

الأثر السمي للديوكسين رباعي الكلور على خلايا المبيض والغدة الكظرية عند إناث فئران BALB/c من خلال دراسة تغير التعبير عن المورثة CYP11A1

نور الضللي¹ شادي سكرية² عبد السميع هنانو³

¹ طالبة دراسات عليا (دكتوراه)، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية،

² الأستاذ المشرف، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية،

³ الأستاذ المشرف المشارك، مدير بحوث، هيئة الطاقة الذرية السورية، سورية.

الملخص

الديوكسينات هي مجموعة من الملوثات العضوية واسعة الانتشار بيئياً، ذات أثر ضار على العديد من الكائنات الحية، وبعدُ مركب رباعي كلورو ثنائي بنزو بارا ديوكسين -2,3,7,8- (TCDD) tetrachlorodibenzo-p-dioxin، المركب الأكثر أهمية من مجموعة الديوكسينات كونه شديد السُميّة، وذو معامل مكافئ سُمي يعادل 1.0. لذا يمكن أن يؤثر على خصوبة إناث الثدييات من خلال احداثه لتغيرات على مستوى التوازن الهرموني الدقيق المطلوب لحدوث الإباضة، والتي تؤثر على الصحة الإنجابية عند النساء، وهنا تبرز أهمية معرفة مدى قدرة هذا المركب على تغيير التعبير المورثي للعديد من المورثات المسؤولة عن نقل واستقلاب الكولسترول الضروري لتكوين الهرمونات الجنسية. حيث يؤدي أنزيم CYP11A1 (P450scc) الدور الرئيس في تحويل الكولسترول إلى هرمون البريغنينولون pregnenolone، والموجود في الخلايا الغمدية للمبيض وقشرة الغدة الكظرية. هدفت الدراسة إلى تحري الأثر السمي لمركب TCDD على خلايا المبيض والغدة الكظرية، باستكشاف التأثيرات المعتمدة على كمية جرعة TCDD، من خلال التغير النسبي في التعبير المورثي عن المورثة CYP11A1 المرزمة لأنزيم P450scc ضمن الأعضاء المذكورة وذلك باستعمال تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز الكمي

في الزمن الحقيقي RT-qPCR.

حيث قمنا في هذه الدراسة بتجريب إناث فئران بالغة من السلالة BALB/c بجرعة واحدة فموياً وهي بعمر 10 أسابيع بتركيزين مختلفين، 25 و 50 ميكروغرام/كيلوغرام من مركب TCDD، مقارنةً بمجموعة الشاهد. بيّنت النتائج وجود فروقات في التعبير المورثي للعينات المدروسة وذلك تبعاً لاختلاف نوع العضو وكمية الجرعة المعطاة، ففي المبيض وجدنا انخفاضاً في التعبير عن المورثة CYP11A1، في جميع المجموعات المُعاملة مقارنةً بمجموعة الشاهد، حيث لوحظ انخفاضاً في التعبير المورثي في الجرعة المنخفضة 25 ميكروغرام/كيلوغرام بشكل أكبر عن الجرعة المرتفعة 50 ميكروغرام/كيلوغرام. وعلى خلاف ذلك أظهرت نتائجنا بالنسبة للغدة الكظرية، ارتفاعاً في التعبير عن المورثة CYP11A1، في جميع المجموعات المُعاملة

تاريخ الإيداع: 2022/05/18

تاريخ الموافقة: 2022/09/04



حقوق النشر: جامعة دمشق - سورية،

يحفظ المؤلفون بحقوق النشر

بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

مقارنةً بمجموعة الشاهد، حيث وجدنا زيادة في التعبير المورثي في الجرعة المرتفعة 50 ميكروغرام/كيلوغرام بشكل أكبر عنه في الجرعة المنخفضة 25 ميكروغرام/كيلوغرام. توصلت نتائج دراستنا إلى أن لمركب TCDD قدرة على تغيير التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في المبيض والغدة الكظرية وبشكل معتمد على الجرعة، وبالتالي إمكانية تغيير مستويات الأنزيمات الصانعة للستيروئيدات، وما لذلك من أثر على اصطناع الهرمونات الستيروئيدية، الأمر الذي يمكن أن يؤدي في النهاية إلى اضطرابات في الخصوبة عند إناث الفئران.

الكلمات المفتاحية: المبيض، الغدة كظرية، TCDD، CYP11A1.

Toxic effect of tetra-chlorinated dioxin on ovarian and adrenal cells of BALB/c female mice by studying the expression of CYP11A1 gene

N. Aldelli¹ Ch. Soukkarieh² A. Hanano³

¹ PHD. sc. Student, , Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

² Supervisor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

³ Share Supervisor, Research Director, Syrian Atomic Energy Commission, Syria.

Abstract

Dioxins are a group of environmentally widespread organic pollutants that have a detrimental effect on many organisms. The most important of the group is 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

Which is the highest toxic of dioxins with a Toxic Equivalent Factor (TEF) of 1.0, Therefore, TCDD could be able to affect the fertility of female mammals by causing changes to the delicate hormonal balance required for ovulation, which affects the reproductive health of women.

Thus, it is of importance to detect the ability of TCDD to change the expression of many genes responsible for transporting and metabolizing cholesterol necessary for the synthesis of sex hormones. P450scc (CYP11A1) enzyme plays a major role in converting cholesterol into the pregnenolone hormone in ovarian Theca cells and adrenal cortex.

This study aimed to investigate the toxic effect of TCDD on ovarian and adrenal cells, by exploring the dose-dependent effects of TCDD, through the relative change in the expression of CYP11A1 gene encoding P450scc enzyme within the mentioned organs, using quantitative polymerase chain reaction technology in Real time RT-qPCR.

The results showed that there were differences in the gene expression of the studied samples, according to the difference in the type of organ and the amount of the given dose We found a decrease in CYP11A1 expression in ovary of all treated groups in comparison with control group.

Where the decrease was higher for the dose 25 µg/kg in comparison with 50 µg/kg. In contrast, for the adrenal gland, our results showed an increase in CYP11A1 expression in all the treated groups in comparison with control group, where the decrease was higher for the dose 50 µg/kg in comparison with 25 µg/kg.

The results of our study concluded that TCDD has the ability to alter the gene expression of CYP11A1 gene in the ovaries and adrenal glands in a dose-dependent manner, and thus the possibility of changing the level of steroidal enzymes, and its impact on the synthesis of steroid hormones, which could eventually lead to disturbances in fertility in female mice.

