

الحيوية الكيميائية للقطيرات الليدية الكبدية في فئران BALB/c إثر تعرضها لمركب الديوكسين

نور حموده¹ أ.م.د. شادي سكرية² أ.د. عبد السميع هنانو³

¹ طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

² أستاذ مساعد، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

³ مدير بحوث، دائرة السميات والعقاقير، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية.

الملخص

تُعرف الديوكسينات بأنها سموم عضوية هالوجينية مثابرة وعالية السمية وتشمل عائلتين هما Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs) والديوكسينات ثنائية البنزن عديدة الكلور و Polychlorinated Dibenzo Furans (PCDFs) والفورانات ثنائية البنزن عديدة الكلور ويتواسط المستقبل Aryl-hydrocarbon Receptor (AhR) سُمية الديوكسينات، ويُعرف المركب 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin رباعي كلورو ثنائي بنزو بارا ديوكسين (TCDD) بأنه الأعلى سُميةً من بين جميع الديوكسينات والأعلى ألفةً للمستقبل AhR وذو عامل مكافئ سُمي يعادل 1.0. ونظراً لطبيعتها المُحبة للدم، تُعرف الديوكسينات بقدرتها على التراكم في النسيج المدخرة للدم وبشكل خاص الكبد الذي يلعب دوراً رئيساً في نزع سُمية الديوكسينات بما يمتلكه من منظومة إنزيمية معقدة؛ عائلة السيتوكرومات P450 (CYPs)، وعُضيات متخصصة هي القطيرات الليدية Lipid Droplets (LDs). وهنا تبرز أهمية تحري أثر التعرض لـ TCDD على LDs الكبدية مورفولوجياً وجزيئياً لدى نموذج حيواني كفئران BALB/c. فقد تم في هذا العمل تجريب إناث فئران BALB/c فموياً بجرعة واحدة من زيت الذرة الحاوي على 15 ميكروغرام/كيلوغرام من TCDD، بالمقارنة مع الفئران الشاهدة المُجرعة فموياً بزيت الذرة فقط. ووفق أربع فواصل زمنية من زمن التجريب، عُزلت LDs الكبدية ووصفت مجهرياً. وُدرس التغير النسبي في التعبير المورثي عن أهم المورثات المسؤولة عن نزع السُمية واصطناع الأوكسيلينات و LDs باستعمال تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز الكمي في الزمن الحقيقي RT-qPCR، أظهرت النتائج وجود فروقات في التعبير المورثي في العينات المدروسة باختلاف النقاط الزمنية للدراسة، وتبدو الفروقات جليةً في عينات الزمن P3 و P4 إذ توجد زيادة في التعبير المورثي في كل من مورثي AhR و ARNT و CYP1A1 وذلك بالمقارنة مع P1 و P2. وتُظهر أيضاً زيادة واضحة في التعبير المورثي لكلٍ من مورثي LOX15 و COX2، وكذلك ارتفاعاً في التعبير عن مورثات Plin5 و CideC و Ppara و Pparg. وعلى خلاف ذلك، لُوحظ انخفاضاً في التعبير المورثي للمورثات المدروسة عدا AhR، في الزمن P1، أما في الزمن P2 فُلوُحظ انخفاضاً في التعبير المورثي في كلا مورثي AhR و ARNT، وعلى العكس ارتفاعاً طفيفاً في

CYP1A1، وعدم وجود فروقات تُذكر في باقي المورثات. أما على مستوى LDs، فقد تمّ التأكيد من نقاوتها وسلامة شكلها مجهرياً، وكذلك تلوينها بصبغة Nile Blue وتصويرها باستعمال مجهر الفلورة. لوحظ ارتفاع بسيط في أعداد LDs وتراكيز البروتينات المرتبطة في كل من النقاط الزمنية الأربعة بالمقارنة مع الشاهد، إلا أنه لم يكن هناك اختلافات ملحوظة بحجم LDs، إذ كانت أحجامها متقاربة في جميع عينات الدراسة. تخلص نتائج دراستنا لوجود مؤشرات أولية للتعرض لـ TCDD على مستوى التعبير المورثي لمورثات مسؤولة عن نزع السُميّة واصطناع الأوكسليبينات وLDs بشكل معتمد على الزمن. وهنا تبدو أهمية التركيز على سُمية هذا المركب وقدرته على التراكم ضمن LDs وتأثيره على تعدادها وعلى تركيبها ومحتواها الليبدي والبروتيني من خلال تعديل منظومة التعبير المورثي، الأمر الذي يتطلب مزيداً من البحث.

