

دراسة دور فيتامين A في ازالة التأثير السمي لعلاج الميثوتريكسيت  
Methotrexate على الكبد

بحث مقدم من قبل الطالب

وسام احمد حمادي

باشراف

م.د. نافع احمد سعود

## الخلاصة

### Summary

تهدف الدراسة الحالية لمعرفة تأثير استخدام الميثوتريكسيت ( MTX ) على النشاط الوظيفي للكبد.

تم استخدام 12 ارنبا وقسمت الى اربع مجاميع متساوية كل مجموعة تتكون من 3 حيوانات . اعطيت المجموعة الاولى 2مل من الماء المقطر كمجموعة سيطرة في حين اعطيت المجموعة الثانية (20 ملغم MTX) داخل الغشاء البريتوني فيما اعطيت المجموعة الثالثة (5000 وحدة دولية من فيتامين A) واعطيت المجموعة الرابعة (20ملغم MTX بالإضافة الى 5000 وحدة دولية من فيتامين A) .

بعد اربعة اسابيع من العلاج تم قياس كل من انزيمات الكبد GOT و GPT في المصل . واطهرت النتائج ان المعاملة ب MTX تسببت بزيادة معنوية في كل من انزيمات الكبد عند مستوى احتمالية ( $p < 0.05$ ) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة في حين ان المعاملة بفيتامين A لم تسبب اي تغييرات معنوية مع ظهور انخفاض غير معنوية في المجموعة المعاملة بال (MTX, Vit A) عند مقارنتها بمجموعة السيطرة .

ومن هذا تم الاستنتاج بان المعاملة بال MTX بان له تأثير سام على الكبد وهذا التأثير ينخفض عند المعاملة ب Vit .A

## Introduction

يعتبر الميثو تريكسيت (Methotrexate(MTX) عامل مضاد للالتهابات ويستخدم اساسا في علاج الاورام الخبيثة ويمتلك ايضا صفات علاجية ضد الالتهابات غير الورمية كعامل مثبط للمناعة (Somi et al 2011).

ويستخدم جرعات واطنة منه في علاج الكثير من الالتهابات الروماتيزمية والصدفية , بينما الجرعات العالية من العلاج فتستخدم في علاج سرطان الدم الحاد Leukemia (Jahovic,etal.,2003) ويستخدم بشكل محدود سريريا لانه يسبب تسمم للكبد وذلك اعتماد على الجرعة المستخدمة , كذلك يسبب تنشيط الجذور الحرة والاشكال الفعالة للاوكسجين (ROS) reactive oxygen system التي تعتبر الاساس المرضي للـ (Hemedia and MTX) (Mohafez ,2008)

ان استخدام الـ MTX يسبب اجهاد تأكسدي لخلايا الكبد ومن المعروف ان الخلايا تحمي نفسها من الاجهاد التاكسدي بفعل انزيمات معينة , فيتامينات ومواد اخرى تعرف بمضادات الاكسدة (Coleshwars et al .,2010).

مضادات الاكسدة هي جزيئات او مركبات تعمل على ازالة الجذور الحرة وهي تمتلك الكترولونات حرة في غلافها حيث تتفاعل مع الجذور الحرة وتكون بالنهاية مواد غير ضارة مثل الماء وبالتالي ترتبط مع الجذور الحرة وتعمل على تحويلها الى مواد خاملة لتحمي الخلايا من الضرر بالاجهاد التاكسدي (Halliwell ,2011). ومن المواد التي تعمل على حماية الانسجة من الاجهاد التاكسدي هي الفيتامينات وذلك بسبب تأثيرها الفعال والامن على الخلايا وبالامكان تناولها بتركيز عالية وبدون اثار جانبية (Iribhogbe et al., 2011).

## الهدف من الدراسة

- 1- دراسة تأثير الـ MTX على التشاط الوظيفي للكبد
- 2- دراسة دور Vit A في تقليل السمية لعلاج الـ MTX على الكبد .

