

دراسة وظيفية ووراثية عن بعض تأثير إزالة المبايض على الدماغ والحبل الشوكي في اناث الارانب المحلية

همام علي هادي*
د. وفاق جبوري البازي
جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

*بحث مستقل للباحث الاول

المستخلص

شملت الدراسة الحالية تأثير إزالة المبايض على النسيج العصبي للدماغ والحبل الشوكي لبعض التغييرات على المعايير الوظيفية والمادة الوراثية الجزيئية للجين *Gadd 153*. قسمت عشوائيا 16 من اناث الارانب المحلية البالغة الى مجموعتين وبواقع (8 / مجموعة) واعتبرت مجموعة السيطرة (G1) في حين تم إزالة المبايض للمجموعة الثانية واعتبرت مجموعة المعاملة (G2). واستمرت لمدة ستة اشهر، جمعت عينات الدم بطريقة الوخز القلبي المباشر (heart puncture) لدراسة بعض المعايير الوظيفية الاتية:- الكليسيريدات الثلاثية Triacylglycerol TG والكليسترول Total cholesterol TC والشحوم البروتينية عالية الكثافة High density lipoprotine HDL , والشحوم البروتينية واطنة الكثافة Low density lipoprotine- LDL والشحوم البروتينية واطنة الكثافة جدا Very low density lipoprotine- VLDL والبروتين الكلي total protein والاستروجين Estrogen hormone E2 والكلوكوز glucose في مصل الدم serum Blood , كما تم سحب عينات السائل الدماغي الشوكي Cerebro-spinalfluid CSF لقياس الكلوكوز والبروتين الكلي، فضلا عن دراسة التغييرات الحاصلة في المادة الوراثية الخاصة لجين *Gadd153* في اناث الارانب المحلية المزالة المبايض باستخدام تقنية **Real time PCR**. اظهرت نتائج الدراسة الحالية:-

زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى تركيز الكلوكوز و ال-**VLDL-,TG,TC,LDL** , وانخفاض معنوي ($P<0.05$) في مستوى تركيز والبروتين الكلي و-**HDL** في مصل الدم . وانخفاض معنوي ($P<0.05$) في مستوى تركيز البروتين الكلي وارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى تركيز الكلوكوز في السائل الدماغي الشوكي. كما ان إزالة المبايض تؤدي الى حدوث اجهاد تأكسدي ومن ثم زيادة في التعبير الجيني لل-*Gadd153* في النسيج العصبي للدماغ والحبل الشوكي. ان إزالة المبايض تؤدي الى تغييرات مرضية في الدماغ والحبل الشوكي وتغيير في التعبير الجيني لجين ال-*Gadd 153* لاناث الارانب المحلية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

Summary

The present study was conducted to determine the impact ovariectomy in rabbits on the nervous tissue of the brain and spinal cord and some changes to the standards physiological and molecular genetic of the gene *Gadd 153*.

16 animals were divided at random from the adult rabbits into two groups rabbits (8 / group) were considered the control group G1 (while the second group was treated to remove the ovaries and considered G2 for six months) Samples collected by direct cardiac puncture (heart puncture) and drag Alambashrell-CSF on order to the following criteria:-

High density lipoprotine-cholesterol HDL-c, Low density lipoprotine-cholesterol LDL-c, Very low density lipoprotine-cholesterol VLDL-c, Total cholesterol TC, Triacylglycerol TG, Estrogen hormone E2, glucose and total protein of CSF and serum Blood in the brain and spinal cord in addition to study changes in the molecular genetic of *GADD153* gene in ovariectomized female rabbits ovaries removed using local technology. Real time PCR The results of the current study : -

- Showed significant decrease E2 and protein and HDL-c ($P<0.05$) in G2. also there were significant increase ($P<0.05$) glucose and LDL-c and ,TC,TG, VLDL-c in G2 compared with the control group G1.

The result also - Showed significant decrease ($P<0.05$) the level of glucose and a significant increase ($P<0.05$) glucose in the cerebrospinal fluid of G2 group compared with the control group G1.

- the molecular Genetic study results indicated higher gene expression to gene *Gadd 153* compared with the control group G1.

المقدمة

يمثل سن اليأس Menopause المدة من حياة المرأة التي تتوقف فيها الدورات المبيضية، يحدث بين عمر 45 و 55 سنة ، كما لا تفرز المبايض الأستروجين أو البروجستيرون ونتيجة لانخفاض في مستوى الأستروجين تزداد نسبة الإصابة بأمراض الشريان التاجي والأوعية الدموية. (1)(2)

تمكن الباحثين من إيجاد علاقة بين هرمون الأستروجين و وظائف الدماغ سواء أكان ذلك في التعلم ام الذاكرة ومن ثم فان نقص هذا الهرمون يعد أحد العوامل الخطرة في تطور أعراض مرض الزهايمر، كما اوجد الباحثين العديد من الأدلة التجريبية عن دور الأستروجين في تأخير ظهور الأعراض الأولية لمرض الزهايمر (3) (4)

كما اكد الباحثون أن إزالة المبايض تؤدي إلى حصول حالة تدعى بسن اليأس الجراحي نتيجة للاختلال في مستوى تركيز هرمون الأستروجين إذ أن اغلب السيدات يتعرضن لما يسمى باليأس الاصطناعي نتيجة لعدد من التداخلات الطبية إذ تؤدي إزالة المبيضان جراحياً قبل بلوغ المرأة سن اليأس إلى إصابتها بأعراض اليأس المبكر ويحدث الأمر نفسه إذا تعرض المبيضان للتلف نتيجة للتعرض للإشعاعات ، أو المعالجة بالأدوية المضادة للسرطان ، أو بعض العلاجات الكيميائية الأخرى (5) كما اكد الباحثون في دراسات عدة يتم تفعيل جين GADD153 من خلال اليات الاجهاد التأكسدي للشبكة الاندوبلازمية والذي يؤدي الى بداية الإصابة بالزهايمر (6)

كما ان جين GADD153 يقوم بتفعيل (BACE1B) secretase- الذي ينتج شكل فريد من الـ APP هو بروتين الـ AB والحد من انزيم المضاد للـ AB مما يؤدي الى زيادة مستوى هذه اللويحات في الدماغ ومن ثم الإصابة بالزهايمر (7) كذلك اكدت دراسة اجريت على الارانب ان *siRNA to gadd153* قلل بشكل كبير من انتاج AB المسبب للزهايمر ، فضلا عن ذلك ان الارانب تمتلك تسلسل جيني للـ AB مشابه لتسلسل الجيني للانسان (8)

