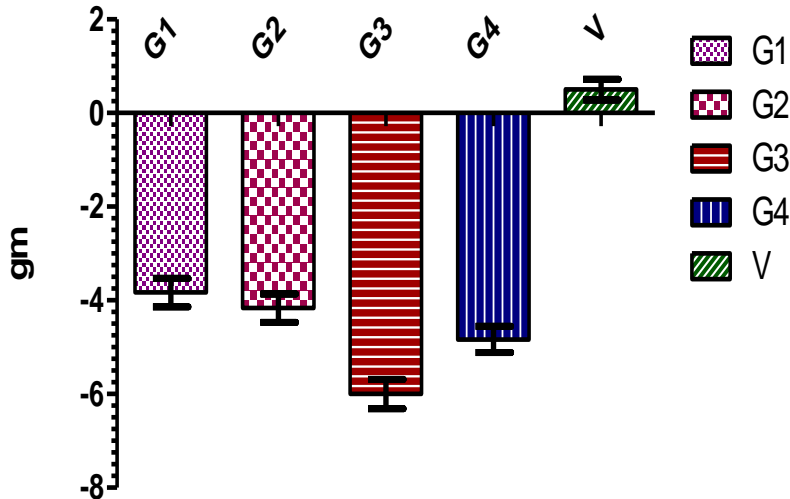
العاشر من بدء الحقن حتى نهاية فترة التجربة دون عودتها إلى وزنها الطبيعي مقارنة

بالمجموعة الشاهدة . جدول رقم (2)، مخطط رقم (2,1)

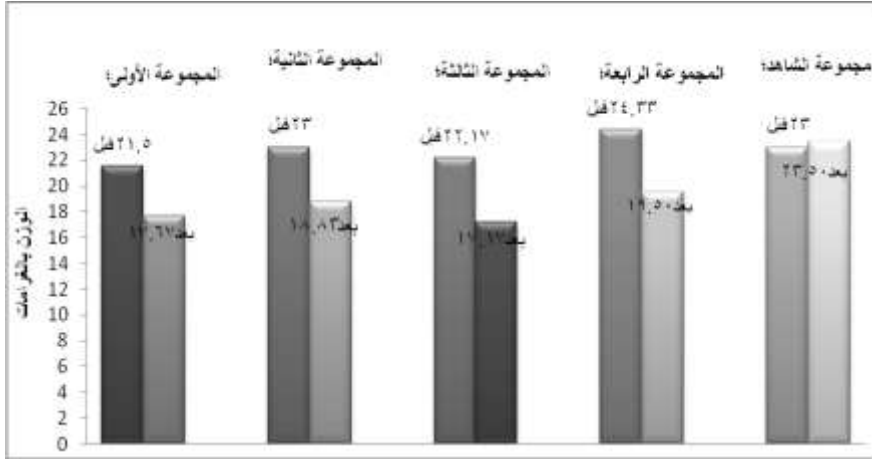
جدول رقم (2) يوضح مقدار انخفاض أوزان الأجسام بين المجموعات

المعدل الوسطي لأوزان الفئران قبل وبعد الحقن				
النسبة المئوية للانخفاض	معدل الانخفاض بالغم	الوزن بعد الحقن	الوزن قبل الحقن	
-2.17	0.75 ± 0.5	23.5	23	المجموعة الشاهدة
17.83	$^{\wedge}0.75 \pm 3.83$	17.67	21.5	المجموعة الأولى (بعد 3 أيام من بدء الحقن)
18.12	$^{\wedge}0.71 \pm 4.17$	18.83	23	المجموعة الثانية (بعد 5 أيام من بدء الحقن)
22.56	$*0.68 \pm 5$	17.17	22.17	المجموعة الثالثة (بعد 10 أيام من بدء الحقن)
19.8	$^{\wedge}0.54 \pm 4.83$	19.5	24.33	المجموعة الرابعة (بعد 15 يوماً من بدء الحقن)

*يوجد فرق معنوي عند $P < 0.001$ وفقاً لبرنامج GraphPad Prism5 مقارنة بالمجموعة الشاهدة
 $^{\wedge}$ يوجد فرق معنوي عند $P < 0.005$ وفقاً لبرنامج GraphPad Prism5 مقارنة بالمجموعة الثالثة



مخطط رقم (1) يوضح نسب تراجع أوزان الأجسام بين المجموعات مع الإنحراف المعياري على اعتبار قيمة $P < 0.05$ بين المجموعات، وقيمة $P < 0.0001$ بين المجموعات التجريبية والشاهد



مخطط (2) يوضح فروق المعدل الوسطي للمجموعات قبل وبعد الحقن عقار Adriamycin

قد يعود السبب في تراجع أوزان الفئران البيضاء المحقونة بعقار Adriamycin إلى تأثيره المثبط لعمليات التمثيل الغذائي Metabolism، أو ربما إلى إتلافه لخلايا الأمعاء مما يمنع من امتصاص المواد الغذائية بشكل جيد [15,14]، أو نظراً لحدوث إسهالات معويّة شديدة مع الشعور بالحرقنة نتيجة لتقرحات في الأغشية المخاطية في الفم والمريء واللثة مما يؤدي إلى عسر في البلع [8]، وهذا ما تم ملاحظته على حيوانات التجربة من انخفاض في منسوب تناولها للغذاء والشراب بمعدل ما يقارب ثلاثة أضعاف مقارنة بما تتناوله المجموعة الشاهدة، وخاصةً في بداية التجربة.

كما تتفق النتائج التي توصلنا إليها مع ما توصل إليه الباحث Philips وزملائه [16] بأن الفئران التي حُقنت بجرعة مفردة (15mg/kg) من عقار أدرياميسين عانت من فقد في أوزان أجسامها خلال الأسبوع الأول من التجربة، وهذا ما أكدته أيضاً دراسة Rinette وزملائه [17] على الجرذان المعالجة بعقار أدرياميسين بجرعة 10mg/kg حيث تناقصت أوزان أجسامها خلال فترة التجربة بينما أظهرت أفراد المجموعة الشاهدة زيادة ملحوظة في وزن الجسم خلال الفترة نفسها والتي بلغت 52 يوماً.