## 2: استعراض المراجع

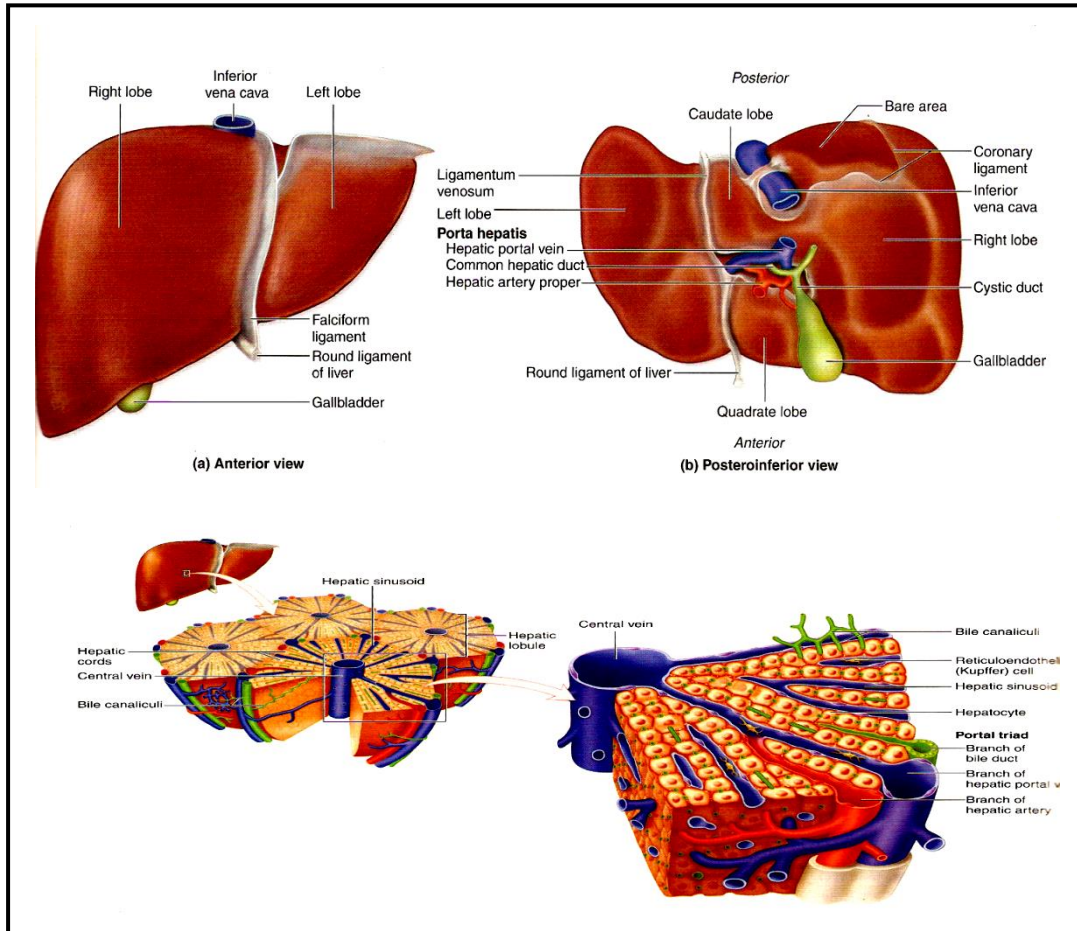
### 1-2: الكبد Liver

يعد الكبد اكبر عضو عُدي في الجسم ، لونه بني محمر ، مخروطي الشكل اسفنجي التركيب، يقع في الجانب الايمن تحت الحجاب الحاجز، حافته الامامية السفلى تقع خلف حافة القفص الصدري السفلى rib cage. الكبد ليس كتلة واحدة بل مقسم على أربعة فصوص غير متساوية بالحجم فصين رئيسيين ايمن و ايسر ، والفص الايمن يكون اكبر من الفص الايسر اذ يكون مقسماً على فصين ثانويين هما: الفص الذيلي Caudal lobe ، والفص المربع Quadrate lobe (Watson,2002) كما في شكل (1-6).