طرائق العمل

قسمت عشوائياً 16 من إناث الأرانب الى مجموعتين (ثمانية لكل مجموعة) طيلة مدة التجربة وكانت المجاميع :- مجموعة السيطرة G1 تركمتن دون ازالة المبايض. المجموعة الثانية G2 عوملت بإزالة المبايض الثنائية فقط Bilateral overiectomy، لقد تمت العملية تحت ظروف جراحية معقمة إذ تم تخدير الحيوانات باستخدام مزيج من الكيتامين - زيلازين (40 ملغم /كغم +5 ملغم /كغم من وزن الجسم) . (9)

تم سحب الدم بعد تجويع الحيوانات طول الليل بعد ستة أشهر من المعاملة اذ تم سحب 7 مل من الدم من القلب مباشرة (heart puncture) ، وقد استخدمت محاقن طبية معقمة سعة 15 مل ، وضع الدم بعد ذلك في أنابيب خاصة غير حاوية على مادة مانعة للتخثر ثم فصل المصل بواسطة جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة لقياس بعض المعايير الكيموحيوية وبعض المعايير الفسلجية وقد تم حفظ الأمصال في ثلاجة Refrigerator في درجة حرارة 4°C.

تم تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم (TC) Serum Total Cholesterol Concentrations بالطريقة الإنزيمية وفقاً لطريقة (10) وتقدير تركيز الكليسيريدات الثلاثية (11) Estimation of Triacylglycerol (TAG) . Concentrations وتقدير تركيز الكوليستيرول في الشحوم البروتينية العالية الكثافة Estimate Concentrations of Cholesterol HDL بالطريقة الإنزيمية وفقاً لطريقة (12) وتقدير تركيز الكوليستيرول في الشحوم البروتينية الواطئة الكثافة Low-density lipoprotine (LDL-) حسابياً باستخدام معادلة Friedwald equation (13) هي :

$$LDL = TC - (HDL - c + TAG / 5)$$

وقياس تركيز الكوليستيرول في الشحوم البروتينية الواطئة الكثافة جداً (VLDL) Very Low density lipoprotein-c من خلال تقسيم قيمة TAG على 5 $VLDL = TAG / 5$ (14)

وقياس تركيز هرمون الأستروجين Estimate of Estrogen hormone Concentration في مصل الدم المأخوذ من حيوانات المجموعة الأولى (G1) وحيوانات المجموعة الثانية (G2) وذلك بإتباع الخطوات المرافقة مع عدة الفحص الخاصة لتقدير الهرمون ، (Estrogen Kit German Veda Lab).

فحص مستوى تركيز السكر Blood Glucose test في مصل دم الأرنب بواسطة استخدام عدة التحليل (Kit) من نوع (Rondox.Laboratorries Ltd.,Co.Antrim, United Kingdom) والـ (Kit) هو عبارة عن عبوات جاهزة تحوي بعض أو كل الكواشف والمواد الضرورية لانجاز الاختبار.

تقدير مستوى تركيز البروتين الكلي Determination of total protein استخدمت طريقة البايوريت Biuret method لتقدير البروتين الكلي في مصل الدم (15)،

و قياس مستوى تركيز البروتين الكلي في عينة السائل الدماغي الشوكي وضعت العينة في الانبوب الثاني في جهاز النبد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق، وتم فصل الرائق عن الراسب و استعمل الرائق لتقدير تركيز البروتين و سكر الكلوكوز في CSF.

استخدم في تقدير تركيز البروتين الطريقة المعتمدة من قبل شركة Randox(United Kingdom)- Laboratories Ltd

التحليل الإحصائي Statistical analysis استخدم اختبار student t-test للاستدلال على الدلالة المعنوية، كما استعمل المعامل المعنوي الأصغر (Least Significance Difference (LSD) في المقارنة بين النتائج فضلا عن الطرائق العيادية المستخدمة في تحديد المتوسط Mean والخطأ القياسي (16).

الدراسة الجزيئية

● فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) **Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR)**
تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس المستويات الكمية للحمض النووي المرسل (mRNA) للاستدلال على مقدار التعبير الجيني (Gene expression) لجين *Gadd153* المسؤول عن بداية حدوث الإصابة بمرض الزهايمر في عينات ادمغة حيوانات التجربة، وكذلك تم استخدام جين *GAPDH* كجين منظم قياسي لحساب التعبير الجيني. تم إجراء هذا الفحص حسب ما اوضحه (17).

● استخلاص الحامض النووي الرايبوزي الكلي **Total RNA extraction**
تم استخلاص الحمض النووي الرايبوزي الكلي وذلك باستخدام عدة ال *Trizol kit* المجهز من قبل شركة بايونير الكورية ولقد تم العمل بهذه العدة بحسب تعليمات الشركة المصنعة.

● قياس ونقاوة الحامض النووي الرايبوزي **Assessy RNA yeild and quality**
تم الكشف عن الحمض النووي الرايبوزي المستخلص من العينات بواسطة استخدام جهاز خاص وهو ال *Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA)* وذلك من خلال ثلاث جوانب الاول تحديد تركيز الحمض النووي RNA والثاني قياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة 260-280 nm اما الجانب الثالث توثيق وجود الحمض النووي RNA باستخدام الترحيل الكهربائي

● المعاملة بانزيم **DNase I Treatment**
تم معاملة المستخلص من الحمض النووي RNA باستخدام *Dnase I* للتخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص وذلك بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم .

طريقة تصنيع ال cDNA synthesis

تم استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي cDNA المكمل للـ DNA من عينات الحمض النووي ال RNA المستخلص باستخدام عدة *AccupowerRockscript RT Premix kit* المجهز من قبل شركة بايونير الكورية.

● فحص **Quantitative Real-Time PCR (qPCR)**
تم إجراء فحص ال qPCR لعينات ال cDNA وكذلك لتحديد مستوى التعبير الجيني *Gene expression level* لجين *Gadd153* وكذلك للجين المحافظ القياسي *GAPDH gene*.
أذ تم استخدام عدة *Accupower Green Star Real-Time PCR kit* المجهزة من قبل شركة بايونير الكورية، لاجراء هذا الفحص والحاوي على صبغة السايبر الخضراء والتي تتفاعل مع الجينات المتضخمة في جهاز ال *Real-TimePCR* وقد تم إجراء الفحص بحسب طريقة (Prasanthi, et. al., 2011).