الكلمات المفتاحية: الديوكسينات، TCDD، فئران BALB/c، القطيرات الليبديّة الكبدية، الأوكسليبينات

تاريخ الإيداع: 2021/12/19

تاريخ القبول: 2022/05/15



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

The Biochemical changes of Hepatic Lipid Droplets in BALB/c mice exposed to TCDD

¹Nour Hammoudeh¹ Dr. Chadi Soukkarieh² Dr. Abdulsamie Hanano³

PhD student, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

² Assistant Professor, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

³ Research Director, department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria.

Abstract

Dioxins are highly toxic and persistent halogenated organic pollutants belonging to two families i.e., Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs) and Polychlorinated Dibenzo Furans (PCDFs). Dioxins toxicity is mediated by the Aryl-hydrocarbon Receptor (AhR). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is the most toxic among dioxins showing the highest affinity toward the AhR receptor, and has a Toxic Equivalent Factor (TEF) of 1.0. Dioxins are able to accumulate in fat storage tissue according to its lipophilicity. Liver among other tissues plays the main role in dioxin detoxification since it has a complex enzymatic system, CytochromeP450 (CYPs), and specialized organelle, Lipid Droplets (LDs). It is of necessity to verify the morphologic and molecular effects of TCDD on hepatic LDs in animal model, BALB/c mice. In this work, BALB/c mice were administrated one oral dose of 15µg/Kg/bw of TCDD, and after four sequenced time points, LDs were isolated from liver and described microscopically. Relative quantification in gene expression of dioxin detoxification and oxylipins synthesis genes was detected. The results show differences in gene expression by time intervals, especially in P3 and P4. There is an increasing in expression of *AhR*, *ARNT* and *CYP1A1* in P3 and P4 in compare with P1 and P2. An obvious accretion/increasing appeared in *LOX15*, *COX2*, *Plin5*, *CideC*, *Ppara* and *Pparg*. In contrast, gene expression of *AhR* (P1 and P2) and *ARNT* (P2) decreased in general, and increased briefly in *CYP1A1* expression, and no differences were observed in the expression of other genes. In parallel, LDs were isolated, stained with Nile Blue and checked by Fluorescence

microscope to confirm its morphology and integrity. In all time points, a brief increasing in LDs number and proteins concentration were observed in compare with the control. Fluorescence microscope images showed that the size of LDs was almost equal in all samples. Our results shed the light on primary indications for TCDD exposure at the level of gene expression of genes involved in TCDD detoxification, oxylipins and LDs synthesis in a time dependent manner. Here, it seems important to give more concern on TCCD toxicity and its ability to accumulate in LDs and influence on LDs number and its composition of lipid and protein through changes in gene expression. So, more investigations are still needed.

Received :2021/12/19

Accepted:2022/05/15

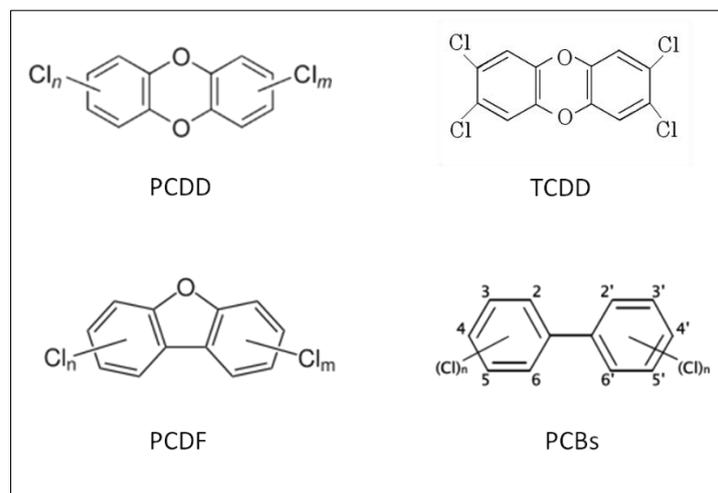


Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Keywords: DIOXIN, TCDD, BALB/C MOUSE, HEPATIC LIPID DROPLETS, OXYLIPINS.