يحيط بالكبد محفظة من نسيج ضام تمتد من هذه المحفظة حواجز تخترق الكبد و تقسمه على فصيصات عدة Lobules متعددة الالوجه Multi sided، يعد الفصيص الكبدى liver lobule الوحدة الوظيفية الاساسية للكبد يبلغ قطر الواحدة من هذه الفصيصات حوالي 1 ملي متر كما يتميز بوجود ثلاثي بوابي في كل زاوية ، و يكون متكوناً من ثلاثة تراكيب رئيسية و هو الوريد البابي الكبدى hepatic portal vein ، والشريان الكبدى hepatic artery ، و الصفراء bile فضلاً عن الالوعية اللمفاوية و الاعصاب.

كل فصيص يحتوي على وريد مركزي central vein محاط بخلايا برنكيمية حشوية مكعبة الشكل تعرف بالخلايا الكبدية hepatocyte و مرتبة بشكل اشربة و ما بين هذه الاشربة توجد فسح دموية تدعى بالجيبانيات Sinusoids ، وفضلاً عن الخلايا الكبدية تكون الجيبانيات مبطنة بنوعين من الخلايا هما: الخلايا البطانية الاندوثيلية Endothelial cells ، وخلايا كبفر البلعية Phagocytic Kupffer cells (Mckiley and O'Loughlin , 2006).

يقوم الكبد بتنظيم مستوى الكلوكوز في الدم و مايزيد عن حاجة الجسم يخزن بوصفه نشاء حيواني Glycogen و الذي يحوله الى كلوكوز عند الحاجة. كما تقوم خلايا كبر Kupffer بتخليص الجسم من السموم و العديد من الادوية. كما و تنتج خلايا الكبد السائل المراري الذي يحوي على الكوليسترول و الدهون المفسفرة و البيليروبين و املاح الصفراء و يصنع الكبد البروتينات الدهنية كمايقوم الكبد بانتاج بروتينات الدم مثل الألبومين Albumin فضلاً عن الكلايوجين يقوم الكبد بتخزين الدهون و الفيتامينات التي تذوب في الدهون (Vitamins A, D, E &K) و المعادن مثل النحاس و الحديد . لذا يعد الكبد العضو الرئيس المسؤول عن ايض الكربوهيدرات و الدهون و البروتينات و الاحماض الامينية (Watson,2002 ; Mckiley and O'loughlin , 2006)



شكل (1-1) تركيب الكبد (Mckiley and O'loughlin, 2006)

## 2-1-1: انزيم كلوتاميك - اوكلوواستيت ترانس امينيز

### Glutamic Oxaloacetic transaminase (GOT)

ويسمى ايضاً بـ اسبيريت امينو ترانس امينيز (AST) Asparat amino  
Transaminase يوجد انزيم الـ GOT في معظم الانسجة مثل : القلب ، والكبد ، والكلية ،  
والبنكرياس، والعضلات و لكنه يكون بنسب متفاوتة اذ يحتوي القلب على اعلى نسبة و يليه الكبد  
(Coppo et al .,2005).

لوحظ ارتفاع في مستوى الانزيم عند حصول تلف للأنسجة وعند التهاب الكبد infective  
hepatitis كما يزداد مستوى الانزيم في حالة الالتهاب الحاد للبنكرياس Acute Pancreatic  
و لوحظت هذه الزيادة في نصف المرضى المصابين بالتهاب البنكرياس الحاد ، في حين  
ينخفض مستوى الانزيم في حالة الحمل او نقصان فيتامين B في الغذاء  
المتناول (Tchounwou et al,2004).

## 2-1-2 : انزيم كلوتاميك بايروفيك ترانس امينيز

### Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT)

و يسمى ايضاً الالنين امينو ترانس فيريز (ALT) Alanine amino Transferase ،  
و يوجد ايضاً في معظم الانسجة حيث يحتوي الكبد على النسبة الاعلى منه تليه الكلية و من ثم  
القلب ؛ لذلك يعد هذا الانزيم الاكثر استعمالاً في تشخيص امراض الكبد قياساً بالـ GOT  
(Coppo et al .,2005).