● طريقة تحليل بيانات **Real-Time PCR data anlysis**
تم تحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلر في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة *livak method* والتي وضعت من قبل (18) والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية (Relative Quantitive) والكمية المطلقة (Absolute Quantitive)

النتائج والمناقشة

تأثير ازالة المبايض على مستوى تركيز الاستروجين والشحوم البروتينية في مصل الدم:

● التغيرات في معدل تركيز هرمون الاستروجين E2.
يشير الجدول (1-4) الى وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مستوى تركيز هرمون الاستروجين و، HDL وارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في مستوى تركيز ال LDL، TG، TC، VLDL لمجموعة G2 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة G1 يعزى سببه ازالة المبايض من الحيوانات مما ينتج قلة في صناعة وانتاج هرمون الاستروجين ومن ثم انخفاض تركيزه وهي نتائج متفقة مع (19).

أكدت الدراسات ان التغيرات بالوظائف الادراكية بعد سن اليأس مرتبطة بنقص هرمون الاستروجين. من خلال تجربة استخدموا فيها مجموعة من الفئران المزالة المبايض جراحيا وعوملت مع هرمون الاستروجين على فترات منتظمة فقد لاحظوا فيها زيادة فاعلية انزيم *AChE* في منطقة الذاكرة *Hippocampus* وقشرة الدماغ الامامية *Frontal Cortex* (3) مما يؤكد دور هورمون الاستروجين وأهميته بوظائف الذاكرة ، كماأكد الباحثون وجود علاقة بين نقص هورمون الاستروجين ووظائف الدماغ في التعلم والذاكرة ومن ثم يعد نقص هذا الهرمون من العوامل الخطرة في تطور اعراض الزهايمر (4)

جدول (1-4) تأثير ازالة المبايض على مستوى هورمون الاستروجين و معدل الشحوم البروتينية في مصل الدم في اناث الارانب.

متوسط المعايير المجاميع	الاستروجين ug/dl	TC mg/ml	TG mg/ml	HDL mg/ml	LDL mg/ml	VLDL mg/ml
G1	54.43±0.29 A	84.05±0.04 A	187.41±0.72 A	15.25±0.15 A	31.32±0.20 A	37.48±0.14 A
G2	19.91±0.30 B	184.22±6.87 B	245.86±1.20 B	8.33±0.07 B	119.63±6.92 B	49.17±0.24 B
L.S.D	0.88	16.86	3.01	0.36	2.70	0.06

المعدل ± الخطأ القياسي، n = 8/ مجموعة .

الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عموديا عند مستوى احتمالية (p<0.05)

G1 = مجموعة السيطرة

G2 = مجموعة حيوانات المزالة المبايض

أظهرت نتائج الجدول (1-4) لمجموعة الأرانب مستأصلة المبايض زيادة معنوية (P<0.05) في تركيز الكوليسترول الشحوم البروتينية واطئة الكثافة LDL-C والشحوم البروتينية واطئة الكثافة جداً VLDL-C وحدث انخفاض معنوي (P<0.05) في الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL-C وزيادة معنوية في الكليسيريدات الثلاثية TAG عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة وهذه النتائج تتفق مع (20) وعزت هذه الزيادة إلى عملية الاستئصال الجراحي للمبايض ذاتها التي تمثل احد أشكال الإجهاد التأكسدي , أو أن حدوث الارتفاع المعنوي في مستوى صورة الدهن يعود إلى الانخفاض المعنوي في مستوى تركيز هرمون الاستروجين للحيوانات المزالة المبايض (19) ان اهمية الاستروجين بوصفه عامل حماية يحد من نشوء أفات التصلب الشرياني في سن النضوج بينما يزداد في مرحلة سن اليأس نتيجة لانخفاض مستوى هرمون الاستروجين لما له من دور بوصفه عاملاً وقائياً يحافظ على العمليات الايضية للشحوم البروتينية والتي سيتبع عنها انخفاض مستوى apoB-LDL-C وزيادة مستوى HDL-C في بلازما الدم (21) كما إن للاستروجين دور مهم في الفعالية الإنزيمية التي تشترك في تحول الكوليسترول إلى أحماض الصفراء Bile acid بواسطة إنزيم (Cholesterol 7α-dehydroxylase) (22)

إن نتائج الدراسة الحالية توضح أن الاستروجين قد يكون له دور وقائي ضد نشوء وتطور أمراض القلب الوعائية عند النساء مستأصلات المبايض في سن النضوج أو النساء السليمات في سن اليأس نسبة 35%-50(23)(24) وبما إن إزالة المبايض تعتبر احد أشكال الإجهاد التأكسدي والذي يؤدي إلى تحرير الابينفرين والنور ايبينفرين , وينشط هذان الهرمونين إنزيم لايبز الكليسيريد الثلاثي الحساس للهرمون Hormone Sensitive Lipase الذي يوجد بكثرة في الخلايا الدهنية مسبباً التحلل السريع للكليسيريدات الثلاثية وتحرير الأحماض الدهنية التي يزداد تركيزها أحياناً إلى ثمانية أضعاف (25). وعلاوة على أن ازدياد مستويات الكوليسترول بالمصل وبالأخص LDL له علاقة وطيدة مع سن اليأس , وهذا يعزز تأثير هرمون الاستروجين المفيد على الشحوم البروتينية (26). إذ يلاحظ وجود علاقة بين ارتفاع مستوى الكوليسترول في مصل الدم والبلازما والاصابة بمرض الزهايمر (27) (28)