Key words: Ovary, Adrenal gland, TCDD, CYP11A1.

Received :2022/05/18

Accepted:2022/09/04



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

المقدمة:

يُعد مركب رباعي كلورو ثنائي بنزو بارا ديوكسين TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p -dioxin) من المواد الكيميائية التابعة لعائلة الديوكسينات الأعلى سمية. وهو ملوث مستمر Persistent pollutant يمكن أن يوجد في المجاري المائية وفي الهواء بسبب النفايات الصناعية، وأن ينتقل عبر السلسلة الغذائية وصولاً للإنسان، إذ يُعتبر ناتج ثانوي عن احتراق الوقود الأحفوري والعمليات الصناعية المتعددة كصناعة مركبات الكلورين والمبيدات الحشرية والصناعات المعدنية والبلاستيكية (Karman, Basavarajappa et al. 2012). ونتيجة سنوات من الإنتاج على نطاق واسع فإن التخلص غير السليم وغير المنتظم من الكميات الكبيرة لهذه المادة الكيميائية شديدة السمية أدى إلى تلوث بيئي عالمي (Baldrige, Marks et al. 2015). يمتلك مركب TCDD نصف عمر طويل في الجسم الحي ويمكن أن يبقى لأكثر من 10 سنوات بعد التعرض الفردي له، وذلك بسبب طبيعته المحبة للدهون كون التمثيل الغذائي له بطيء، وقد تم اكتشافه في الأنسجة الدهنية البشرية وفي المصل والحليب والسائل الجريبي للمبيض (Hites and technology 2011, Karman, Basavarajappa et al. 2012)، كما يُعد هذا المركب أحد المواد السامة المسرطنة للعديد من الأنسجة والأعضاء كالمبيض والغدة الكظرية (Hoyer and Hoyer 2004). وقد اكتشف العلماء مؤخراً قدرة TCDD على أحداث اضطرابات في مسارات الإشارات للغدد الصماء والتي من المحتمل أن تسبب عيوباً خطيرة في النمو والتكاثر (Baldrige, Marks et al. 2015). ركزت الدراسات السابقة على الأثر الذي يُحدثه TCDD على النشاط الأنزيمي في مسار الاصطناع الحيوي للأستروجين من خلال تأثيره المباشر على الجريبات الغارية (الجريبات المبيضية الحويصلية) antral follicles ومنع اصطناع الهرمونات الستيروئيدية، إذ يُعد الجريب الغاري الوحدة الوظيفية الرئيسية للمبيض والمصدر الأساسي لهرمونات الستيروئيدية الجنسية عند الإناث. وتعد الأنزيمات المسؤولة عن اصطناع الستيروئيدات أو ما يعرف بالأنزيمات الصانعة للستيروئيدات Steroidogenesis enzymes رئيسة من أجل القيام بالوظائف الفيزيولوجية الأساسية مثل توازن ضغط الدم والتمثيل الغذائي للكربوهيدرات والتكاثر (Karman, Basavarajappa et al. 2012). ويخضع تركيب هذه الهرمونات واستقلابها لتنظيم دقيق نظراً لأهميتها وأدوارها الهامة.

تعمل مجموعة من الأنزيمات المصنعة للستيروئيدات التي تنتمي إلى عائلة السيتوكروم P450CYP على تحفيز عملية التمثيل الغذائي للكولسترول لتشكيل هرمونات الستيروئيد (Lan, Lin et al. 2015)، إذ أن الخطوة الأولى والمحددة لمعدل تحفيز تكوين الستيروئيد تتم من خلال أنزيم P450sc (cholesterol side chain cleavage enzyme) الذي تُرمزه المورثة CYP11A1 (Cytochrome P450 11 A1). يُعبر عن هذه المورثة بمستوى عالي في الأنسجة المنتجة للستيروئيد مثل الغدد التناسلية والغدة الكظرية والمشيمة، ومن المعروف أن التعبير عن CYP11A1 يخضع لسيطرة العامل الستيروئيدي المنشأ (SF-1) المسمى أيضاً NR5A1. كما توجد أيضاً عناصر تنظيمية في محضض CYP11A1 مثل AP-1 (Guo, Shih et al. 2007)، وهي تسلسلات رابطة لمجموعة عوامل الانتساخ من نمط Jun/Fos. تتحكم مجموعة من عوامل الانتساخ الموجودة في المبيض والغدة الكظرية بالتعبير المورثي عن الإنزيمات التي تتوسط الخطوات الأولى من عملية تكوين الستيروئيد كالمورثة CYP11A1 بشكل كامل. حيث تستجيب هذه المورثات بشكل عام لنفس الهرمونات المحفزة لإنتاج الستيروئيد وذلك من خلال مسارات مشتركة بواسطة إشارات الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP، وكذلك العديد من المحفزات التي تدخل في عملية استقلاب الستيروئيد مثل بروتينات عائلة GATA و NR5A. ومع ذلك، يوجد عوامل محددة تختلف باختلاف النوع النسيجي واختلافات خاصة بالأنواع في التعبير عن المورثات (Simard, Ricketts et al. 2005, LaVoie, King et al. 2009). تعتبر الخطوة الأساسية في جميع عمليات إنتاج الستيروئيد هي نقل الكولسترول من الغشاء الخارجي للمتقدرات (الميتوكوندريا) إلى داخلها بتوسط المورثة CYP11A1 عن طريق البروتين (steroidogenic acute regulatory (STAR). وتُعد كل من قشرة الغدة الكظرية، والمبيض، والخصية، والمشيمة المواقع الرئيسية لتكوين الهرمونات الستيروئيدية (Bhangoo, Anhalt et al. 2006). يقوم الأنزيم المرمز من قبل هذه المورثة (Sun, Yang et al. 2012) بتحفيز تحويل الكولسترول إلى البريغنينولون، والذي يُعتبر بدوره المركب الأساسي

لجميع هرمونات الستيروئيد (Payne and Hales 2004)، لاسيما الاصطناع الحيوي للبروجسترون الضروري للحفاظ على الحمل، بسبب دوره في كبح انقباضات الرحم ومنع الإجهاض التلقائي. وبالتالي فإنه من المحتمل أن تسبب التغيرات في التعبير المورثي عن CYP11A1 أمراضاً مرتبطة بالهرمونات، كسرطان الثدي والبروستات وسرطان بطانة الرحم ومتلازمة تكيس المبايض PCOS (Ovary syndrome Polycystic) (Shan, Zhou et al. 2016). وفي حالات نادرة يُمكن أن تصل الاجنة التي تعاني من نقص تام أو جزئي في نشاط إنزيم CYP11A1 إلى المراحل المتأخرة من الحمل، ويعاني المواليد من تراكيز قليلة أو معدومة من الستيروئيدات. وتجدر الإشارة إلى أن جميع الأشخاص الذين لديهم نقص في إنزيم CYP11A1 يعانون من قصور الغدة الكظرية الجزئي أو الكلي الخلقي، ويمكن أن يصابوا باضطراب حاد في الغدة الصماء، كما تؤدي الطفرات في CYP11A1 إلى تضخم الغدة الكظرية الخلقي (Finkielstain, Vieites et al. 2021).