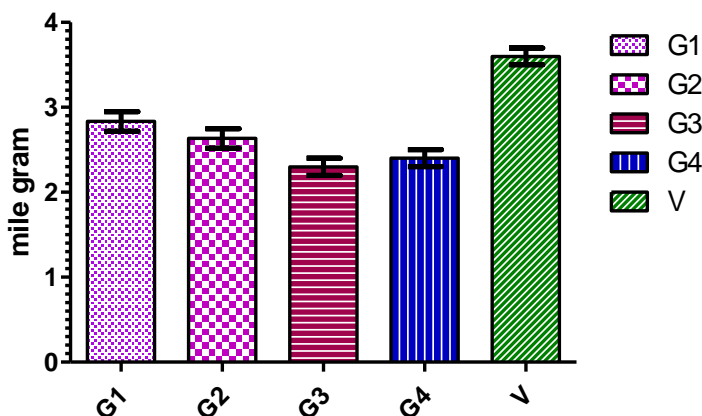
- دراسة تغيرات أوزان المبايض:

تأثرت أوزان المبايض بصورة واضحة بفعل التأثير السمي الذي يبديه عقار Adriamycin، فقد سجلت معظم مجموعات التجربة تراجعاً ملموساً في وزن المبايض مقارنة بالمجموعة الشاهدة (وكانت بداية فترة التناقص بين ثلاثة أيام وحتى اليوم العاشر من بدء الحقن)، أما في المجموعة الرابعة فقد ظهر تعافٍ طفيف في وزن مبايضها (تراوحت فترة التعافي من بعد اليوم العاشر من بدء الحقن حتى نهاية فترة التجربة)، ومن الملحوظ أن التناقص كان تدريجي، وكان أدنى مستوى انخفاض في المجموعة الثالثة جدول رقم (3)، مخطط رقم (4,3).

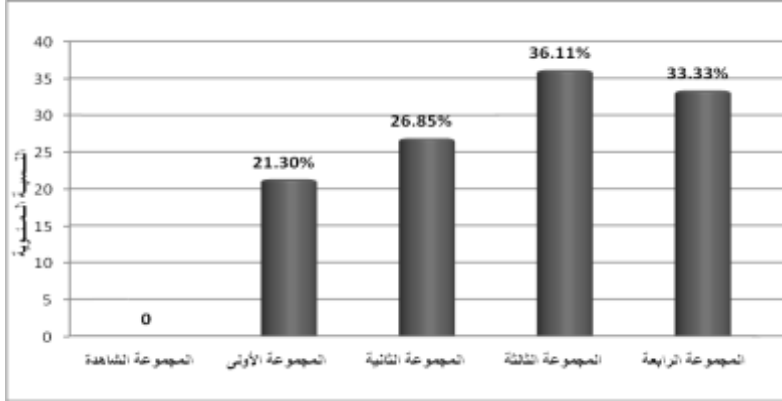
جدول رقم (3) يوضح مقدار تراجع أوزان المبايض بين مجموعات التجربة ومجموعة الشاهدة

نسبة انخفاض المجموعة عن الشاهد	مقدار انخفاض المجموعة عن الشاهد	متوسط وزن المجموعة	
0%	0 Mgm	3.6±0.1 Mgm	المجموعة الشاهدة
21.30%	^* 0.77Mgm	2.83±0.12 Mgm	المجموعة الأولى (بعد ثلاثة أيام من بدء الحقن)
26.85%	^* 0.97 Mgm	2.63±0.11 Mgm	المجموعة الثانية (بعد خمسة أيام من بدء الحقن)
36.11%	* 1.30 Mgm	2.3±0.1 Mgm	المجموعة الثالثة (بعد عشرة أيام من بدء الحقن)
33.33%	* 1.20 Mgm	2.40±0.13 Mgm	المجموعة الرابعة (بعد 15 من بدء الحقن)

*يوجد فرق معنوي عند $P<0.0001$ وفقاً لبرنامج GraphPad Prism5 مقارنة بالمجموعة الشاهدة
^ يوجد فرق معنوي عند $P<0.005$ وفقاً لبرنامج GraphPad Prism5 مقارنة بالمجموعة الثالثة



مخطط رقم (3) يبين تراجع متوسط أوزان المبايض بين المجموعات مع الإنحراف المعياري على اعتبار قيمة $P<0.05$ بين المجموعات، وقيمة $P<0.0001$ بين المجموعات التجربة والشاهد



مخطط رقم (4) يوضح النسبة المئوية لانخفاض أوزان المبايض بين المجموعات

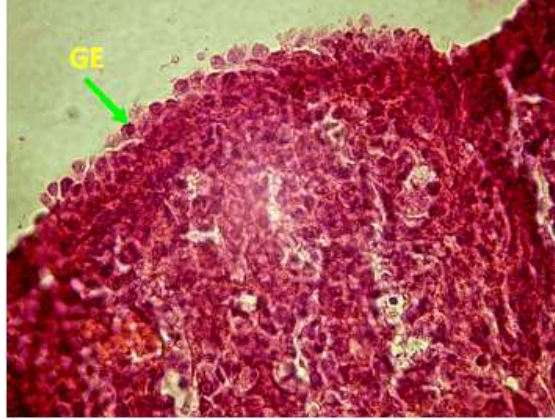
وهذا يتفق مع دراسات باحثين آخرين [18] سجلوا انخفاضاً في أوزان الأعضاء المستهدفة مثل القلب نتيجة استخدام جرعات مختلفة من عقار أدرياميسين، حيث لاحظ Imahie وزملاؤه [19] أن الجرذان المعالجة بجرعة مقدارها 1&2mg/kg بهذا العقار تراجعت أوزان خصاها خلال أربعة أسابيع بعد حقنها، ولاحظت الباحثة AL Hazmi [20] أن معالجة ذكور الفئران بعقار الدكسوروبيسين (أدرياميسين) قد أدت أيضاً إلى تراجع أوزانها وأوزان خصاها بشكل ملحوظ مقارنة مع المجموعة الشاهدة وذلك ابتداءً من اليوم الثامن من الحقن. وهذا ما أكدته أيضاً دراسة Adachi وزملاؤه [21] حيث لاحظ تراجعاً واضحاً في أوزان الأجسام والخصى عند الجرذان بعد إعطاء العقار بجرعة 1mg/kg لمدة أربعة أسابيع أو 2mg/kg لمدة أسبوعين.