يزداد مستوى انزيم الـ GPT في حالة ضرر أو موت الخلايا الكبدية hepatocyte  
damage ، وتليف الكبد Cirrhosis ، وسرطان الكبد hepatic tumor ، والتهاب الكلية

Kidney infection ، والتلوث الكيميائي Chemical Pollution، واحتشاء العضلة القلبية

.(Thomas, 2000) Myocardial infection



### 3: المواد وطرائق العمل

#### 3-1: معاملة الحيوانات

وزعت حيوانات التجربة الى اربعة مجاميع احتوت كل مجموعة على 3 حيوانات

#### المجموعة الأولى :

مجموعة السيطرة control ارناب سليمة جرعت بالماء المقطر بجرعة مقدارها 2 مل يومياً

ولمدة اربعة اسابيع.

#### المجموعة الثانية :

مجموعة ارناب سليمة جرعت بـ MTX بجرعة مقدارها 20 ملغ داخل البريتون يومياً ولمدة

اربعة اسابيع (Somi *et al.*, 2011).

#### المجموعة الثالثة :

مجموعة ارناب سليمة جرعت بـ MTX بجرعة مقدارها 20 ملغ/ بالاضافة الى 5000

وحدة دولية من ( Vit A ) عن طريق الفم يومياً ولمدة اربعة اسابيع. (Somi *et al.*, 2011).

#### المجموعة الرابعة :

مجموعة ارناب سليمة جرعت بجرعة مقدارها 5000 وحدة دولية من ( Vit A ) عن طريق

الفم يومياً ولمدة اربعة اسابيع. (Yuncu *et al.*, 2011).

وبأنتهاء مدة المعاملة التي استمرت لمدة اربعة اسابيع، وزنت الحيوانات وتم جمع عينات الدم من

كل حيوان بطريقة طعنة القلب Cardiac puncture باستخدام محقنة طبية سعة 10 ملي

لترات. (بعد تخديرها بالايثر).

### 3-2: مصل الدم

تم الحصول على المصل وذلك بنبذ نماذج الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي centrifuge وبسرعة مقدارها 3000 دورة بالدقيقة ولمدة 15 دقيقة . ثم اخذ المصل وحفظ بدرجة -20° لحين الاستعمال. حيث استخدم المصل لقياس مستوى GOT، GPT.

### 3-2-1: قياس فعالية انزيمي GPT و GOT في مصل ومجانس الكبد

#### Glutamic pyruvic transaminase and glutamic oxaloacetic transaminase measurment

تم قياس فعالية انزيمي GPT و GOT في مصل الدم ومجانس الكبد المجاميع المعاملة فضلا عن مجموعة السيطرة وذلك باتباع خطوات التعليمات المرافقة لعدة الفحص الخاصة بقياس فعالية انزيمي GPT و GOT

#### المحاليل المستخدمة

A – 1 Reagent ( GOT substrate )

ويتحول على : -

- phosphate buffer (7.5 = ph) بتركيز ( 85 ) ملي مول/لتر
- Asparate بتركيز ( 200 ) ملي مول/لتر
- $\alpha$ - Ketoglutarate بتركيز ( 2 ) ملي مول/لتر

B – 2 Reagent (GPT substrate)

ويتحول على :

- phosphate buffer (7.5 = ph) بتركيز ( 95 ) ملي مول/لتر
- Alanine بتركيز ( 200 ) ملي مول/لتر
- $\alpha$  - Ketoglutarate بتركيز ( 2 ) ملي مول/لتر

Reagent 3 - C

ويحتوي على : 2,4 dinitrophenyl hydrazine بتركيز ( 1 ) ملي مول/لتر

(Standard) Reagent 4 - D

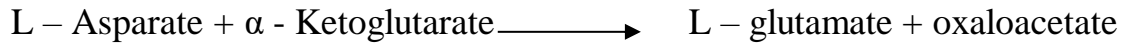
ويحتوي على : Standard pyruvate

## المبدأ principle

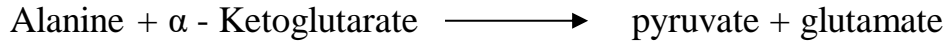
تم قياس فعالية انزيمي ال GPT و ال GOT وفق طريقة لونية Colorimetric

method اعتماداً على التفاعلات التالية :