تنظيم التعبير المورثي عن CYP11A1 في المبيض:

تُصنّع الهرمونات الستيروئيدية بشكل رئيسي في المبيض ضمن الخلايا الحبيبية والخلايا الغمدية المحيطة ببويضة الجريب الناضج developing follicle. توجد الخلايا الغمدية في الطبقة الخارجية من الجريب حيث يحفز الهرمون المطلق لموجهة الغدد التناسلية (GnRH) و cAMP محض CYP11A1 ونشاطه في الخلايا الحبيبية والغمدية، إذ أن التعبير عن CYP11A1 في الخلايا الغمدية يحفز تطور الجريبات النامية في المبيض وترتفع نسبته أكثر مع التطور الجريبي. ويُعزز تحفيز GnRH بعوامل النمو مثل IGF-II و EGF (LaVoie, King et al. 2009)، حيث يعمل عامل النمو من النمط الأول IGF-I في الخلايا الحبيبية بطريقة معتمدة على النوع. ففي القوارض، لا يؤثر IGF-I في التعبير عن CYP11A1 في الخلايا الحبيبية (Eimerl and Orly 2002)، أما في الخنزير فيمكن لـ IGF-I أن يؤثر بالتنسيق مع GnRH أو لوحده في تعبير هذه المورثة (Wang, Wang et al. 2010). كما ينظم IGF-I نشاط محض CYP11A1 في الخلايا الغمدية للفئران، وتوجد منظمات أخرى تدخل في اصطناع الستيروئيد و CYP11A1 تتضمن الاستراديول والبروجسترون وهرمون النمو والأنسولين (Sekar, Garmey et al. 2000)، والأكتين A في الخلايا الحبيبية، و Amphiregulin في الركام البيضي (Shimada, Hernandez-Gonzalez et al. 2006)، والأنسولين في الخلايا الغمدية (LaVoie, King et al. 2009).

تأثير TCDD على التركيب الستيروئيدي للمبيض:

يتأثر المسار الستيروئيدي في الجريبات المبيضية الغارية عند التعرض لـ TCDD، ويمكن أن يُغيّر TCDD بشكل مباشر من الستيروئيدية الخلايا الحبيبية والغمدية في مبيض الفأر، ويكون هذا التغيير من خلال تأثيره في خطوة ادخال الكولسترول واستقلابه إلى هرمون البريغنينولون بواسطة بروتين ناقل ينظم انتقال الكولسترول ضمن المتقدرات الحيوية بكميات محددة يدعى بروتين StAR. إذ تعمل الأنزيمات المفتاحية CYP11A1 و StARD1 الموجودة في الخلايا الغمدية على تحويل الكولسترول إلى بروجسترون (Karman, Basavarajappa et al. 2012).

التحكم الهرموني في التعبير المورثي عن CYP11A1 في قشرة الغدة الكظرية:

تنتج القشرة الخارجية للغدة الكظرية adrenal cortex الهرمونات الستيروئيدية حيث تُعبّر عن مستويات عالية من انزيمات CYP11A1 ومن 3B-HSD ومن StAR (Miller 2008)، وتعتبر المنطقة الكبيبية Glomerulosa المنطقة الخارجية من قشرة الكظر وتقع مباشرة تحت المحفظة الليفية المحيطة بالغدة الكظرية وينتج في هذه المنطقة أحد القشرانيات المعدنية Mineralocorticoids فهي المكان الرئيس لإنتاج الالدوسترون والذي يؤدي دوراً مهماً في تنظيم ضغط الدم على المدى البعيد (LaVoie, King et al. 2009).

توجد العديد من العوامل المشتقة التي تعمل على توليد الستيروئيد والتي تزيد من انتساح CYP11A1 مثل الهرمون الموجه لقشر الكظر ACTH والأنجيوتنسين AII و Activin و BMP-6 (Suzuki, Otsuka et al. 2004)، والتي تعمل على تفعيل بروتين كيناز C (PKC). كما تُحفّز خلايا Angiotensin AII (H295) بواسطة 8-bromo-CAMP وتزيد من معدل انتساح المورثة

CYP11A1 في خلايا الغدة الكظرية، كما يعمل كل من الأنسولين و IGF-I على تحفيز انتساخ CYP11A1 بشكل ضئيل، لكن النسبة الأعلى من التحفيز يُحدثها كل من ACTH و CAMP (Raha, Nehar et al. 2007). كما أن التغيير في إنتاج الالدوسترون يزيد من انتساخ CYP11A1 في المنطقة الكيببية لقشر الكظر عند الفئران. وأخيراً، يمكن للعوامل التي تمنع من تكوين الستيروئيد الكظري أن تؤثر على التعبير المورثي لـ CYP11A1 (LaVoie, King et al. 2009).