٢- دراسة التغيرات النسيجية والخلوية في مبايض الفئران المعالجة بعقار

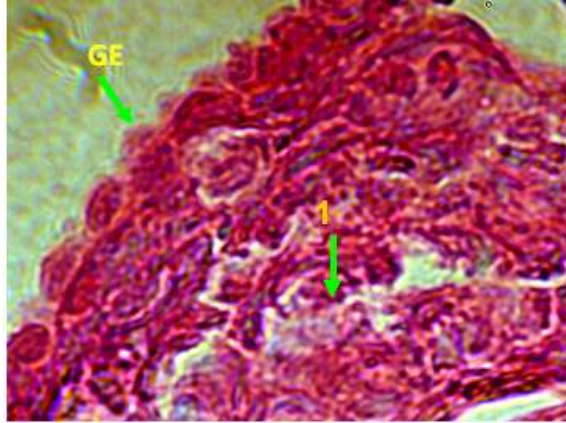
:Adriamycin

أوضحت نتائج الدراسة النسيجية لمبايض الفئران البيضاء المعالجة بعقار أدرياميسين وجود عدة تبدلات نسيجية مرضية في معظم التراكيب النسيجية للمبيض، ومن هذه التبدلات تعبير شكل خلايا الطبقة الظهارية المولدة The germinal epithelium حيث تحولت من الشكل المكعبي أو الأسطواني البسيط والنواة الدائرية إلى خلايا مسطحة ذات أنوية مفلطحة بدءاً من اليوم الخامس من الحقن حتى اليوم العاشر من بعد الحقن، غير أنها رجعت لوضعها الطبيعي في اليوم الخامس عشر من

بعد الحقن. كما تحللت الخلايا الموجودة تحت الطبقة المولدة طيلة فترة التجربة ثم توقف التحلل وتراجع ابتداءً من اليوم العاشر من بعد الحقن.



شكل رقم (1) يبين بنية الطبقة المولدة في مبيض المجموعة الشاهدة (X600)
GE (الطبقة المولدة تتكون من خلايا مكعبية الشكل



شكل رقم (2) يبين تبدل بنية الطبقة المولدة في مبيض مُعالج بعقار Adriamycin
GE (X1000) الطبقة المولدة تتكون من خلايا مسطحة الشكل
(1) تشكل فجوات وفضوات تحللية.

ومن التغيرات الملاحظة أيضاً تأثر الجريبات الابتدائية Primordial follicles والجريبات الأولية Primary follicles على حد سواء وكان أوج تأثرهما في اليوم الخامس من بعد الحقن حيث انخفض عددهما بشكل ملحوظ وتغيرت أشكالهما، كما أظهرت بعض الجريبات الأولية تحللاً كاملاً إذ أصبح الغشاء القاعدي في مواجهة التجويف الجريبي، إلا أن هذه التغيرات لم تلبث أن تراجعت بشكل تعافٍ تدريجي

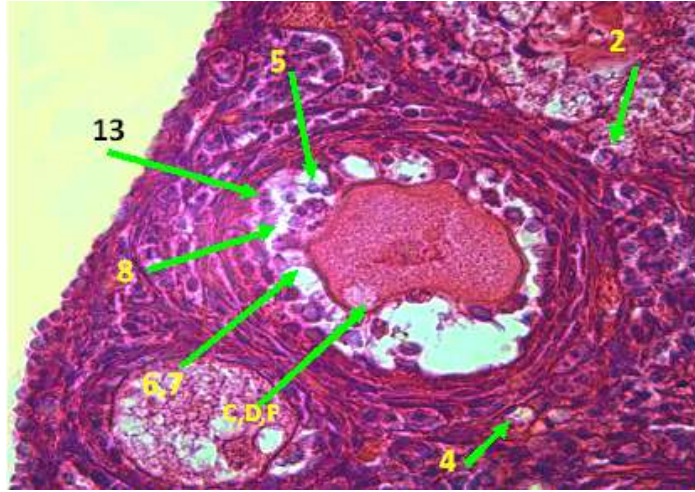
ابتداءً من اليوم العاشر من بعد الحقن حتى نهاية التجربة.

وتسبب العقار أيضاً في اختفاء الجريبات الثانوية Secondary Follicles بشكل جزئي بعد مرور ثلاثة أيام من بدء الحقن، إلا أنها اختفت بشكل كامل بعد مرور خمسة أيام من بعد الحقن، ثم عادت إلى الظهور مرةً أخرى في مراحلها المبكرة بعد عشرة أيام من بدء الحقن و بأعداد قليلة مقارنة بالمجموعة الشاهدة، وازداد عددها بشكل ملحوظ بعد مرور خمسة عشرة يوماً من بدء الحقن.

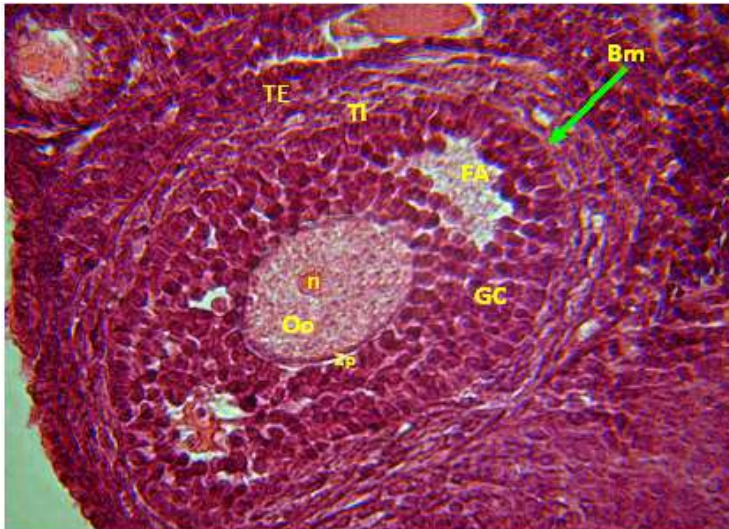
كما ظهرت شدة التأثير بهذا العقار في الجريبات المبيضية الناضجة (جريبات غراف Graafian follicles)، حيث تسبب العقار في اختفائها وتحللها كتحلل الركاب البيضي، كما تحللت الأجسام الصفراء Corpus luteum في مبايض الحيوانات المعالجة مما أثر سلباً على نشاطها التناسلي وذلك من بداية الحقن وحتى اليوم العاشر من بدء الحقن، إلا أنها عادت بالظهور مرةً أخرى بعد خمسة عشر يوماً من الحقن وبأعداد قليلة مقارنة مع المجموعة الشاهدة، و ببعض التغيرات النسيجية مثل قلة عدد الطبقات، وعلى أثرها عادت أيضاً الأجسام الصفراء.