المقدمة والدراسة المرجعية

واكب التقدم الصناعي والتقني الذي حققه الإنسان خلال العقود الماضية تنامي المخاطر البيئية والصحية التي تحيط به، حيث نجم عن هذا التقدم انبعاث كميات ضخمة من الغازات والمركبات الكيميائية السامة التي تلحق الضرر بالإنسان وسلامته، ولعل أهمها الديوكسينات. تُعرف الديوكسينات Dioxins بأنها هيدروكربونات حلقة هالوجينية عديمة اللون والرائحة، ومحبة للدمس Lipophilic، وعالية الثباتية كيميائياً، وبالتالي تمتلك القدرة على المثابرة والتراكم في النسيج الشحمية إلى حدٍّ قد يُسبب السُمية. تبدي الفقاريات نمطاً شائعاً من الاستجابة للديوكسينات من خلال قدرتها على الارتباط بالمستقبل (AhR) Aryl hydrocarbon Receptor (Safe, 1994; Van den Berg et al., 2006)، يمكن تقليل سُمية الديوكسينات بآليات كيميائية حيوية كتلك التي تتواسطها إنزيمات السيتوكرومات CYP450 (Ma, 2001; Whitlock Jr, 1999). إذ تؤدي هذه الإنزيمات دوراً حاسماً في أكسدة المواد السامة بهدف تحويلها إلى مركبات أكثر قطبية وبالتالي التقليل من ألفتها لمكونات الخلية ومنع ضررها. تُعد الديوكسينات من أخطر المركبات الكيميائية الملوثة للبيئة وذلك نظراً لمقاومتها لعمليات التحلل الحيوي والكيميائي وقدرتها على إلحاق الضرر بالكائنات الحية التي تتعرض لها. يُشير مصطلح الديوكسينات إلى مجموعة من المركبات الكيميائية المتشابهة في بنيتها والمختلفة في أثرها السُمي. وهي تضم مجموعتين هما مركبات ثنائي بنزو بارا ديوكسين عديد الكلور polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs) التي تتكون من حلقتي بنزن مرتبطتين بواسطة ذرتي أوكسجين، وتشمل 75 مركباً، أشهرها مركب 2,3,7,8 رباعي كلورو ثنائي بنزو بارا ديوكسين (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) الذي يعرف اختصاراً بـ TCDD. ومركبات ثنائي بنزو فوران عديد الكلور polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) تتكون من حلقتي بنزن مرتبطتين بواسطة ذرة أوكسجين واحدة، وتشمل 135 مركباً. وتدرج بعض مركبات ثنائي فينيل عديد الكلور polychlorinated biphenyls (PCBs) ضمن مجموعة المركبات الشبيهة بالديوكسينات نظراً لامتلاكها خصائص بنيوية مشابهة لها وتضم 419 مركباً، 30 منها تتميز بسُمية ذات أهمية (الشكل 1). وتُعد البنية رباعية الكلور ومنها TCDD الأكثر خطورةً بسبب صعوبة تدرجها، الأمر الذي يُفسر نصف العمر الطويل لهذه المركبات داخل الأنسجة الحية والذي يُقدر بحوالي 7-12 سنة (Birnbaum, 1994)، مؤدياً إلى تراكمها في السلسلة الغذائية وخاصةً الأعضاء المخزنة أو الغنية بالدهون كالكبد لدى الأسماك والطيور والثدييات (Pollitt, 1999).