GOT



GPT



حيث يقاس pyruvate و ال oxaloacetate المتكون بشكل مشتق 2,4 dinitrophenyl hydrazine

## طريقة العمل Procedure

	GOT	GPT
GOT Substrate Reagent 1	1 مل	-
GPT Substrate Reagent 2	-	1 مل

توضع الانابيب في الحاضنة لمدة 5 دقائق بدرجة 37 م°

المصل SERUM	0.2 مل	0.2 مل
يمزج ويرجع الى الحاضنة وبدرجة حرارة ( 37 ) م° ولمدة	( 1 ) ساعة	( 30 ) دقيقة

Dinitrophenyl hydrazine Reagent 3	1 مل	1 مل
-----------------------------------	------	------

تمزج الانابيب وتوضع بوضع عمودي لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة

NaOH 0.4 N	10 مل	10 مل
------------	-------	-------

تمزج الانابيب جيداً ثم تترك لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم تم تصفير جهاز

المطياف الضوئي بالماء وعدة محلول الكشف Blank، ثم قيست امتصاصية لمحتويات

الانبوبين ( GOT و GPT ) على التوالي على طول موجي 505 نانوميتر

بواسطة Spectrophotometer ثم تحسب فعالية الانزيمين بوحدة الوحدة/لتر

وذلك باستعمال المنحني القياسي Standard Curve المعد حسب النشرة المرافقة مع العدة.

تم تحليل النتائج احصائياً باستخدام التصميم العشوائية Complete Randomized Design (CRD) على وفق ما جاء في الساهوكي ووهيب ( 1990 ) . واختبرت الفروقات بين متوسطات القيم بطريقة تحليل التباين ( ANOVA ) Analysis of variance واختبار دنكن متعدد الحدود ( Duncan , 1955 ) واستخدم لذلك البرنامج الاحصائي الجاهز نظام الرزمة الاحصائية الاجتماعي (SPSS) Social Package Statistical System (العقيلي و الشايب , 1998 ) .