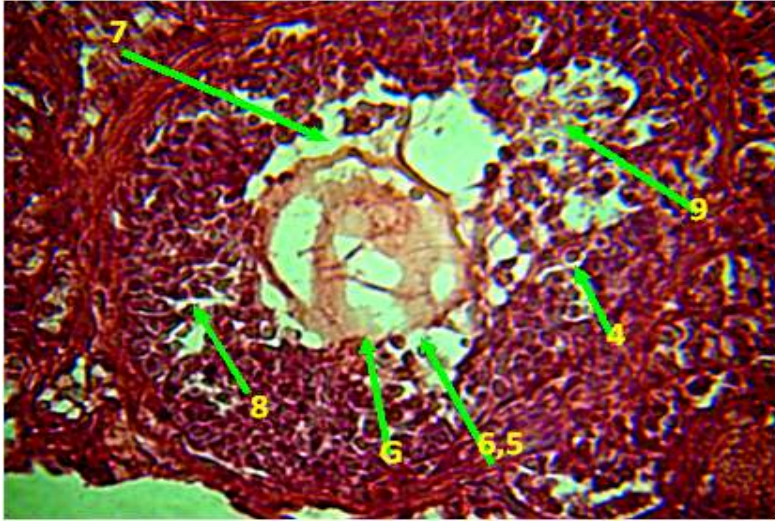
شكل رقم (3) يبين بنية جريب أولي (Primary follicle) PO (متعدد الطبقات، مع جريب أولي وحيد الطبقة Po-g في مجموعة الشاهد (GC (X600) خلايا جريبية مكعبية الشكل، (Oo) البيضة، (n) النواة، (Th) غلاف الجريبي، (Bm) الغشاء القاعدي، (ZP) المنطقة الشفافة (C-E) بداية تشكل فجوات الجريب



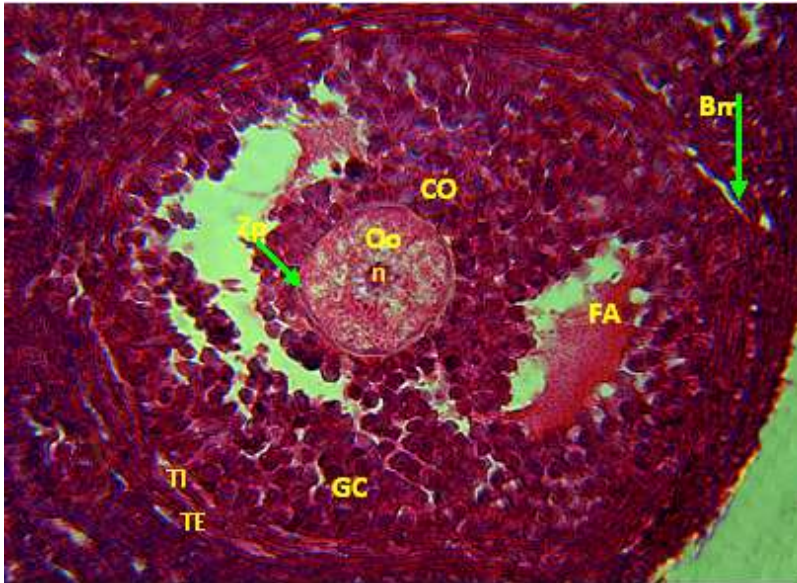
شكل رقم (4) يبين تبدل بنية جريب أولي (Primary follicle) أحادي الطبقة لمبيض مُعالج بعقار Adriamycin (X600) (2) تكاثف الكروماتين النووي بجوار غشاء الخلية. (4) انكماش الخلايا الجريبية هيكلياً وسيتوبلازمياً. (5) تحلل أغشية بعض الخلايا الجريبية واندفاع أنويتها إلى المنطقة الشفافة. (6) زيادة اتساع المنطقة الشفافة. (7) استمرار اختفاء الخملات التي تربط الخلايا الجريبية والبيوضة. (8) زيادة فقد الاتصال بين الخلايا الجريبية. (13) التحلل في الخلايا الجريبية شبه كامل مما جعل الغشاء القاعدي في مواجهة التجويف الجريبية. (C) فقد النواة لموقعها المركزي، ووقوعها في الطرف بجوار الغشاء الخلوي. (D) اختفاء النوية. (F) اختفاء النواة



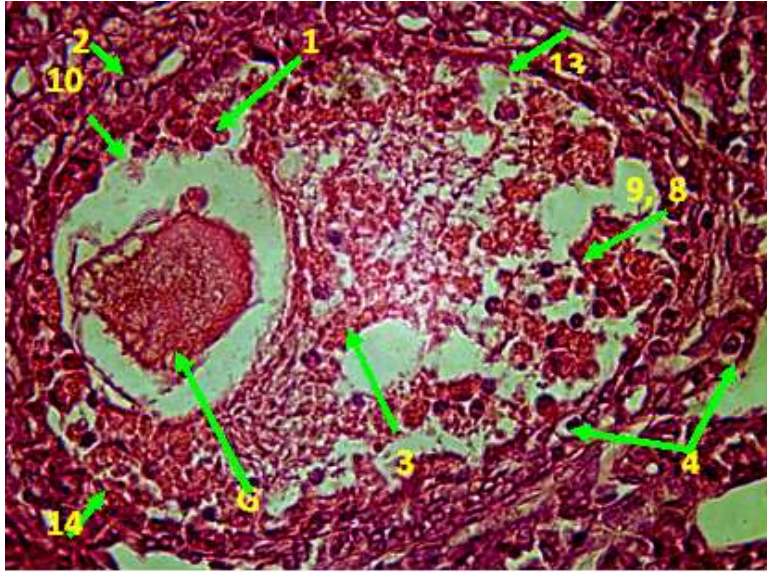
شكل رقم (5) يبين بنية جريب ثانوي (Secondary follicle) SO في المجموعة الشاهدة (X600) (GC) خلايا جريبية مكعبية الشكل، (Oo) البيوضة، (n) النواة، (TE) الغلاف الخارجي، (TI) الغلاف الداخلي، (Bm) الغشاء القاعدي، (ZP) المنطقة الشفافة