تأثير TCDD على الغدة الكظرية:

يقال TCDD من النشاط الحيوي لهرمون الموجه لقشر الكظرية ACTH الذي تفرزه الغدة النخامية الأمامية، والذي يعتبر المنظم الأساسي للغدة الكظرية وإفرازاتها، وذلك من خلال انخفاض القدرة على تحفيز إفراز هرمون الكورتيكوستيرون من قشرة الغدة الكظرية، وذلك لأن ACTH هو المنظم الأساسي لاصطناع الستيروئيد في الغدة الكظرية، حيثُ يسبب TCDD تحويله من الشكل الفعّال إلى الشكل غير الفعّال (Pitt, Buckalew et al. 2000, Lister and Van Der Kraak 2001). كما يقلل TCDD من عدد مستقبلات GNRH في الغدة النخامية، وبالتالي يخفض حساسية منطقة تحت المهاد تجاه GNRH (Juricek and GNRH 2018). حيث يحفز GNRH نشاط اثنين من البروتينات هما بروتين كيناز A وبروتين كيناز C (PKA; PKC) في الغدة التناسلية، حيث يستهدف TCDD هذين المسارين ويعمل على تثبيط GNRH (Takeda, Yamamoto et al. 2011) وخفض إفرازه عن طريق تدخل حمض ليبونك lipoic acid، العامل المساعد للعديد من الأنزيمات في المتقدرات الحيوية. ويمكن أن يؤثر TCDD في عملية استقلاب الأحماض الأمينية في المنطقة تحت المهاد والغدة النخامية، وذلك عن طريق خفض كمية حمض الليبونك الذي يؤدي دور عامل مساعد في مركب نازعة هيدروجين البيروفات و α كيتوجلوتارات ديهيدروجينيز (pyruvate dehydrogenase and -ketoglutarate dehydrogenase complexes) مما يقلل من مستوى الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP وبالتالي يقلل من إفراز GNRH (Koga, Ishida et al. 2012) حيث يثبط TCDD الـ HPG (hypothalamic-pituitary-gonadal) وبالتالي يؤثر على التكاثر عند القوارض (Huang, Ceccatelli et al. 2003).

من كل ما سبق، يُعد الكشف عن الأثر السمي لمركب TCDD على وظائف أعضاء الكائنات الحية وخصوصاً آلية تأثيره في خصوصية الثدييات موضوع اهتمام الباحثين، وذلك نظراً لتناقض المعلومات المرجعية حول قدرة هذا المركب على تغيير مستويات التعبير المورثي للمورثات المسؤولة عن الأنزيمات المفتاحية كإنزيم CYP11A1 (P450Sc) في سبيل اصطناع هذه الهرمونات. مما دعا لإجراء دراسة معمّقة على أحد النماذج الحيوانية في محاولة لإزالة الغموض عن بعض النتائج على المستوى الجزيئي. لذا هدفت هذه الدراسة إلى كشف الأثر السمي لمركب TCDD في التعبير المورثي لمورثة CYP11A1 بشكل معتمد على الجرعة، وذلك نظراً لأهمية هذه المورثة في كل من الخلايا الغمدية وقشرة الغدة الكظرية والضرورية لتحويل الكولسترول إلى هرمون البريغنينولون، ومن ثم تحويله في النهاية إلى هرمون الاستراديول Estradiol.

مواد البحث وطرائقه:

المواد الكيميائية:

مركب TCDD من شركة (SUPLECO, USA, 10µg/ml in toluene)، محلول Trizol من شركة Sigma.

حيوانات التجربة:

شملت الدراسة (18) فأر مختبري من نوع Albino mouse سلالة BALB/c، وجميعها من الإناث بعمر 10 أسابيع، ومتوسط وزن يُعادل (22غرام). تمّ العمل على إكثار الفئران ومن ثم معاملتها بالمادة المدروسة في وحدة إنتاج الحيوانات المخبرية في هيئة الطاقة الذرية السورية، حيث وضعت الفئران في أقفاص بلاستيكية ذات أغطية معدنية مفروشة بنشارة خشب ناعمة. وزودت بالماء بواسطة زجاجات، كما زودت بالغذاء حسب قواعد العليقة القياسية في البيت الحيواني. والحفاظ عليها ضمن شروط رعاية نموذجية بنظام إضاءة 12 ساعة ضوء/ ظلام، ودرجة رطوبة نسبية (50-60%)، ودرجة حرارة (22) درجة مئوية.

طريقة العمل:

قسمت حيوانات الدراسة إلى 3 مجموعات، تضمنت كل مجموعة 6 فئران وجُرت فموياً لمرة واحدة كالتالي، المجموعة الأولى: حيوانات المجموعة التجريبية المُجرعة بجرعة من مركب TCDD قدرها 25 ميكروغرام/كيلوغرام، والمجموعة الثانية: حيوانات المجموعة التجريبية المُجرعة بجرعة قدرها 50 ميكروغرام/كيلوغرام، والمجموعة الثالثة: حيوانات المجموعة الشاهدة مُجرعة بزيت الذرة فقط. وبعد أسبوع واحد تم التضحية بالحيوانات وتشريحها، واستخرجت الأعضاء المطلوبة وحُفظت بالآزوت السائل لحين إجراء الدراسة عليها.

استخلص الرنا الكلي RNA total من المبيض والغدة الكظرية وتحويله إلى دنا متمم cDNA وإجراء تجارب (RT-PCR) بالزمن الحقيقي:

استُخلص الرنا الكلي RNA total من الأنسجة المدروسة باستخدام محلول Trizol، من ثم قيس تركيزه بواسطة جهاز قياس تراكيز الحموض النووية Nano Drop (Nano Drop technologies, Qiagen, Germany). وصُممت البادئات النوعية للمورثة الهدف CYP11A1 والمورثة المرجعية β -actin وذلك بالعودة إلى قاعدة البيانات NCBI، والتسلسلات موضحة في الجدول 1. ومن ثم حُضِر الدنا المتمم cDNA بدءاً من الرنا النقي بواسطة كاشف العمل، عتيدة خاص (M-MLV Reverse Transcriptase, SIGMA, USA). وُدِر التعبير المورثي للمورثة CYP11A1، باستعمال كاشف العمل، عتيدة خاص (SYBR Green-PCR Kit, QIAGEN, Germany). وحُضِر مزيج التفاعل بحجم نهائي قدره 20 ميكرو لتر، وبادئات نوعية بما يعادل 1-0,5 ميكرومولر، وكمية cDNA بحدود 200 نانوغرام/التفاعل. وأجري التفاعل بواسطة جهاز RT-qPCR (من نوع، Real-Time PCR System. Agilent technologies USA) لمدة 35 دورة، ودرجة حرارة تهجين 58 درجة مئوية، أتبع التفاعل بإنجاز منحني الانصهار لضمان تجانسية منتج PCR كما هو مبين في الشكل 1.