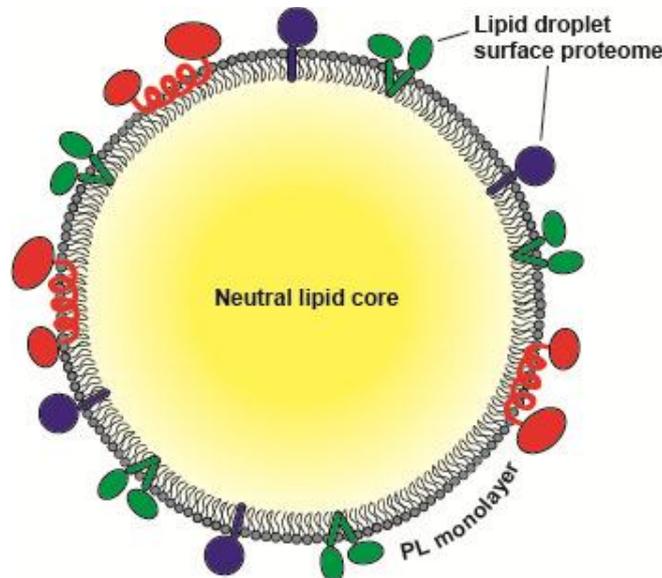
الشكل 1: أشكال مركبات الديوكسينات وشبيهاتها

(Inui, Itoh, Yamamoto, Ikushiro, & Sakaki, 2014)

تُعرف الليبيدات الحاوية على ذرة أوكسجين أو أكثر بالأوكسيليبينات Oxylipins، أو بالوسائط الليبية، التي تؤدي دوراً هاماً في تفعيل آليات الاستجابات المناعية تجاه الخمج والعقاقير والمواد الكيميائية الغريبة Xenobiotics، وبشكل خاص الديوكسينات نظراً

لألفتها العالية تجاه الدسم. إذ يؤثر الديوكسين في استقلاب الليبيدات، وفي تحفيز الإنزيمات المُستقبلية لحمض الأراشيدونيك AA كالتيتوكرومات CYP450s والسيكلوجيناز COXs والليوكسيجيناز LOXs. كما أظهرت الدراسات الدور الهام للأحماض الدسمة كرسائل ثانوية secondary messengers ومنظمات للجزيئات الشارية والعوامل الانتساخية. إذ تؤدي الأحماض الدسمة المتحررة من الغشاء الخلوي، بوساطة إنزيم الليباز Lipases والمؤكسدة إنزيمياً أو لا إنزيمياً، دور وسائط ليبيدية فاعلة تتحكم بالعديد من الوظائف وآليات الدفاع الطبيعية داخل الخلية الحية (Zoeller et al., 2012; Canonne, Froidure-Nicolas, & Rivas, 2011) من خلال الارتباط مع المستقبلات البروتينية التي تُنظم الآليات الاستقلابية، وتُعدّل بعض المسارات الشارية (Duplus, Glorian,) (Walley,) (Forest, 2000; Jump, 2004; Mueller, 2004) وذلك استجابةً لمحفزات أو إشارات بيئية أو تطويرية (Kliebenstein, Bostock, & Dehesh, 2013). تُعد القطيرات الليبية Lipid Droplets (LDs) مصدراً أساسياً لحمض الأراشيدونيك AA الذي يُمثل ركيزة أساسية لإنزيمات اصطناع الأوكسليبينات (COXs, LOXs, CYP450s) المتوضعة ضمن LDs (Bozza, Bakker-Abreu, Navarro-Xavier, & Bandeira-Melo, 2011; Dichlberger, Kovanen, & Schneider,) (2013).