شكل رقم (6) يبين تبدل بنية جريب ثانوي (Secondary follicle) لمبيض مُعالج بعقار Adriamycin (X600) (4) انكماش الخلايا الجريبية هيكلياً وسيتوبلازمياً. (5) تحلل أغشية بعض الخلايا الجريبية واندفاع أنويتها إلى المنطقة الشفافة. (6) زيادة اتساع المنطقة الشفافة (7) استمرار اختفاء الخملات - جسيمات الوصل - التي تربط الخلايا الجريبية والبيضة. (8) زيادة فقد الاتصال بين الخلايا الجريبية. (9) استمرار انتشار الخلايا الجريبية داخل تجويف الجربي. (G) اختفاء البيضة



شكل رقم (7) يبين بنية جريب غراف ناضج (Graafian follicle) GF في المجموعة الشاهدة (X600) (GC) خلايا جريبية مكعبية الشكل، (Oo) البيضة، (n) النواة، (TE) الغلاف الخارجي، (TI) الغلاف الداخلي، (Bm) الغشاء القاعدي، (ZP) المنطقة الشفافة، (CO) الركام البيضي



شكل رقم (8) يبين تبدل بنية جريب ناضج (Graafian follicle) لمبيض مُعالج بعقار Adriamycin بعد (X600) (1) تفتت النويات أو النواة (2) تكاثف الكروماتين النووي بجوار غشاء الخلية. (3) زيادة شدة صبغ السيئوبلازم بصبغة الأيوزين. (4) انكماش الخلايا الجريبية هيكلياً وسيئوبلازمياً (6) زيادة اتساع المنطقة الشفافة (7) استمرار اختفاء الخملات التي تربط الخلايا الجريبية والبيضة (8) زيادة فقد الاتصال بين الخلايا الجريبية. (9) استمرار انتشار الخلايا الجريبية داخل تجويف الجربي (10) اختفاء خلايا الركام البيضي في جريات غراف بشكل تام. (13) التحلل في الخلايا الجريبية شبه كامل مما جعل الغشاء القاعدي في مواجهة التجويف الجربي. (14) شبه اختفاء الغلاف الجريب (G) اختفاء البيضة .

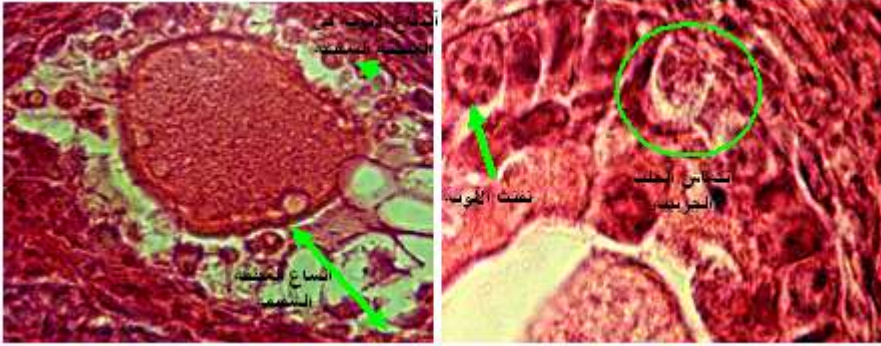
أما بالنسبة إلى التغيرات الخلوية Cytological changes فتتجلى في ثلاث

نقاط رئيسية:

أولاً. تموت وتخرّب الخلايا الجريبية Granulosa cells:

حيث شوهدت عدة تغيّرات وتبدلات مرضية على هذه الخلايا مثل تغلظ الأنوية Pyknosis، وتفتتها إلى أجزاء Karyorrhexis، وتكثف الكروماتين النووي Condensation of Chromatin وتجمعه حول الغشاء الخلوي للخلية، وزيادة شدة صبغ السيئوبلازم وذلك نتيجة اختفاء النواة والنوية في بعض الخلايا الجريبية، كما شوهد تباعد الخلايا الجريبية عن بعضها وفقدان الاتصال بينها مما دعاها إلى تبعثرها داخل الجوف الجربي The antrum، مع تحلل الخلايا الجريبية وانكماشها هيكلياً وسيئوبلازمياً، كما شوهد فقدان الزغبات المجهرية بين الخلايا الجريبية والبيضة مما

أدى إلى اتساع في المنطقة الشفيفة Zona pellucid، واندفاع أنوية الخلايا الجريبية في المنطقة الشفيفة. مقطع رقم (9)



شكل (9) يوضح بعض التغيرات التي أصابت الخلايا الجريبية (X1000)

ومن الملاحظ تباين التغيرات في البنية النسيجية والخلوية في الخلايا الجريبية بين المجموعات حيث كان التأثير أعظماً في المجموعة الثانية أي اليوم الخامس من بدء الحقن مقارنة بالمجموعة الثالثة والرابعة حيث تبدأ الجريبات بالتعافي التدريجي اعتباراً من اليوم العاشر من بعد الحقن، وهذا ما يتضح في الجدول (3).

جدول رقم (3) مقارنة يوضح مظاهر التغيرات الخلوية في مختلف الجريبات بين المجموعات

المحقونة(التجربة) والشاهد.