الجدول 1: التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في هذه الدراسة.

| Gene name | Forward sequence (5'-3') | Reverse sequence (5'-3') |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| β -actin | 5'-AAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3' | 5'-TGGTACGACCAGAGGCATAC-3' |
| CYP11A1 | 5'-CACTTCTGGAGGGAGAGTGGC-3' | 5'-AGTATCGACGCATCCTTGGGG-3' |



الشكل 1. برنامج تشغيل جهاز RT-qPCR

النتائج والمناقشة:

عُزل الرنا الكلي من عينات المبيض والغدة الكظرية لمجموعات الدراسة المجرعة والشاهدة، وحُوّل إلى الدنا المتمم، وُدِر التغيير النسبي في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 بالنسبة للمورثة المرجعية β -actin في المجموعات الثلاث، من خلال تفاعل RT-

qPCR. وتم تحليل منحنيات الانصهار بواسطة برمجية خاصة بالجهاز. كما يبين الشكل 2 نواتج التضخيم في هذا التفاعل، حيث وزعت حيوانات التجربة على 3 مجموعات، تضمنت كل مجموعة 6 فئران وتم اختبار التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 لجميع الفئران في المجموعات الثلاث، إذ أنجزت 3 مكررات لكل فأر وحسب المتوسط الحسابي لقيم Cycle threshold (Ct) للمكررات الثلاثة وللحيوانات الست، وحُسب التغير النسبي في التعبير الكمي (RQ) Relative Quantification (RQ) للعينات المعاملة بالتركيزين 25 و 50 ميكروغرام/كيلوغرام من TCDD والعينات الشاهدة كل على حدة وذلك من خلال العلاقة التالية: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. حيث تم تحليل العينات باستخدام البرنامج الإحصائي GraphPad prism7، وحساب القيمة الاحتمالية (p-value) واتباع النمط One-way ANOVA-Ordinary، حيث تبين لدينا القيم التالية لمعامل p-value:

- المبيض بتركيز 25 مكغ/كغ = 0.0533

- المبيض بتركيز 50 مكغ/كغ = 0.0042

- الغدة الكظرية بتركيز 25 مكغ/كغ = 0.0037

- الغدة الكظرية بتركيز 50 مكغ/كغ = 0.013

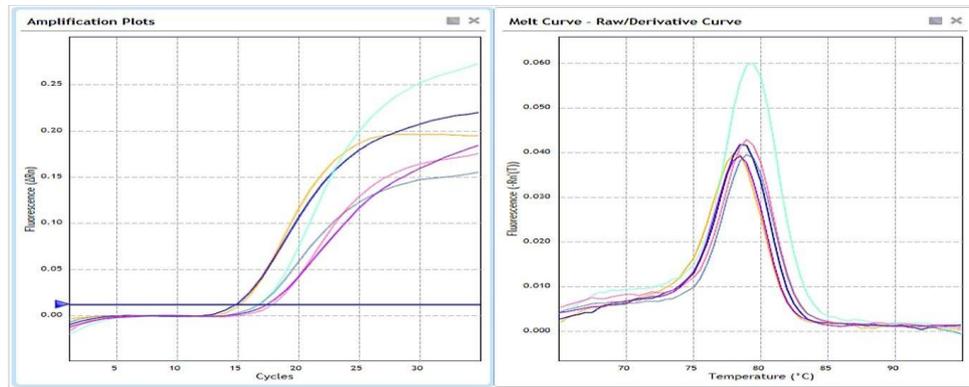
تبين قيم p-value أنها عند أو أقل من الرقم 0.05، وهذا يدل على أن احتمالية الصدفة قليلة، وبالتالي يكون الفرق معنوي (There is statistically significant difference/association).

تغير التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في خلايا المبيض:

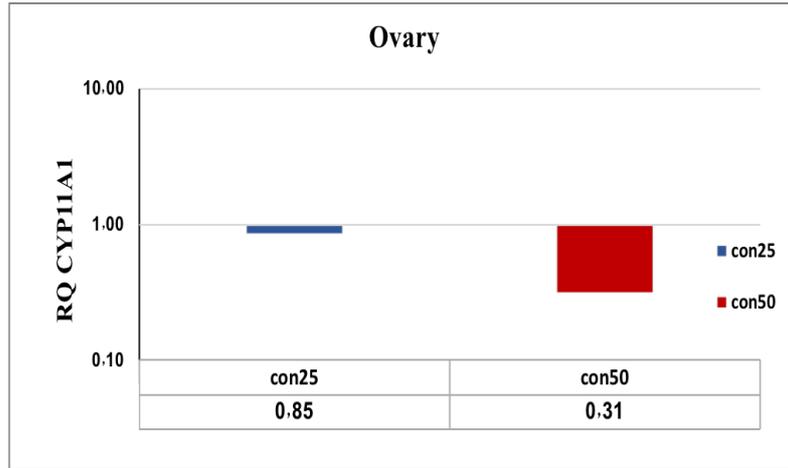
بيّنت النتائج انخفاضاً في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في عينات المبيض لدى كل المجموعات التجريبية بشكل معتمد على الجرعة من أجل التركيزين 25 و 50 ميكروغرام/كيلوغرام. لكن تبدو الفروقات واضحة في انخفاض التعبير المورثي في التركيز المنخفض بمقدار (0,85) بشكل أكبر عن التركيز المرتفع. وبالتالي فإن التركيز المنخفض من TCDD كانت أكثر قدرة على خفض التعبير المورثي للمورثة المدروسة من التركيز المرتفع، كما هو موضح في الشكل 3.

تغير التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في خلايا الغدة الكظرية:

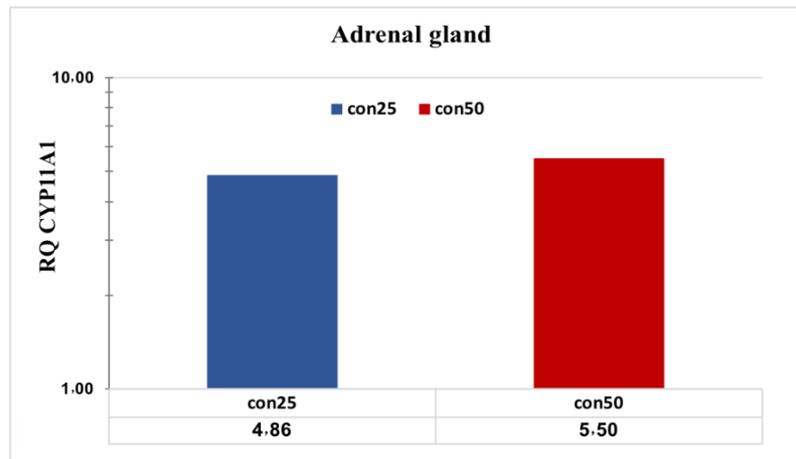
بيّنت النتائج ارتفاعاً في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في كل المجموعات المعاملة في الغدة الكظرية بشكل معتمد على الجرعة من أجل التركيزين 25 و 50 ميكروغرام/كيلوغرام. لكن تبدو الفروقات واضحة في ازدياد التعبير المورثي في التركيز المرتفع بمقدار (5.50) بشكل أكبر منه في التركيز المنخفض (4.86). وبالتالي فإن التراكيز المرتفعة من TCDD كانت أكثر قدرة على زيادة التعبير المورثي للمورثة المدروسة، كما هو موضح في الشكل 4.