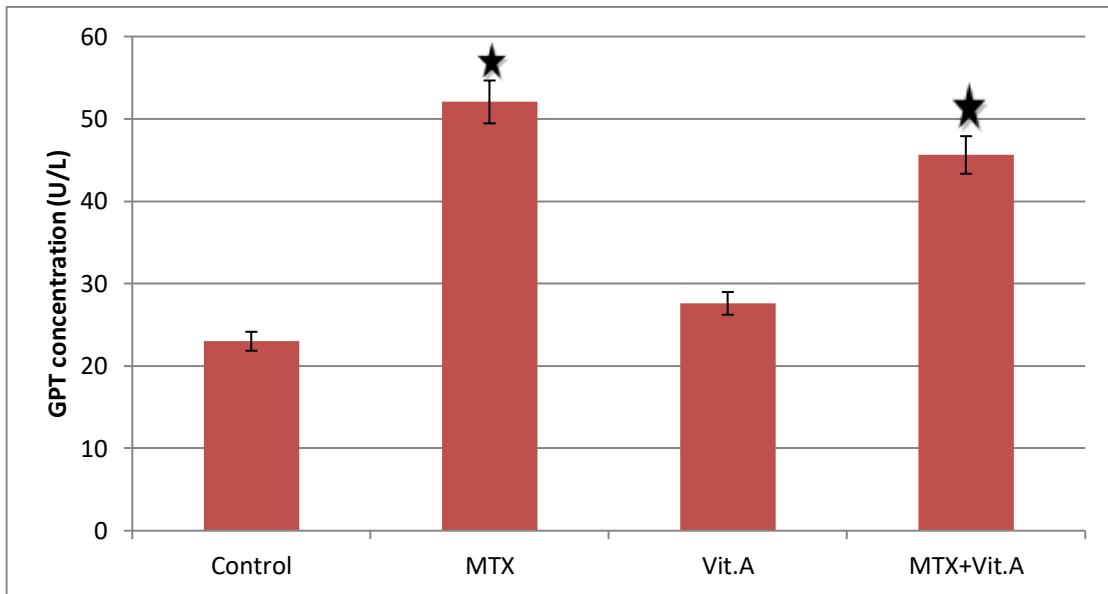
## 4: النتائج

### Results

#### 1-4: اختبارات وظائف الكبد

##### 1-1-4 : مستوى انزيم (GPT) في المصل

أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأهناك زيادة معنوية في مستوى الانزيم للمجموعة الثانية المعاملة بال MTX والمجموعة الرابعة المعاملة بال MTX+ Vit A عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية ( $P>0.05$ ) في حين كانت هناك زياده غير معنوية في المجموعة الثالثة المعاملة بال Vit A فقط عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة والتي اظهرت نقصانا معنويا عند مقارنتها مع بقية المجاميع المعاملة وكما مبين في الشكل (1-4) والجدول (1-4)

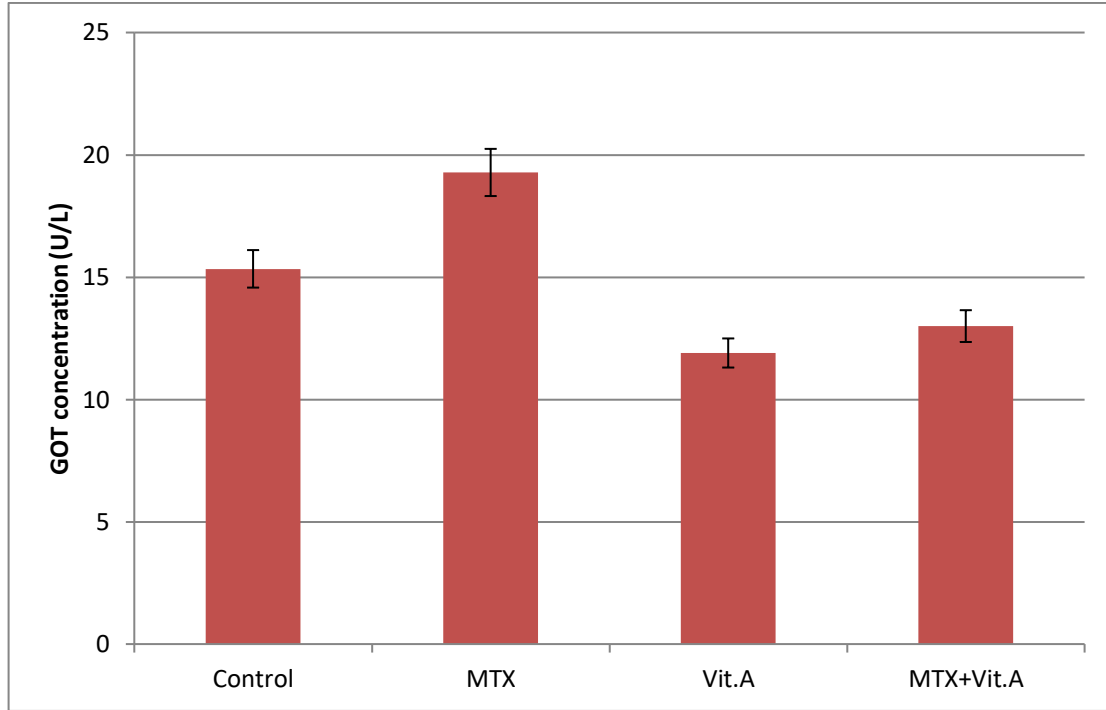


#### شكل (1-4) يوضح تأثير المعاملات في مستوى انزيم (GPT) في المصل

علامة النجمة توضح الفروقات المعنوية عند مستوى احتمالية ( $P>0.05$ )

##### 1-1-2 مستوى انزيم ال (GOT) في المصل :

بينت نتائج الدراسة الحالية عن وجود زيادة غير معنوية في مستوى الانزيم في المجموعة الثانية والمعاملة بال MTX عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة في حين كان هناك انخفاضا غير معنويا في بقية المعاملات عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة عند مستوى الاحتمالية ( $P> 0.05$ ) وكما موضح في الشكل (2-4) والجدول (1-4) .