وتُعرف القطيرات الليبية أيضاً بالأجسام الليبية lipid bodies، وهي عبارة عن عُضيات سيتوبلاسمية متخصصة في تخزين الطاقة، وتوجد في مختلف خلايا الحية بدءاً من أبسطها كالبكتريا وصولاً للإنسان (Murphy, 2012). تتألف LDs من لب ليبيدي مُحاط بطبقة فوسفوليبيدية وحيدة (الشكل 2). ويتكون اللب الليبيدي من ليبيدات معتدلة neutral lipid كارهة للماء، عادةً هي عبارة عن الغليسيريدات الثلاثية triglycerides و sterol esters استيرات الستيروول (Murphy, 2012; Bozza, Magalhães, Weller,) (Lipids, 2009; Tauchi-Sato, Ozeki, Houjou, Taguchi, & Fujimoto, 2002; Walther & Jr., 2012) هذا، وترتبط العديد من البروتينات النوعية والوظيفية بطبقة الفوسفوليبيد وهي التي تُكسب القطيرات الليبية بنيتها وثباتيتها ووظائفها الفريدة. بدأ مؤخراً فهم المبادئ الفيزيائية والكيميائية التي تتحكم في استهداف البروتين لـ LDs (Dhiman, Caesar, Thiam, & Schrul,) (2020). إذ تنشأ LDs من جديد de novo في الخلايا من مناطق أو مجالات محددة من الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية Endoplasmic Reticulum (ER). وبدأت تنتشر حديثاً الدراسات والتقارير العلمية حول آلية تشكل LDs والعوامل المحددة لنشؤها بدءاً من ER، بما في ذلك الإنزيمات المسؤولة عن اصطناع الليبيدات، وتركيب البروتينات، وكذلك المتطلبات الهيكلية للغشاء. كما يمكن لـ LDs أن تشكل اتصالات مع العُضيات داخل الخلية، وهذه الاتصالات بين العُضيات تُساهم في تحديد مواقع تشكل LDs (Jacquier et al., 2011; Valm et al., 2017; Barbosa & Siniosoglou, 2017; Gao & Goodman, 2015; Schuldiner & Bohnert, 2017).



الشكل 2. القطيرات الليبية Lipid Droplets

(Schuldiner & Bohnert, 2017)

بيّنت الدراسات سابقاً أن الدور الرئيسي لـ LDs هو تخزين الدسم كمصدر للطاقة ومركزاً لاصطناع الليبيدات والحفاظ على الاستتباب الداخلي لمستويات الدسم في الجسم (Kuerschner, Moessinger, & Thiele, 2008). ومن جهة أخرى، فإنها تشترك في الوظائف الاستقلابية الأساسية وتلعب دوراً هاماً في التأثير الخلوي والنقل عبر الغشاء الخلوي وإنتاج الوسائط التهابية وحالات الاستتباب/الإجهاد الخلوي (Accioly et al., 2008; Audet-Walsh et al., 2018; Huang, Li, Liu, Lin, & Chung, 2012; Geng et al., 2016; Y. Zhang et al., 2014; Furuta et al., 2008; H. Wu et al., 2019; Fazolini et al., 2015; Goswami & Sharma-Walia, 2016; Ackerman et al., 2018; Shimano & Sato, 2017).

افترضت العديد من الدراسات تراكم المركبات السامة داخلية المنشأ، مثل أنواع الليبيدات السامة، وكذلك الملوثات الخارجية في LDs، وبالتالي تُعزز فكرة أنّ LDs التي تعمل كمراكز عزل، تعمل كوسيلة للحفاظ على العضيات الأخرى في الخلية (Hoffmann, Grabińska, Guan, Sessa, & Neiman, 2017; Schlaepfer et al., 2012; Shyu, Wong, Crasta, & Thibault, 2018). إذ أوضحت دراسات سابقة إمكانية استخدام LDs كوسائط لاحتجاز الديوكسينات والملوثات العضوية الأخرى المحبة للدسم، فنظراً لبنيتها الفريدة (اللب الدسم) فإنها تتميز بقدرتها على احتجاز هكذا سموم عن الأوساط الحيوية المائية وبالتالي منع الضرر الذي تُحدثه (Wyss, Cordente, Von Stockar, & Marison, 2004)، كما هو الحال في بعض أنواع الفطور والطحالب التي تستخدم LDs لفصل السموم داخلية أو خارجية المنشأ عن الوسط داخل الخلوي. وحديثاً أوضحت دراسة هنانو وآخرون على بذور نخيل التمر، الأثر الذي يُحدثه TCDD على LDs من حيث عددها وحجمها وتنوعها من حيث البروتينات المرتبطة إلى الطبقة الفوسفوليبيدية المحيطة باللب الدسم (Hanano et al., 2016). وبالتالي نظراً لبنية LDs وأدوارها الحيوية ونظراً لطبيعة الديوكسينات المحبة للدسم، فمن هنا تبدو أهمية الكشف عن التأثيرات السمية للديوكسينات في استقلاب الدسم وفي LDs في الخلية الحيوانية وذلك عند التعرض لجرعةٍ ما من الديوكسينات بشكل مماثل للحوادث الطبيعية للتسمم بالديوكسينات عن طريق الغذاء الملوث بها مثلاً. وبالتالي هدفت هذه الدراسة إلى تحري أثر التعرض لمركب TCDD على مستوى التعبير الوراثي لأهم المورثات المسؤولة عن نزع السمية، وكذلك تلك المسؤولة عن اصطناع LDs واصطناع الأوكسيلينات، بالإضافة لتحري أثره في حجم وعدد LDs وتركيبها الحيوي.