الشكل 2. شكل تمثيلي لنواتج تفاعل RT-qPCR لعدد من العينات المدروسة لمجموعة التجربة ومجموعة الشاهد، يوضح الشكل ناتج التضخيم (إلى اليسار) ومنحنيات الانصهار (إلى اليمين).



الشكل 3. مخطط يوضح الفروقات النسبية RQ في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 للعينات المدروسة بحسب اختلاف التراكيز المعطاة، يمثل المحور Y لوغاريتم قيم RQ للمورثة الهدف لعينات المبيض في التركيزين 25 و 50 ميكروغرام/كيلوغرام، والذي يُظهر انخفاضاً في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في عينات المبيض لدى كل المجموعات التجريبية، تبدو الفروقات واضحة في انخفاض التعبير المورثي في التركيز المنخفض بمقدار (0,85) بشكل أكبر عن التركيز المرتفع.



الشكل 4. مخطط يوضح الفروقات النسبية RQ في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 للعينات المدروسة بحسب اختلاف التراكيز المعطاة، يمثل المحور Y لوغاريتم قيم RQ للمورثة الهدف لعينات الغدة الكظرية في التركيزين 25 و 50 ميكروغرام/كيلوغرام. والذي يُظهر ارتفاعاً في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في عينات الغدة الكظرية لدى كل المجموعات التجريبية، تبدو الفروقات واضحة في ارتفاع التعبير المورثي في التركيز المرتفع بمقدار (5,50) بشكل أكبر عن التركيز المنخفض.

الاستنتاج ومناقشة النتائج:

يتطلب اصطناع الهرمونات واستقلابها تنظيمًا دقيقاً نظراً لوظائفها الهامة، حيث تعمل الأنزيمات المصنعة للستيروئيدات، كما هي حال عائلة السيتوكروم P450CYP، على تحفيز عملية التمثيل الغذائي للكولسترول لتشكيل هرمونات الستيروئيد (Lan, Lin et al. 2015)، إذ أن الخطوة الأولى المحددة لمعدل تحفيز تكوين الستيروئيد تتم من خلال أنزيم P450scc المُرمز بواسطة المورثة CYP11A1. يكون التعبير عن هذه المورثة بمستوى عالي في الأنسجة المنتجة للستيروئيد كأنسجة المبيض (Guo, Shih et al. 2007)، حيث أنّ التعبير المورثي عن CYP11A1 في الخلايا الغمدية يحفز تطور الجريبات النامية في المبيض، كما يُحفز هرمون FSH التعبير عنها أيضاً في الخلايا الحبيبية للجريبات قبل الإباضة (Karman, Basavarajappa et al. 2012)، حيث تُرمز المورثة CYP11A1 الأنزيمات المفتاحية الهامة الموجودة في الخلايا الغمدية والضرورية لتحويل الكولسترول إلى هرمون البريغنينولون.

فقد أثبتت العديد من الدراسات انخفاض فعالية هذا الأنزيم في المبيض بفعل سمية مركب TCDD. ففي دراسة لـ Baldridge وآخرون، تبين فيها أن TCDD قادر على تعطيل افراز هرمون الاستراديول بواسطة خلايا حبيبية بشرية مزروعة خلال النقاط الزمنية 8-12-24 ساعة وارتباطها بتناقص في مستوى التعبير عن CYP11A1 في النقاط 4 و12 ساعة (Baldridge, Marks et al. 2015)، لكن لم يلاحظ هذا الانخفاض في النقاط الزمنية اللاحقة 36 و48 ساعة. وتوصلت تلك الدراسة إلى أن انخفاض الاستراديول المرتبط بانخفاض التعبير عن CYP11A1 كان معتمد على الزمن (Baldridge, Marks et al. 2015). وفي دراسة أخرى *in vitro* على الخلايا المبيضية المعزولة من فئران CD-1، والمُعاملة بجرعات منخفضة من TCDD لوحظ انخفاض التعبير المورثي عن CYP11A1 و CYP19A1 و CYP17A1 بعد 96 ساعة من الزراعة، أي أثر TCDD على الستيروئيد المبيضي ومنع تكوينه على مستويات متعددة داخل المسار الستيروئيدي (Karman, Basavarajappa et al. 2012). وبالفعل توافقت نتائج دراستنا مع هذه الدراسات إذ تبين وجود انخفاض في التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 في كل المجموعات المُعاملة بالـ TCDD في المبيض، مما يدعم فكرة الأثر السمي المختلف لمركب TCDD على التعبير المورثي في أنسجة المبيض ولكن بطريقة معتمدة على الجرعة، وبالتالي انخفاض في قدرة تحويل الكولسترول إلى البريغنينولون. من جهة أخرى، اختلفت نتائج دراستنا مع دراسة أثر مركبات سامة أخرى على CYP11A1، فعند مُعاملة الفئران بمادة MXC وهي مبيد حشري، ويعتبر من الملوثات العضوية وأحد عوامل اختلال الغدد الصماء، حيث أظهرت الدراسة ارتفاع في مستويات التعبير المورثي للمورثة CYP11A1 وذلك من خلال تأثيره في تغيير مستويات الستيروئيد الجنسي، الذي يؤدي إلى اضطراب مسار إنتاج أو اصطناع الستيروئيد، والذي يتبع ذلك زيادة في تحويل الكولسترول إلى بريغنينولون (Craig, Leslie et al. 2010). لدى القوارض، عند دخول MXC يتم امتصاصه وتدرجه بالتتابع بواسطة أنزيمات CYP450 الكبدية لتشكيل مستقلب أحادي الهيدروكسيل المعروف بـ mono-OH ومستقلب ثنائي الهيدروكسيل المعروف بـ Imai(HPTe)، وبالتالي فإن تأثير تلك المركبات السامة ناتج عن هذه المستقلبات. حيث أظهرت الدراسات أن تعطيل هذه المستقلبات تسبب اضطراباً في التكوين الستيروئيدي في المبيض ويخفض إنتاج كل من البروجسترون والأندروسينيديون والتستوسترون والاستراديول في الجربيات المبيضية الغارية عند الفأر (Craig, Leslie et al. 2010).