ان الانخفاض في مستوى الاستروجين يؤدي الى حالة الاجهاد التاكسدي من خلال الخلل الحاصل في المؤكسدات ومضادات الاكسدة وهذا الخلل يعمل على ارتفاع الكالسيوم داخل الخلايا وضعف في سلسلة الاكسدة التنفسية في المايوتوكونديريا وزيادة في الاجهاد التاكسدي وبالتالي تحطم في الجزيئات البروتينية الكبيرة واكسدة في الدهون وزيادة في الكوليسترول والشحوم الثلاثية والشحوم البروتينية واطئة الكثافة واطئة الكثافة جدا وبالتالي الموت المبرمج في الخلايا العصبية كذلك تؤدي زيادة مستوى الكوليسترول الى خروجه من اغشية الخلايا العصبية مما يحدث خللا في ابيض الكوليسترول في الخلايا العصبية ومن ثم حدوث الكثير من التغيرات المرضية مثل فرط الفسفرة لبروتين tau وضعف التوصيل للسلالات العصبية نتيجة لموت الخلايا العصبية (29)

• التغيرات في مستوى تركيز البروتين الكلي والكلوكوز في مصل الدم والسائل الدماغي الشوكي

يشير الجدول (2-4) الى وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في معدل تركيز بروتين في مصل الدم وارتفاع معنوي (P<0.05) في معدل تركيز الكلوكوز في مصل الدم في مجموعة الأرانب المعرضة لإزالة مبايض G2 مقارنة مع مجموعة السيطرة G1. ان الانخفاض المعنوي في معدل مستوى البروتين في مصل الدم قد يعود الى الانخفاض في مستوى الاستروجين لان للاستيروجين دور مهم في تخليق البروتينات ومن ثم تغير الوظيفة الخلوية , حيث تدور الأستروجينات في الدم لمدة بضع دقائق فقط قبل أن تصل الخلايا المستهدفة Target. وعند دخولها هذه الخلايا تتحد مع بروتين في السايوبلازم Cytoplasm لتنشط أقساماً " نوعية معينة من DNA وتبدأ عملية الأستنساخ ويتكون RNA خلال بضعة دقائق وأنتشار RNA خلال الهيولي حيث يولد زيادة كبيرة في تكوين البروتين وبالتالي تغير الوظيفة الخلوية. (30) أن للجذور الحرة القدرة على تحطيم الجزيئات الحية (31) , وتعد جزيئة DNA الهدف الرئيس لأصناف الأوكسجين الفعالة , إذ تعمل الجذور الحرة على تحطيم الروابط العرضية التي تربط البروتين بالحامض النووي مكونة مركب (DeoxyribosePhosphate) , ويمكن أن تتسبب أصناف الأوكسجين الفعالة في حدوث تحويرات في قواعد

البيورينوالبايريمدين ، ويؤدي إلى تحور القواعد النايتروجينية لجزيئة DNA إلى تكسر هذه الجزيئة ، ويعد جذر الهيدروكسيل OH من أكثر الجذور الحرة التي تعمل على تحطيم DNA ، من خلال تحور القواعد النايتروجينية مؤدية إلى تكوين مشتقات هذه القواعد مثل 8-Hydroxy adenine :

5-Hydroxy methyl Uracil، كما أنّ الأذى الناتج من الجذور الحرة بسبب زيادة الأوكسجين يؤدي إلى زيادة النواتج الايضية الفعالة للأوكسجين التي تعمل على تثبيط الأنزيمات في الخلايا وتحطيم الدهون وأغشيتها (32) وأهم ما تتصف به الجذور الحرة هو توليدها سلسلة من التفاعلات المتتالية مؤدية إلى تحطيم عضيات الخلية والغشاء الخلوي (33). يحصل الاجهاد التأكسدي بعد سن اليأس والذي يؤدي الى اكسدة الشحوم البروتينية نتيجة ارتفاع المؤكسدات أو انخفاض في مستويات الهرمونات الجنسية (الاستروجين والبروجسترون) واللذان يعدان من العوامل المهمة التي تعمل كمضادات أكسدة للحماية من الأكسدة الفوقية للدهون أذ وجدان المعالجة بالاستروجين له دور مهم في التأثير على مستويات الكولسترول والشحوم البروتينية الدوارة في الدم عند النساء في مرحلة سن اليأس بنسبة 35-50% (34) ان الارتفاع في مستوى الشحوم البروتينية واطنة الكثافة يعود سببه الى وجود اضطراب ايصي بسبب التراكيز المرتفعة من الاحماض الدهنية في الدم التي ترتبط بمقاومة الانسولين حيث يصبح هرمون الانسولين اقل فعالية في تخفيض مستوى الكلوكوز في الدم وتكون النتيجة ارتفاع مستوى الكلوكوز (35). عند تجاوز تركيز الكلوكوز في مصل الدم عن 126 ملغم/100 مل في الإنسان فان ذلك يعد مؤشراً لاحتمالية حدوث داء السكري (36). وتكون مستويات سكر الدم الصيامي Fasting Glucose Levels لمرضى داء السكري أكثر من 7.0 mmol/l أو (37) 126 mg/dl. بينما تكون القيمة الطبيعية لسكر الكلوكوز في مصل دم الإنسان 5.6 – 3.6 mmol/l أي ما يقارب 70 mg/dl (38) – 100 mg/dl.

كما ان التغيرات في مستوى هرمونالاستروجين له تأثير على التمثيل الغذائي للكلوكوز في العديد من الحالات الفسلجية والمرضية مثل متلازمة تكيس المبايض (39)

جدول (2-4) تأثير ازالة المبايض في معدل مستوى البروتين والكلوكوز في CSF ومصل الدم m mol/L

Glucose Csf	Glucose Plasma	Protien Csf	Protien plasma	متوسط المعايير المجاميع
4.18±0.03 A	6.18±0.04 A	2.19±0.02 A	4.54±0.15 A	G1
6.42±0.08 B	8.50±0.20 B	1.13±0.025 B	2.10±0.03 B	G2
0.20	0.50	0.06	0.37	L.S.D

المعدل ± الخطأ القياسي، n = 8 مجموعة .
الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عموديا عند مستوى احتمالية (p<0.05)
G1 = مجموعة السيطرة
G2 = مجموعة حيوانات المزالة المبايض

يشير الجدول (2-4) الى وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في معدل تركيز بروتين في مصل الدم وارتفاع معنوي (P<0.05) في معدل تركيز الكلوكوز في CSF في مجموعة الأرانب المعرضة لإزالة مبايض G2 مقارنة مع مجموعة السيطرة G1.