المجموعة	المجموعة	المجموعة	المجموعة	مجموعة	
الرابعة	الثالثة	الثانية	الأولى	الشواهد	
+	++	++++	+++	-	حالة تفتت الأنوية والنواة
+	++	++++	+++	-	تكاثر الكروماتين النووي بجوار غشاء الخلية
+++	++	+	+	+	تغلظ الأنوية
+	+	+++	++	-	شدة صبغ السيترولازم بصبغة الايوزين
+	++	++++	+++	-	انكماش الخلايا الجريبية هيكلياً وسيتوبلازمياً
+	+	++++	+++	-	تحلل الأغشية واندفاع أنويتها في المنطقة الشفيفة
+	+	+++	++	-	اتساع المنطقة الشفيفة
+	++	++++	+++	-	اختفاء جسيمات الوصل بين الخلايا الجريبية والبيبيضة
+	++	++++	+++	-	فقد الاتصال بين الخلايا الجريبية
+	++	++++	+++	-	انتشار الخلايا الجريبية داخل التجويف الجربي

+	++	++++	+++	-	تخرب خلايا الزكام البيضي
+++	+++	++	+	-	تشكل فراغ بين الغشاء القاعدي والغلاف الجريبي
+	++	+++	++	-	تشكل فجوات وفضوات تحليلية في السداة
+	++	++++	+++	-	شدة تحلل الجريبات
+	++	+++	+	-	تحلل الخلايا الموجودة تحت الطبقة المولدة

ملاحظة: تشير علامة (+) إلى درجة التبدل والتغير وذلك من خلال الملاحظات المجهرية عند فحص المقاطع النسيجية.

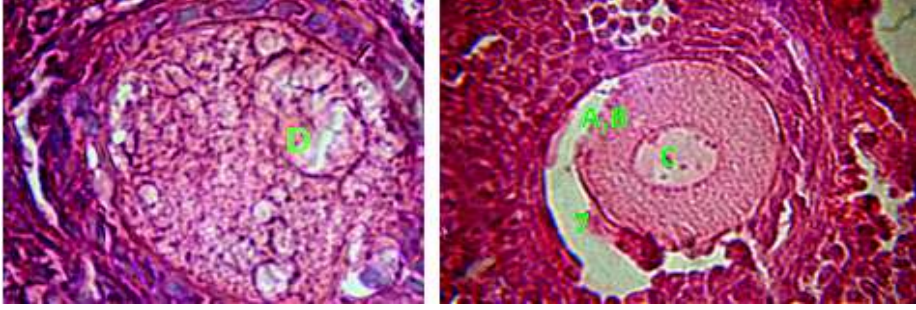
ثانياً . تموّت وتحلل البويضات Oocytes:

ويتجلى ذلك بابتعاد أنويتها عن مركزها وتموضعها بجوار الغشاء الخلوي للبيضة، وتحلل أغشيتها الخلوية وانكماشها، وتحلل الأغشية النووية واختفائها في بعض المراحل وتكاثف الكروماتين النووي في مراحل أخرى، وامتلاء سيتوبلازم الخلية البيضية بالفجوات الدهنية أو انكماش الهيولى، حتى وصل التحلل إلى اختفاء البيضة بالكامل في بعض الجريبات، إلا أن هذه التغيرات كانت متباعدة في المجموعات وكانت قمة التغير في المجموعة الثانية أي بعد الحقن بخمسة أيام، ثم ظهر نوع من التعافي بعد اليوم العاشر من الحقن، وهذا ما يمكن توضيحه في جدول رقم (4)، مقطع رقم (10).

جدول رقم (4) مقارنة مدى تأثير الخلايا البيضية بالعقار بين المجموعات المحقونة ومقارنتها بالشاهد

درجة تواجد الفجوات الدهنية	مدى تحلل البيضة	مدى تحلل الكروماتين النووي	مدى تحلل النواة	مدى تحلل الغشاء النووي	انكماش سيتوبلازم البيضة	تحلل الغشاء الخلوي للبيضة	
-	-	-	-	-	-	-	المجموعة الشاهدة
-	++	+++	++	+++	+++	+++	المجموعة الأولى
-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	المجموعة الثانية
+++	+	+	++	++	++	++	المجموعة الثالثة
++	+	+	+	+	+	+	المجموعة الرابعة

ملاحظة: تشير علامة (+) إلى درجة التبدل والتغير وذلك من خلال الملاحظات المجهرية عند فحص المقاطع النسيجية

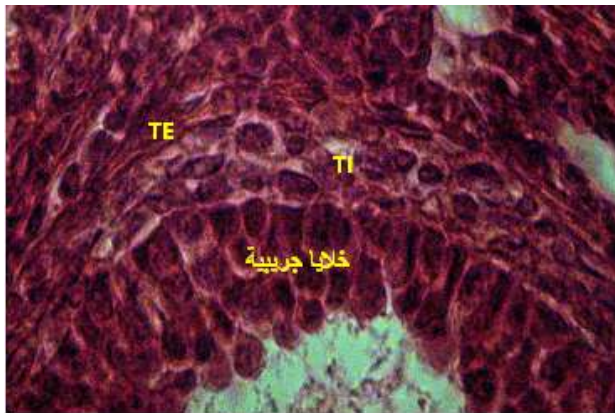


شكل (10) يوضح بعض التغيرات التي أصابت الخلية الببيضية (X1000) (7) اختفاء الخملات - جسيمات الوصل - التي تربط الخلايا الجريبية والببيضة. (A) تحلل الغشاء الخلوي للببيضة وانكماشه (B) انكماش سيتوبلازم الببيضة. (C) تحلل الكروماتين النووي (D) فجوات دهنية

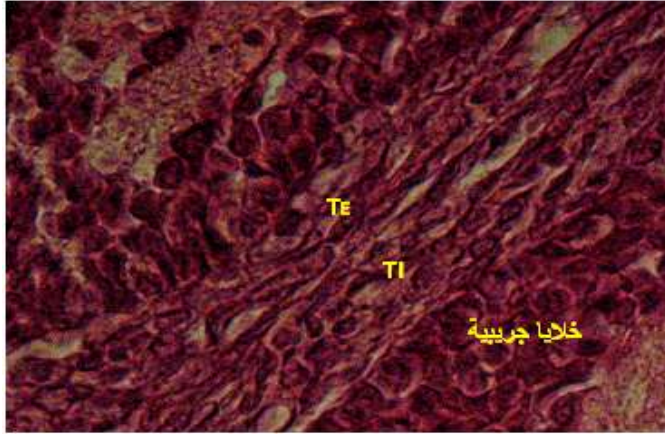
ثالثاً . تخرب الغلاف الجربي Theca folliculi :

حيث استدل على تخرب الغلاف الجربي من خلال تليف وانضغاط أنوية وخلايا الغلاف الجربي التي أصبحت ذات شكل مغزلي ابتداءً من اليوم العاشر إلى اليوم الخامس عشر من بدء الحقن، أو حتى اختفائه جزئياً أو كلياً في بعض الجريبات، كما لوحظ زيادة في سمك الغشاء القاعدي Basement membrane وانتثائه. مقطع رقم (12-14).