شكل (2-4) : يوضح تأثير المعاملات على مستوى انزيم ال GOT في المصل

جدول (1-4) : يوضح تأثير المعاملات على مستوى انزيمات الكبد في المصل

المجاميع Group	مستوى الانزيمات في المصل Serum Enzymes Activity	
	GPT (U/L)	GOT (U/L)
Control	23.00 ± 3.70 b	15.34 ± 2.27 ab
MTX( 20 mg/Kg)	52.06 ± 6.82 a	19.28 ± 2.65 a
Vit.A (5000 IU)	27.60 ± 3.19 b	11.90 ± 2.03 b
MTX (20mg/Kg) +Vit.A (5000 IU)	45.62 ± 4.36 a	13.00 ± 1.09 b

## 5 المناقشة

### Descution

1-5: مستوى انزيم ال GPT في المصل :

كشفت الدراسة الحالية عن زيادة معنوية في مستوى انزيم GPT في المجموعة المعاملة بالميثوتريكسيت MTX عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره كل من (Jawied ,2009, Swadi,2009) الذين اثبتوا بان ال MTX يسبب ارتفاعا معنويا في مستوى الGPT في الفئران وهذا ما ذكره ايضا كل من (Al saaadi and Alwachi , 2013) ويعتبر انزيم ال GPT من الانزيمات التي تفرزها خلايا الكبد وزيادته في المصل تشير الى حدوث تسرب للانزيم من اغشية الخلايا الكبدية الذي يشير بدوره الى موت الخلايا الكبدية الذي يحدث بسبب تنخر الخلايا نتيجة لتأثير العلاج فيها ( Hemeida and Mohfez, 2008 ) كما أظهرت النتائج انخفاضا غير معنويا في مستوى الانزيم عند المعالجة مع Vit A مقارنة مع مجموعة ال MTX ويمكن ان يكون هذا بسبب جرعة الفيتامين التي تعمل على وقاية الخلايا الكبدية من التأثير السام للعلاج حيث يعمل كمضاد للاكسدة الذي يعمل على تخفيض بيروكسدة الدهون في اغشية الخلية الكبدية التي نعتبر السبب في تسرب الانزيمات من الخلية وهذا ما ذكره ( Uboh ) وزملائه عام 2009 حيث وجد بان فيتامين A يعمل على حماية خلايا الكبد وتقليل الضرر الحاصل وتقليل مستوى الانزيم في المصل .

2-5 : مستوى ال GOT في المصل :

أظهرت الدراسة الحالية وجود فروقات غير معنوية في مستوى الانزيم بين مجموعة ال MTX ومجموعة السيطرة وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره Abdul-Wahab, 2012 الذي وثق بعدم وجود فروقات معنوية في مستوى الانزيم في الجرذان المعاملة بال MTX عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة .

كما اظهرت النتائج اختلافات غير معنوية في مستوى الانزيم في المجاميع المعاملة بفيتامين A وهذا يتفق مع الزيني وجماعته 2012 . وقد افيد بان فيتامين A له دور كبير في وقاية الاغشية الخلوية للخلايا الكبدية وبدوره يقلل من تسرب الانزيم الى الدم ( Attia , et ai ., 2001) .