ان هرمون الاستروجين له دور رئيس في الحفاظ على التوازن الفسلجي في الدماغ (40) ، و ان الانخفاض في مستوى تركيز البروتين في CSF قد يعود سببه الى انخفاض مستوى الاستروجين الذي يعد احد اشكال الكرب التأكسدي وهي نتائج متفقة مع (41) حيث وجد علاقة ما بين زيادة تجمع بروتينات β وانخفاض تركيزها في السائل الشوكي ، و كما وجدت علاقة ما بين تجمع بروتينات ال- Tau وزيادة مستوى السائل الدماغي الشوكي.

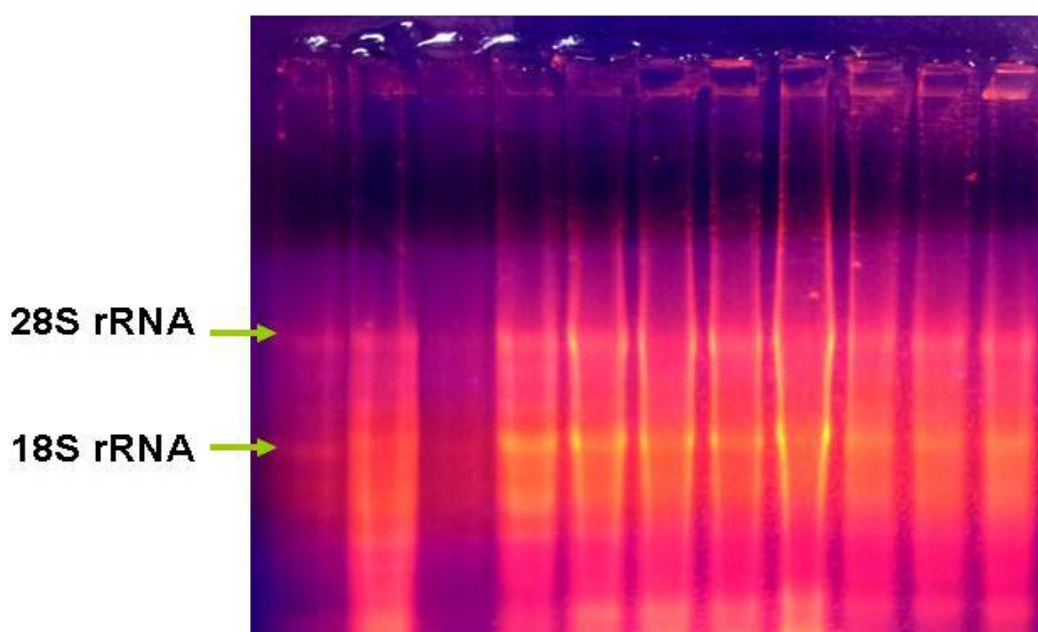
التغيرات الجزيئية لجين GADD153 في نسيج العصبي للدماغ

نتائج الفحص الجزيئي Molecular Techniques results

تم الكشف عن الحمض النووي RNA المستخلص من العينات وذلك من خلال استخدام جهاز خاص وهوال Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) وذلك من خلال تحديد تركيز الحمض النووي (ng\ul RNA) والثاني قياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة 260-280 nm وظهرت النتائج الاتية: -

جدول(3-4) نتائج عملية استخلاص الحمض Total RNA

Isolate	Total RNA concentration (ng\ul)	Purity 260-280nm
1	2090.6	1.32
2	1804.5	0.82
3	1218.8	1.98
4	1970.0	1.98
5	1348.0	2.01
6	2115.4	1.37
7	2052.3	1.02
8	1491.3	2.01
9	610.3	1.79
10	704.5	1.68
11	590.0	1.53
12	584.8	1.89



صورة(1-4) يمثل صورة نتائج عملية استخلاص الحمض النووي الريبوسومي الكلي Total RNA باستخدام عدة الترايزول. أذ تمثل حزم تجربة التعبير الجيني وهي حاوية على نوعين من الحامض النووي الريبوسومي 28S rRNA, 18S rRNA .

نتائج التعبير الجيني Gene expression results

تتضمن نتائج التعبير الجيني لجين الـ *GADD153* المستخلص من منطقة الذاكرة في الفص الصدغي لمجموعة الحيوانات المزلة المبايض G2 ومجموعة السيطرة G1 وذلك باستخدام فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي qRT-PCR . لحساب التعبير الجيني Gene expression لجين *GADD153* المأخوذ من مجموعة الحيوانات المزلة المبايض G2 ومجموعة السيطرة G1، في منطقة الذاكرة تم إجراء العد النسبي Relative quantification باستخدام طريقة (Livak Method) $2^{-\Delta\Delta CT}$. أذ تعتمد على عملية التصحيح (Normalization) باستخدام الجين المحافظ (Housekeeping gene (*GAPDH* gene) .

وقد تم تحليل قيم ال qPCR CT value لكل جين من جينات الهدف مع استخدام قيم CT value لجين المحافظ في كل معاملات التجربة ومجموعة السيطرة لتمام عملية تصحيح normalization في التعبير الجيني.