بهذا تتفق النتائج التي حصلنا عليها مع دراسات أخرى [22] التي تؤكد أن التأثير السلبي على الخلايا الداعمة للببيضة كالخلايا الجريبية أو خلايا الغلاف الجربي تتسبب في إحداث تغيرات في نمو ونضج الجريبات المبيضية مما يؤدي في النهاية إلى تحلل الجريبات المبيضية، وهذا ما أكده الباحث Jones [23].

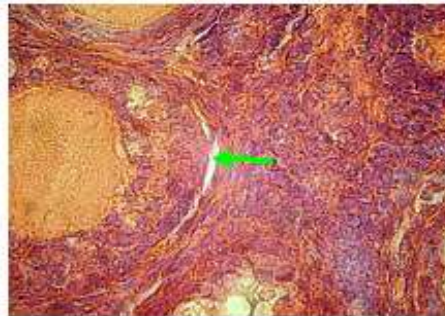


شكل رقم (11) يبين بنية الغلاف الجربي في المجموعة الشاهدة (X1000)



شكل رقم (12) يبين تبدل في بنية الغلاف الجريبي في مبيض معالج بعقار Adriamycin (X1000)
(TE) الغلاف الخارجي، (TI) الغلاف الداخلي

كما تتفق مع دراسات الباحث Andreeva وزملائه [24] حول تأثير عقار أدرياميسين على الجهاز التناسلي الأنثوي حيث لاحظ وبعد مرور شهر من تعاطي الجرعة المفردة أن العقار تسبب في انخفاض في عدد البويضات الناضجة Mature Oocytes في مبايض الجرذان وازدياد معدل موت البويضات المخصبة، وكذلك مع دراسة Shima [25] الذي قام بحقن إناث الفئران بعقار أدرياميسين وبجرعات مختلفة وذلك لمعرفة قدرة العقار على تدمير الجريبات المبيضية ومدى تأثير العقار على خصوبة الفئران المحقونة، فاستطاع العقار تدمير 80%-50% من الجريبات المبيضية، وذلك وفقاً لكمية الجرعة المعطاة، وقلت نسبة الخصوبة فيها من 61% إلى 50% (المجموعة الأولى) ومن 39% إلى 61% (المجموعة الثانية) مقارنة بالمعدل الطبيعي المقدر ب 83% وذلك بما يتناسب طردياً مع كمية الجرعة



شكل رقم (13): يوضح انثناء الغشاء القاعدي وزيادة سماكته

وفي نهاية المطاف نلاحظ أن أوج التغيرات المرضية والتبدلات النسيجية المبيضية ظهرت اعتباراً من بداية عملية الحقن وحتى اليوم العاشر، حيث كانت المجموعة الثانية (اليوم الخامس من بدء الحقن) أكثر المجموعات تأثراً بالنسبة إلى التغيرات النسيجية في مستوى كافة الجريبات المبيضية، ثم بدأت بعدها بالتعافي التدريجي، وهذا ما لوحظ أيضاً خلال الدراسة الكمية حيث إن أوزان الأجسام وأوزان المبايض بدأت تتناقص بدءاً من اليوم الأول حتى اليوم العاشر من بدء الحقن الذي يمثل أدنى مستوى انخفاض، ثم بدأت بالتعافي بعد ذلك حتى نهاية التجربة ولكن دون وصولها إلى السوية الطبيعية مقارنة مع الشاهد. ومن الملاحظ أيضاً أن تعافي الجريبات المبيضية بدأ في المجموعة الثالثة قبل تعافي أوزان الأجسام والمبايض التي بدأت في المجموعة الرابعة، ويمكن تفسير هذا الاختلاف هو حدوث هجمة تسمية قوية من بداية حقن عقار Adriamycin على الأنسجة ذات النشاط الانقسامى مثل أنسجة المبايض، وعلى كافة الأنسجة والأعضاء الأخرى كالجهاز الهضمي، وخاصةً أن الحقن كان عند حيوانات التجربة داخل التجويف البيريتواني the peritoneal cavity مما أدى إلى وصول العقار إلى محيط الأعضاء البطنية بسوية واحدة، ومن هنا ظهر في بداية الأمر تبدلات خلوية وتموتات خلوية على المستوى النسيجي، ثم تلاه انخفاض في أوزان أجسامها وأعضائها (مثل المبايض)، بعد ذلك بدأ الجسم مقاومته ضد التسمم من العقار والتخلص من الآثار السمية عن طريق طرح العقار ونواتجه الاستقلابية خارج الجسم (طريق البول والبراز والعصارة الصفراوية) وبشكل تدريجي [8]، منها عاد الجسم إلى التعافي التدريجي والتجدد النسيجي وإلى نشاطه الانقسامى التكاثرى على المستوى النسيجي في بداية التعافي، ومن المعلوم أن الأنسجة سريعة التكاثر تتخلص من السمية بشكل أكبر من الأنسجة ذات النشاط الانقسامى المعتدل وعلى إثر ذلك ارتفع في بداية الأمر عدد الجريبات المبيضية الطبيعية وعادت الجريبات الناضجة إلى وضعها الطبيعي وعادت الأجسام الصفراء ولكن دون السوية الطبيعية مقارنة مع الشاهد وعلى إثر حدوث التعافي النسيجي تلاه تعافٍ في أوزان أجسام الفئران ومبايضها وعادت الفئران إلى وضعها شبه الطبيعي.