## المصادر العربية

- ❖ الراوي ، خاشع (1984) ، المدخل إلى الاحصاء ، كلية الادارة والاقتصاد ، جامعة الموصل . الساهوكي، مدحت و وهيب ،كريمة محمد (1990).تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب.مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر ، الموصل ، 488صفحة.
- ❖ العقيلي، صالح أرشيد وسامر، محمد الشايب (1998). التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج SPSS.دار الشروق للنشر والإعلان، عمان- الأردن 420.
- ❖ العلوجي، صباح ناصر(2003)علم المصطلحات الطبية.دار الفكر للطباعة و النشر.الطبعة الأولى، الأردن.
- ❖ العلوجي، صباح ناصر(2002)علم وظائف الأعضاء.الطبعة الثالثة.دار الفكر للطباعة و النشر،الأردن.

## References

- ❖ **Abdul-Wahab, F.K. and Abdul-Jalil, T.Z. (2012).** Study of iraqi spinach leaves (phytochemical and protective effects against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats). Iraqi J Pharm Sci. 21(2):8-17.
- ❖ **Al- Rawi, M.M. (2007).** Effect of trifoliumsp. flowers extracts on the status of liver histology of streptozotocin-induced diabetic rats. Saudi J. Biol. Sci. 14 (1): 21-28.
- ❖ **Al-Alwachi, S. N. (2003).** Biology. Dar Al-Fiker press, Jordan. pp.34.(In Arabic)
- ❖ **Alwachi, S.N. and Alsaadi, Y.L. (2013).** Effect of methotrexate on the liver enzymes and lipid profile in adult female albino mice. J. Baghdad for Sci. 10(1): 671 -681.
- ❖ **AL-Zeiny, S.S.M. (2012).**The role of antioxidant (vit-A and glutamine) in ameliorating methotrexate induced hepatic toxicity in rats. Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences. 3(1):113-123.

- ❖ **AL-Zeiny, S.S.M.; AL-Shimmary, B.A.A.; AL-Safi, S.M.M.; Hadi, N.R.; AL-Azam, A.A.H. and AL-janabi, A.A.A.(2012).** The effect of vitamine A and glutamine on methotrexate Induced hepatotoxicity in rats. *Kufa Journal for Nursing Sciences*. 2(2):56-63.
- ❖ **Attia, M.M.A.; Sayed, A.M.; Ibrahim, F.A.; Mohammed, A.S. and EL-Alfy, M.S. (2011).** Effects of antioxidant vitamins on the oxidant/antioxidant status and liver function in homozygous beta-thalassemia. *Romanian J. Biophys*. 21(2): 93-106.
- ❖ **Hadi, N.R.; Al-Amran,F.G. and Swadi,A. (2012).** Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Pharmacother*. 3(3):248-53.
- ❖ **Hemeida, R.A and Mohafez, O.M. (2008).** Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. [J. Egypt. Natl. Canc. Inst.](#) 20(2):141–8.
- ❖ **Jahovic, N.; Cevik, H.; Sehirli, A.O.; Berrak, C.Y. and Sener, G. (2003).**Melatonin prevents mehotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J.Pineal Res*.34:282-287.
- ❖ **Jwied, A.H. (2009).** Hepatoprotective effect of the aqueous extract of camellia sinensis against methotrexate-induced liver damage in rats. *Iraqi J Pharm Sci*. 18(2):73-79
- ❖ **Somi, M.H.; Hajipour, B.; Abad, G.D.A.; Hemati, M.R.; Ghabili, K.; Khodadadi, A. and Vantankhan, A. M. (2011).** Protective role of lipoic acid on methotrexate induced intestinal damage in rabbit model. *Indian J Gastroenterol*. 30(1):38-40.
- ❖ **Swadi, A.A. (2009).** Modification of methotrexate induced hepatotoxicity. M.SC. Thesis. College of medicine, university of kufa

- ❖ **Uboh, F.E.; Ebong, P.E. and Umoh, I.B. (2009).**Comparative hepatoprotective effect of vitamins a and e against gasoline vapor toxicity in male and female rats. *Gastroenterol Res.* 2(5): 295-302.
- ❖ **Yuncu, M.; A.Erlap; M.Koruk; Sari, I.; Bagci, C.; Inaloz, S. (2004).** Effect of vitamin A against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. *Med Prince Pract.*13:346-352.