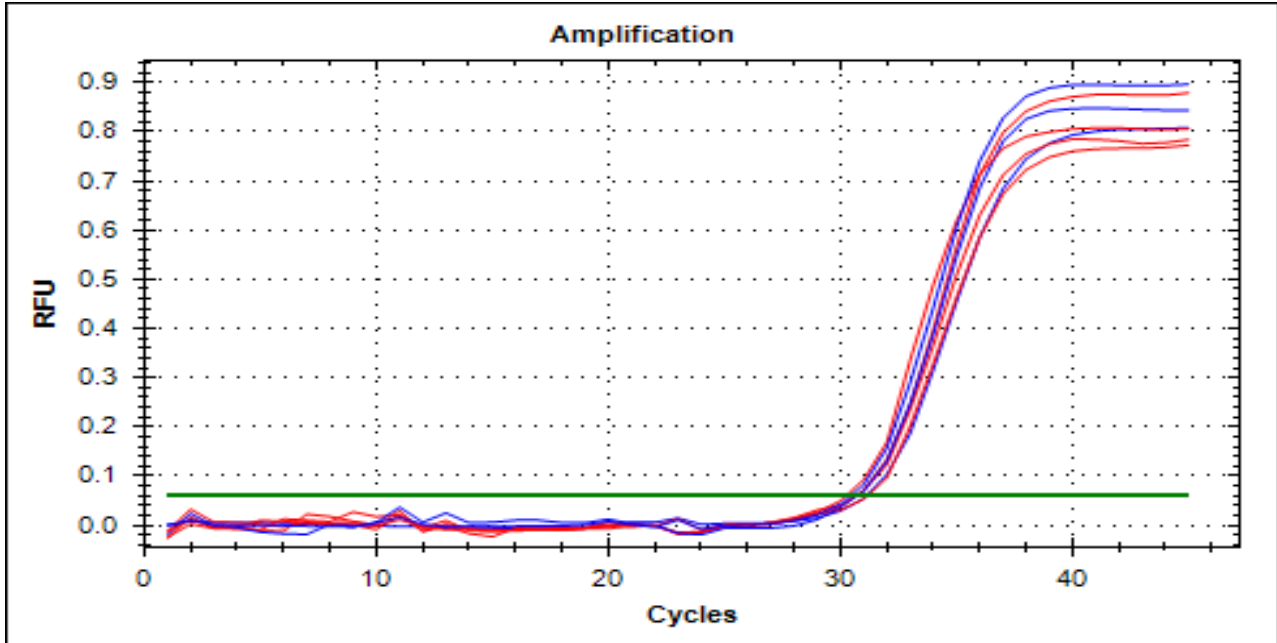
وقد أظهرت نتائج التعبير الجيني لكل الجينات المستخدمة في هذا الدراسة وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في جين *GADD153* لمجموعة الحيوانات المزالة المبايض G2 ومجموعة السيطرة G1. إذ ظهرت نتائج التعبير الجيني لجين *GADD153* مجموعة الحيوانات المزالة المبايض G2 وجود ارتفاع واضح (تنظيم مرتفع UP regulation). إذ كانت مرتفعة بمقدار (16.40 ± 10.47)

, مقارنة مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبير جيني بحسب طريقة Livak بمقدار (1.0 ± 0.0080) الجدول (4-4).

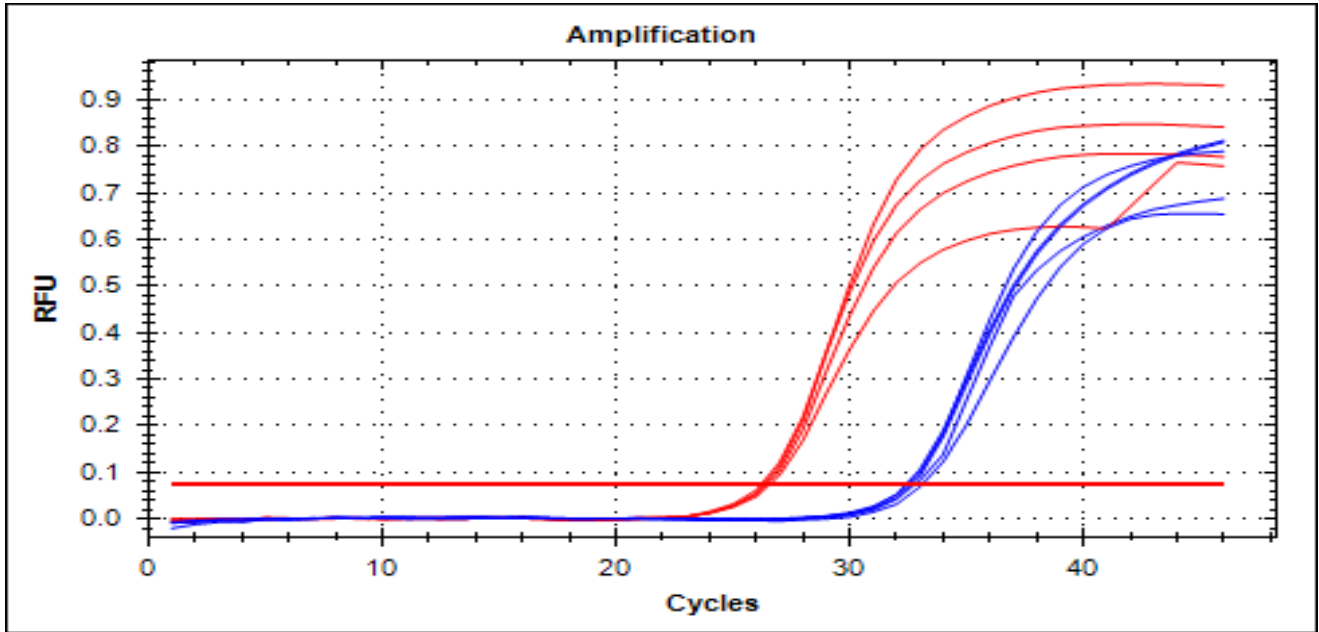
و أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لجين *Gadd153* وجود ارتفاع معنوي واضح بين مجموعة الحيوانات المزالة المبايض G2 ومجموعة السيطرة على مستوى احتمال $P \leq 0.01$ الشكل (3-4).

إن ما يمكن قوله في تفسير النتائج المستحصلة من دراستنا ان الكرب التأكسدي وارتفاع مستوى الشحوم البروتينية وارتفاع مستوى الكلوكوز في مصل الدم والسائل الدماغي الشوكي الناتج من نقص هرمون الاستروجين ادت الى زيادة التعبير الجيني لجين *GADD153* والذي ظهر عبر حصول بعض التأثيرات السلبية, والذي يعد مؤشراً على القتل المبرمج للخلايا العصبية, وهذه النتائج تتوافق مع نتائج بحوث مجموعة من الباحثين التي تؤكد فيها ان زيادة التعبير الجيني لجين *GADD153* يعادد اسباب بداية الإصابة بمرض الزهايمر (6)(17)