الاستنتاجات:

- على الرغم من التأثير الإيجابي لعقار Adriamycin على الخلايا السرطانية، إلا أن تأثيراته الجانبية على الخلايا السليمة وخاصة التكاثرية كالخلايا البيضية والجريبية ذات أهمية كبيرة، ويجب أخذها بعين الاعتبار قبل البدء بالتداوي.
- من أهم التأثيرات النسيجية على المبايض تأثير الجريبيات الناضجة مما يؤثر سلباً على الأجسام الصفراء وبالتالي على القدرة التناسلية والنشاط الجنسي لدى الأنثى.
- كما يترافق إعطاء العقار تراجع في أوزان الأجسام مع تراجع أوزان المبايض.
- يكون تأثير العقار أعظمياً خلال العشرة الأيام الأولى من بدء الحقن، ثم يبدأ بالتراجع تدريجياً، وذلك بفضل استقلابه والتخلص من نواتجه إلى خارج الجسم دون الوصول إلى وضعه الطبيعي.

References

- 1-GOTH A., 1981- **Medical pharmacology principles & concepts.** The C.V. Mosby company, 10th Ed ,Saint Louis, Ch 60, 701-712.
- 2-ROSE D.; DAVIS T., 1980- **Effects of adjuvant chemohormonal therapy on the ovarian and adrenal function of breast cancer patients.** *Cancer-Res.*, **40(Nov)**, 4043-4047.
- 3-AHMED N.; GUPTA P.; CICOGRGE K., 1989- **Sub acute toxicity or cypermethrin in rats.** *J. Environ Biol*,**10(3)**. 309-317.
- 4-LOWRY W., 1970- **Unwanted effects of cytotoxic drugs** **Bibliographic citation.** *prescriber's Journal*, **10(Des)**, 132-134.
- 5-ROMANINI A.; FEBI G.; DANESI R.; DEL-TACCA M., 1985- **Recenti acquisizioni farmacotossicologiche e cliniche sulla adriamicina (Recent pharmacotoxicologic and clinical findings on adriamycin).***Minerva. Med*, **76(40)**, 1863-1876.
- 6-VILLANI P.; ORSIERE T.; DUFFAUD F.; DIGUE L.; BOUVENOT G.; BOTTA A., 1998- **Genotoxic and clastogenic effects of doxorubicin.** *Therapie*, **53(4)**, 391-395
- 7-YOUNG R.; OZOLS R.; MYERS C., 1981- **The anthracycline antineoplastic drugs.** *N. Engl. J. Med.*, **305(3)**, 139-159.
- 8-**PRODUCT INFORMATION ADRIAMYCIN.** 2007- *Pfizer Australia Pty Ltd Version: pfpadrii10107*, Australia. 160.
- 9-CRAIG C.; STITZEL R., 1982- **Modern pharmacology.** 1st Ed, Ch56, 745-789. <http://www.link.Sparinger.de/search.htm>.

- 10- NEIDLE S.; WARING M.J., 1983- **Molecular aspects of anticancer drug action**. Macmillan Press, London.1200
- 11- WEISS R.B., 1992- **The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?**. *Semin. Oncol*, **19(6)**, 670-686.
- 12-BAQUIRAN D.; GALLAGHER J., 1998- **Lippincott's cancer chemotherapy**. Handbook, Lippincott Philadelphia, Ch 1, 3-5, 191-192.
- 13-AI-HZZAA H., 2007- **Anthropometric Measurements in Human-** Dr. MSYCAR A, The Nutrition Encyclopedia, 1st Ed, Center Albhrian the search & Studies, 50-63.
- 14-JACOBY H.; WNOROWSKI G.; SAKATA K; MAEDA H., 2000- **Product safety lab, East Brunswick, NJ**. Creative Strategy, Tokyo Japan; Daiwa Pharm, Tokyo Japan, Supplement to Gastroenterology April.384
- 15-KANG J.; LEE y; NO K; JUNG E; SUNG J; KIM Y NAM S., 2002- **Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the testis**. *Reprod. Toxicol*, May **16 (3)**, 8-292.
- 16-PHILIPS F.S.; GILLADOGA A.; MARGUARDT H.; STERNBERG S.S.; VIDAL P.M., 1975- **Some observations on the toxicity of Adriamycin**. *Cancer Chemother*, (NSC-1231-27), Rep., **6(3)**, 177-181.
- 17-RINETTE H.; JULICHER M.; STERRENDERG L.; GUIDO R.; HAENEN M.; BAST A.; NOORDHOEK J., 1988- **The effect of chronic adriamycin treatment on heart, kidney and liver tissues of male and female rat**.*Arch.Toxicol*, **61(2)**, 275-281.
- 18-MOSTAFA M.; MIMA T.; OHNISHI S.; MORI K., 2000- **S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in heart and liver in mice**. *Planta Med.*, (**66**), 148-151.
- 19-IMAHIE H.; ADACHI T.; NAKAGAWA Y.; NAGASAKI T.; YAMAMURA T.; HORI M., 1995- **Effects of adriamycin, an anticancer drug showing testicular toxicity, on fertility in male rats**. *J. Toxicol. Sci.*, **20(3)**, 183-193.
- 20-AI-HAZMI I., 2003- **Histological and histochemical changes induced by doxorubicin anticancer drug in male genital system of albino mice**. Jeddah, Master Thesis, King Abdullaziz University, 168.
- 21-ADACHI T.; NISHIMURA T.; IMAHRE H.; YAMAMURA T., 2000- **Collaborative work to evaluate toxicity on male**

- reproductive organs by repeated dose studies in rats.** *J Toxicol Sci Zoo.*, **95**-101.
- 22-WALLACE H.; JOHN A.; THOMAS., DONALD E.; GARDNER., 2004- **Target Organ Toxicology Series.** CRC Press, 1ST Ed, London, 250
- 23-JONES R.E.; 1978- **The vertebrate ovary: comparative biology and evolution.** Plenum Press, New York.249.
- 24-ANDREEVA E.; BOROVSKAIA T.; FOMMINA T.; FILIPPOVA M., 1992- **Late effects of damaging action of doxorubicin on reproductive system and progeny of rats.** *Antibiotiki I Khimioterapiia*, **37(5)**, 32-34.
- 25-SHIMA Y., 1994- **Quantitative study on the effect of oncostatic toxicity on murine fertility.** *Nippon. Sanka. Fujinka. Gakkai. Zasshi*, **46(7)**, 589-596.