فيما يتعلق بالغدة الكظرية، فقد أوضحت الدراسات السابقة أن TCDD يؤثر على النشاط الحيوي لهرمون ACTH، والذي يعتبر المنظم الأساسي للغدة الكظرية وافرازاتها، وذلك من خلال خفض القدرة على تحفيز افراز هرمون الكورتيكوستيرون من قشرة الغدة الكظرية، حيث يحوله TCDD من الشكل الفعّال إلى الشكل غير الفعّال (Pitt, Buckalew et al. 2000, Lister and Van Der Kraak 2001). أثبتت الدراسات أن التعرض لـ TCDD عند الفئران يؤثر على تعبير الغدة النخامية عن الببتيدات الأخرى وافرازها (Huang, Ceccatelli et al. 2003)، حيث تزيد الجرعات الفموية المرتفعة من TCDD من مستوى mRNA المحفز للأبيوميلانوكورتين POMC (pro-opiomelanocortin) وهي طليعة العديد من الببتيدات الصغيرة ذات الوظائف المتنوعة. نتيجة لذلك يزيد TCDD كل من هرمون قشر الكظر ACTH و β -endorphin، حيث يعمل ACTH على تنشيط افراز الجلوكورتيكوئيدات glucocorticoids في الغدة الكظرية، بينما يعمل β -endorphin كمنشط حيث توجد عناصر XREs (xenobiotic responsive element) في محضض المورثة POMC الذي يستهدف AhR للمورثة الهدف (Juricek and Coumoul 2018). كما يمكن للعوامل التي تمنع من تكوين الستيروئيد الكظري أن تؤثر على التعبير المورثي لـ CYP11A1 في قشر الكظر، حيث أظهرت نتائجنا ازدياد التعبير المورثي للمورثة المدروسة في خلايا الكظر لمجموعة التركيز المرتفع أكثر منه في مجموعة التركيز المنخفض.

وهذا يتوافق مع دراسة أجريت في وسط *invitro* أظهرت أن التغيير في إنتاج هرمون الالدوسترون يزيد من معدل انتساخ CYP11A1 في المنطقة الكبيبية لقشر الكظر عند الجرذان لدى تناولها لجرعات مرتفعة من أملاح البوتاسيوم والصدويوم (Tremblay and LeHoux 1993, LaVoie and King 2009).

كما وُجد أن TCDD يقلل من عدد مستقبلات GNRH في الغدة النخامية، مما يؤدي إلى انخفاض حساسية منطقة ما تحت المهاد تجاه GNRH (Juricek and Coumoul 2018). فقد بينت إحدى الدراسات أن TCDD تثبط إنتاج GNRH ومنع افرازه في ذكور جرذان مجرعة فمويًا بتركيز 5 ميكروغرام/كيلوغرام (Takeda, Fujii et al. 2014). كما أظهرت دراسة على الجرذان أن التعرض لـ TCDD لمدة 24 ساعة وبتركيز 30-0,03 ميكروغرام/كيلوغرام سبب إفرازاً لموجهة الغدد التناسلية GNRH وذلك بواسطة GNRH المعتمد على الكالسيوم (Li, Johnson et al. 1997)، كما اتفقت نتائج دراستنا مع دراسة حول معاملة الخلايا الكظرية للفئران بجرعات منخفضة من مادة البيسفينول BPA، وهو من المواد الكيميائية السامة والمُخلّة لعمل الغدد الصم بسبب فعاليته الاستروجينية، أدى ذلك إلى زيادة في التعبير المورثي لـ CYP11A1، مع زيادة في إنتاج هرمون الكورتيكوستيرون (Lan, Lin et al. 2015).

نستنتج من ذلك أنّ الآليات الكامنة وراء قدرة تأثير هذه المواد السامة على أحداث تأثيرات متباينة على مستوى التعبير المورثي والهرمونات الستيرويدية تعود إلى اختلافات في الأساليب التجريبية، ونوع المادة الملوثة، والنموذج الحيواني المستخدم، ونوع النسيج الخلوي، واختلاف التراكيز المعطاة.

الخلاصة:

تقدم نتائج دراستنا بالإضافة لنتائج الدراسات السابقة دليلاً على أهمية التأثيرات المباشرة لسمية TCDD على المبيض والغدة الكظرية، والتي يمكن أن تؤدي في النهاية إلى اضطرابات في الخصوبة. حيث تُظهر نتائج دراستنا أن TCDD قادر على خفض التعبير المورثي لـ CYP11A1 في كل المجموعات التجريبية مقارنةً بالمجموعة الشاهدة في خلايا المبيض. وعلى العكس، وجدنا ارتفاعاً في التعبير عنها في كل المجموعات التجريبية مقارنةً بالمجموعة الشاهدة في خلايا الغدة الكظرية، وذلك بطريقة معتمدة على الجرعة في كلٍ من الأعضاء المذكورة. يُمكن أن يعود هذا التباين إلى اختلاف آليات استقلاب TCDD، وعليه يختلف أثر التركيز ذاته من TCDD باختلاف نوع العضو المدروس. وتشير النتائج إلى ضرورة تحري تأثيرات سمية TCDD على التعبير عن مورثات أخرى هامة في المسار الستيرويدي، والتي ستعزز فهمنا بشكل أكبر لآثار المحتملة للسموم البيئية خاصةً الديوكسينات على الصحة الإنجابية لدى الإناث.