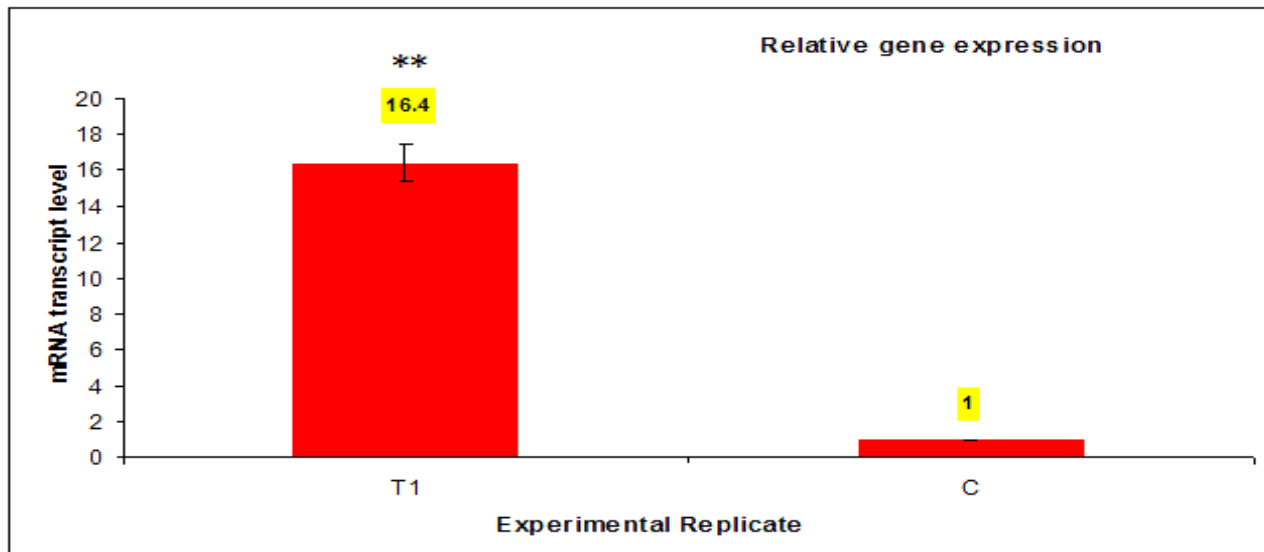
كما اكد الباحثون ان حدوث طفرة في كروموسوم رقم 21 في جين ال β -Amyloid الواقِع على هذا الكروموسوم يكون مسؤول عن انتاج ال β -Amyloid Precursor Protein وهي من حالات الإصابة بمرض الزهايمر (42)



شكل (1-4) يمثل منحنى التضخم Amplification plot للعينات الجين المحافظ *GAPDH* gene في فحص qRT-PCR إذ تمثل منحنيات اللون الأحمر عينات مكررات المعاملة واللون الأزرق عينات مكررات السيطرة



شكل (2-4) يمثل منحنى التضخم Amplification plot للعينات الجين المحافظ *Gadd15* gene في فحص qRT-PCR أذ تمثل منحنيات اللون الأحمر عينات مكررات المعاملة واللون الأزرق عينات مكررات السيطرة



** مستوى احتمال $P \leq 0.01$

الشكل (3-4) الشكل البياني التعبير الجيني النسبي Relative gene expression لجين (*Gadd153*) لمجموعة الحيوانات المزلة المبايض G2نسبة إلى مجموعة السيطرة.

جدول رقم (4-4) تحليل نتائج التعبير الجيني باستخدام طريقة ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak method) لجين (*Gadd153*)

المكررات التجريبية	CT <i>gadd153</i>	CT <i>GAPDH</i>	Δ CT (Test)	Δ CT control	$\Delta\Delta$ CT	التغير بالمضاعفات ($\Delta\Delta^{-2}$)CT	الخطأ القياسي+المعدل التغير بالمضاعفات
T1	28.17	29.12	-0.95	3.33	-4.28	19.42711815	16.40± 10.47
T2	28.8	29.41	-0.61	3.33	-3.94	15.34822591	
T3	28.41	29.09	-0.68	3.33	-4.01	16.1112888	
T4	28.57	29.12	-0.55	3.33	-3.88	14.72300241	
C1	32.42	29.14	3.28	3.33	-0.05	1.035264924	1.00± 0.0080
C2	32.47	29.19	3.28	3.33	-0.05	1.035264924	
C3	32.45	29.11	3.34	3.33	0.01	0.993092495	
C4	32.54	29.12	3.42	3.33	0.09	0.939522749	

T مجموعة الحيوانات المعاملة بازالة المبايض:

C: مجموعة السيطرة

($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak method) both the test samples and the control isolates group.

Δ CT(test) = CT(target, test) – CT(ref, test)

Δ CT(control) = CT(target, control) – CT(ref, control)

Second, the Δ CT of the test samples were normalized to the Δ CT of the control:

$\Delta\Delta$ CT = Δ CT(test) – Δ CT(calibrator)

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = ($2^{-\Delta\Delta CT}$) :
Normalized expression ratio

المصادر:

- 1-Bray , JJ.;Cragg, PA. ;Macknight,AC.;& Mills, RG. (1999).Lecture notes On human physiology . 4th ed .London :Blakwell Scientific Publication :276.
- 2-Berne, M.R. and Levy, M.N. (1993).Physiology. 3rd ed., Mosby Year Book, Inc., St. Louis, Missouri,P-1014.
- 3-Clark, C. M. and Trojanowski. J.Q. (2000) :Neuro degeneration dementia.TheMcGraw-Hill Company . USA :117-123.
- 4-Olivieri, G.;Novakovic,M. And Savaskan, E.(2002):The effects of beta-estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cell during heavy metal induced oxidase stress neurotoxicity and beta-amyloid secretion.*Neuro-Science*.113:844-55.
- 5-Ross, Michael L., 2004. 'Does Taxation Lead toRepresentationBritish Journal of PoliticalScience 34, forthcoming.
- 6- Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, et al. (2009) ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 325: 877–880
- 7-Tamagno E, Guglielmotto M, Bardini P, Santoro G, Davit A, et al. (2003).
- 8- Prasanthi J R P, Larson T, Schommer J, Ghribi O,(2011) Silencing GADD153/CHOP Gene Expression Protectsagainst Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by27-Hydroxycholesterol in Rabbit Hippocampus *Free RadicBiol Med* 49:
- 9- Bojrab ,M.J. (1998) .Current Techniquws in Small Animal Surgery (4th ed.) Lippincott Williams and Wilkins.Pp .790.
- 10- Allani , I. (1974). Measurment of cholesterol .*Clin.Chem.* ;20 :470-475.
- 11-Fassati ,P.&Principe ,L.(1983). Measurment of triglyceride. *Clin. Chem.* ;28 :2077.
- 12-Burstein ,M. J. (1970). Measurement of HDL .*Lipid Res.*, 11:583.
- 13- Chotkowska ,E. ;Kurjata ,P.&Kupsc ,W. (2001). Evaluation of the precision of the friedewalds formula for the calculation of LDL-C Concentraction in serum .*Pol. Merkariusz –Lek* 11 (64) 348-51
- 14- Fried ewald ,W.;Levy ,R. &Fredirckson ,D. (1972) .*Clin .Chem.* 18:199.
- 15-Young VR (2001).Protein and amino acids. In: Present Knowledge in Nutrition. 8thEdition. Bowman BA and Russel RM (eds). International Life Sciences Institute, Washington DC. Chapter 5, pp. 43-58.
- 16 -الراوي،خاشع محمود2000.مدخل الى الاحصاء.الطبعة الثالثة،كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.
- 17-Prasanthi J R P, Larson T, Schommer J, Ghribi O,(2011) Silencing GADD153/CHOP Gene Expression Protectsagainst Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by27-Hydroxycholesterol in Rabbit Hippocampus *Free RadicBiol Med* 49:
- 18-Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001), Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method., *METHODS* 25, 402–408.
- 19-Edward,J.; Wagner ,O. ; Ronnekleiv , M. & Martin , J. (2001).EstrogenBiphasicallyModifiedhypothalamicGABAergicFunctionConcomitantly with Negativeandpositive control of Luteinizing hormone Release . *J. Neuro.* 21(6) :2085-2093
- 20-Huang ,Y.; Schwendner ,S.;Rall, S.;Sanan ,D.&Mahley ,R. (1997). Apolipoprotein E2 Transgenic Rabbits Modulation Of the type III hyperlipoproteinemic phenotype by estrogen And occurrence of spontaneous atherosclerosis .*J.Biological Chemistry .;*272 (36):22685-22694
- 21-Knopp ,R. & Zhu ,X. (1997). Multiple beneficial effect of estrogen on lipoprotein metabolism .*J. Clin .Endocrinol . Metab.*;82 : 3952-3954.
- 22-Ferreri,L.&Naito,H.(1987).Effect of estrogens on rat serum cholesterol concentration :consideration of dose,type of Estrogen ,and treatment duration . *Endocrinol.*;102:1621-1672
- 23-الكناني،انتصار رحيم، الخفاف، أسرار إسماعيل (2006) . قابلية بيروكسيد الهيدروجين على إحداث الإجهاد التأكسدي ونشوء أفات التصلب العصيدي مع دراسة تأثير بعض مضادات الأكسدة المتمثلة بالاستراديول وفيتامين هـ والثوم الطازج في انساث الجرذان المستأصلة المبايض، المجلة العراقية البيطرية، المجلد 21 ، 1 (93-110) .

- 24-Kaul ,N. ;Devaraj ,S. &Jialal , I. (2006) . α -Tocopherol and atherosclerosis .*Exper . Biol.Med.* ;226:5-12
- 25-Eskin ,B.; Snyder ,D .; Roberts ,J.&Aloyo ,V. (2003). CardiacNorepinphrine Release ;Modulation by Ovarectomy and Estrogen.*Exp .Biol. Med.* ; 228 :194-199.
- 26-Saranyaratana ,W.;Sakondhavat ,C.; Silaruks ,S.;Soontrapa ,S.&Kaewrudee , S. (2006). Effect of Hormone therapy on lipid Profile in Menopausal Women .*J. Med .Assoc. Thai .;* (4):37- 41.
- 27-Purnell, C., (2008).Cardiovascular Risk Factors and Incident Alzheimer Disease: A Systematic Review of the Literature. *Alzheimer Dis AssocDisord.*
- 28-Tan, Z.S.,(2003) Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch Intern Med*, 163(9): p. 1053-1057.
- 29-Yanagisawa K.(2002).Cholesterol and Pathological Processes inAlzheimer’s Disease. *Journal of Neuroscience Research* , 70:361–366 (2002
- 30-Ganong, W.F. (2003). Review of medical physiology. McGraw-Hill Companies, New York,p-310-311.
- 31-Stahi, W. and Sies, H. (1997). Antioxidant defense: Vit E and C and carotenoids. *Diabetes*, 46: S14-S18.
- 32-Fonseca, V. A.; Stone, A.; Munshi, M. and Baliga, B. S. (1997). Oxidative stress in diabetic macrovascular disease: Dose homocystine play a role. *Free radic.Biol. Med.* 20: 1-27.
- 33-Bulkley, G. B. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery.* 94 (3): 407-411.
- 34-Grodstein , F.; Stampfer , M.J.; Colditz , G.A.; and et al. (1997). Postmenopousal hormone therapy and mortality . *N. Engl. J. Med.* 336 : 1769 – 1775*Gynecol. ;*17 (2):161-66
- 35-McGarry, J. (2002).Anting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes ."Diabetes36Anne, L. P. (1993). Director of clinical diabetes program, Diabetes help –Auxilioduabetico, *N. Eng. J. Med.*, 329 (14) : 977 – 986.
- 37-Kanaya, A.M.; Herrington, D.; Vittinghoff, E.; Lin, F.; Grady, D.; Bittner, V.; Cauley, J.A. and Barrett Connor, E. (2003).Glycemia effects of postmenopausal hormone; the heart and estrogen/progestin replacement study.A randomized, doubleblind, placebo-controlled trail.*Annals of Internal Medicine.*138: 1.
- 38-Ganong, W.F. (2001). Review of medical physiology. 22thed., LANGE medical books/McGraw –Hill medical publishing division, New York
- 39-Barros 2006 Meias e Malhas LTDA(32) 3231-1955Rua Professor Jose , 320 - Santos DumontJuiz de Fora - Minas Gerais . ABarata
- 40-Azcoitia, M. Santos-Galindo, M. A. Arevalo, and L. M.(2010)Garcia-Segura, “Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotectiveactions of estradiol,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 12, pp.,
- 41 - شريف، رفاه سامي أيوب، (2003). تأثير خل التفاح وعقار السمفاساتين على شحوم الدم في اناث الارانب البالغة ، اطروحة دكتوراه كلية الطب البيطري في جامعة الموصل.
- 42-Chartier-Harlin,M.C.; Crawford F.; Houlden, H.;Warren, A. ; Hughos, D.; Fidani, L.; Goate, A. ; Rossor, M. ; Rogues P.; Hardy, P.andMullan, M. (1991): Early onset Al-Zheimer disease caused by mutation at codon 717 of a beta- amyloid precursor protein gene .*nature* , 353:844-846.