معلومات التمويل :

هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

المراجع:

1. Baldrige, M., G. Marks, R. Rawlins and R. Hutz (2015). Very low-dose (femtomolar) 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) disrupts steroidogenic enzyme mRNAs and steroid secretion by human luteinizing granulosa cells. Reproductive Toxicology. 52: 57-61.
2. Bhangoo, A., H. Anhalt, S. Ten and P. King (2006). "Phenotypic variations in lipoid congenital adrenal hyperplasia." Pediatric endocrinology reviews: PER. 3(3): 258-271.
3. Craig, Z., Leslie, K. P. Hatfield, R. K. Gupta and J. A. Flaws (2010). "Mono-hydroxy methoxychlor alters levels of key sex steroids and steroidogenic enzymes in cultured mouse antral follicles." Toxicology and applied pharmacology. 249(2): 107-113.
4. Eimerl, S. and B. Orly (2002). "Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone: differential responses of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells." Biology of reproduction. 67(3): 900-910.
5. Finkielstain, G. P., A. Vieites, I. Bergadá and E. Rey (2021). "Disorders of Sex Development of Adrenal Origin." Frontiers in Endocrinology. 12.
6. Guo, C., M. Shih, H. Lan, N. Hsu, M. Hu and B. Chung (2007). "Transcriptional regulation of human CYP11A1 in gonads and adrenals." Journal of biomedical science 14(4): 509-515.
7. Hites, R. (2011). "Dioxins: an overview and history." Environmental science & technology. 45(1): 16-20.
9. Hoyer, P. B. (2004). Ovarian toxicology, CRC Press Boca Raton, FL.
10. Huang, P., S. Ceccatelli, P. Hoegberg, T. S. Shi, H. Håkansson, T. Rannug and a. pharmacology (2003). "TCDD-induced expression of Ah receptor responsive genes in the pituitary and brain of cellular retinol-binding protein (CRBP-I) knockout mice." Endocrine journal. 192(3): 262-274.
11. Juricek, L. and X. Coumoul (2018). "The aryl hydrocarbon receptor and the nervous system." International journal of molecular sciences. 19(9): 2504.
12. Karman, B. N., M. S. Basavarajappa, P. Hannon and J. A. Flaws (2012). "Dioxin exposure reduces the steroidogenic capacity of mouse antral follicles mainly at the level of HSD17B1 without altering atresia." Toxicology and applied pharmacology 264(1): 1-12.
13. Karman, B. N., M. S. Basavarajappa, P. Hannon, J. A. Flaws and a. pharmacology (2012). "Dioxin exposure reduces the steroidogenic capacity of mouse antral follicles mainly at the level of HSD17B1 without altering atresia." Toxicology and applied pharmacology. 264(1): 1-12.
14. Koga, T., et.al. (2012). "Restoration of dioxin-induced damage to fetal steroidogenesis and gonadotropin formation by maternal co-treatment with α -lipoic acid." PLoS One. 7(7): e40322.
15. Lan, H., I. Lin, Z. Yang and J. Lin (2015). "Low-dose bisphenol A activates Cyp11a1 gene expression and corticosterone secretion in adrenal gland via the JNK signaling pathway." Toxicological Sciences. 148(1): 26-34.
16. LaVoie, H. A. and S. R. King (2009). "Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, – CYP11A1 and HSD3B." Experimental biology and medicine. 234(8): 880-907.
17. LaVoie, H., King (2009). "Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B." Experimental biology and medicine 234(8): 880-907.
18. Li, X., Johnson, T., Rozman (1997). "2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Increases Release of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone from the Pituitary of Immature Female Rats in Vivo and in Vitro." Toxicology and applied pharmacology. 142(2): 264-269.
19. Lister, A. L. and J. Van Der Kraak (2001). "Endocrine disruption: why is it so complicated?" Water Quality Research Journal. 36(2): 175-190.
20. Miller, W (2008). "Steroidogenic enzymes." Disorders of the human Adrenal cortex. 13: 1-18.
21. Payne, A. H. and D. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocrine reviews. 25(6): 947-970.
22. Pitt, J., Buckalew, D. House and T., Abbott (2000). "Adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone secretion by perfused pituitary and adrenal glands from rodents exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." Toxicology. 151(1-3): 25-35.
23. –Raha, D., et.al. (2007). "IGF-I enhances cortisol secretion from guinea-pig adrenal gland: in vivo and in vitro study." International journal of molecular medicine. 20(1): 91-95.

24. Sekar, N., Garmey, J., Veldhuis and C. (2000). "Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme." *Molecular and cellular endocrinology*. 159(1-2): 25-35.
25. Shan, B., et.al. (2016). "Association between polycystic ovary syndrome (PCOS) and CYP11A1 polymorphism in Hainan, China: a case-control study." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 9(1): 230-236.
26. Shimada, M., I. Hernandez-Gonzalez, I. Gonzalez-Robayna and J., Richards (2006). "Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor." *Molecular endocrinology*. 20(6): 1352-1365.
27. Simard, J., Ricketts, S., Gingras, P., Soucy, F., Feltus and M. Melner (2005). "Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene family." *Endocrine reviews*. 26(4): 525-582.
28. Sun, M., X. Yang, C., Xu, G. Yao, J. Chen and M., Li (2012). "Risk-association of CYP11A1 polymorphisms and breast cancer among han Chinese women in Southern China." *Reproductive Toxicology*. 13(4): 4896-4905.
29. Suzuki, J., F. Otsuka, K. Inagaki, M. Takeda, T. Ogura and H. J. E. Makino (2004). "Novel action of activin and bone morphogenetic protein in regulating aldosterone production by human adrenocortical cells." *Endocrinology* 145(2): 639-649.
30. Takeda, T., M. Fujii, Y. Hattori, M. Yamamoto, T. Shimazoe, Y. Ishii, M. Himeno and H. J. M. p. Yamada (2014). "Maternal exposure to dioxin imprints sexual immaturity of the pups through fixing the status of the reduced expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone." *The Journal of toxicological sciences* 85(1): 74-82.
31. Takeda, T., et. al. (2011). "2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin potentially attenuates the gene expression of pituitary gonadotropin β -subunits in a fetal age-specific fashion: a comparative study using cultured pituitaries." *The Journal of toxicological sciences*. 36(2): 221-229.
32. Tremblay, A. and LeHoux J., (1993). "Transcriptional activation of adrenocortical steroidogenic genes by high potassium or low sodium intake." *FEBS letters*. 317(3): 211-215.
34. Wang, W., et. al. (2010). "Effect of interrupted endogenous BMP/Smad signaling on growth and steroidogenesis of porcine granulosa cells." *Journal of Zhejiang University Science B*. 11(9): 719-727.