مواد البحث وطرائقه:

حيوانات التجربة وتجربتها بالديوكسين TCDD

تم العمل على إناث سلالة الفئران BALB/c، بعمر 12-14 أسبوعاً، حيث وُزنت الفئران ووُزعت إلى أربع مجموعات بحسب الوزن لمعاملتها بتركيز ثابت من الديوكسين. تألفت كل مجموعة من ثلاثة فئران للمعاملة بالديوكسين وفأر غير مُعامل بالديوكسين كشاهد. جُرعت حيوانات مجموعات الفئران فموياً بجرعةٍ وحيدة قدرها 50 ميكروليتر من زيت الذرة الحاوي على 15 ميكروغرام/كيلوغرام من وزن الحيوان من مركب TCDD التجاري النقي (2,3,7,8-Tetrachloridbenzo-p-dioxin, 10 µg/ml in toluene, SUPELCO, USA)، وجُرعت الحيوانات الشاهدة بزيت الذرة فقط. وضُحي بحيوانات التجربة على فترات زمنية متتالية، بعد أسبوعين، وشهر، وشهرين، وأربعة أشهر من تاريخ التجريب، على الترتيب. عُزل منها الكبد وحُفظ في الآزوت السائل لحين العمل عليه.

دراسة التعبير الوراثي:

عزل الرنا الكلي total RNA من كبد الفأر وتحويله إلى الدنا المتمم cDNA

أُخذت عينات الكبد من الحيوانات الثلاثة المُعاملة بالـ TCDD وعينة الكبد من الشاهد وذلك من كل مجموعة من مجموعات الدراسة، عُزل منها الرنا الكلي total RNA وصُنِّعَ الدنا المتمم cDNA بهدف دراسة التعبير الوراثي لأهم المورثات المسؤولة عن نزع السمية لمركب TCDD، وكذلك تلك المسؤولة عن اصطناع الأوكسيلينات واصطناع LDs. لذلك، طُحنت كلاً من عينات

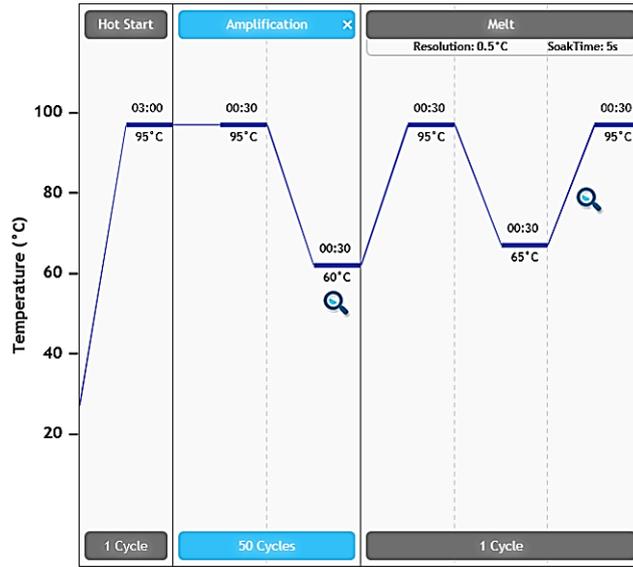
الكبد المأخوذة على حدة، ضمن جفنة عقيمة باستعمال الآزوت السائل حتى أصبحت مسحوقاً ناعماً. أُخذ ما يُعادل 30 ملغ من كلٍ منها إلى أنبوب ابندورف عقيم سعة 2 مل. أُجريت مراحل العزل باستعمال طاقم عزل الرنا الكلي (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Germany) بحسب تعليمات الشركة المُصنَّعة. ومن ثمَّ صنَّعَ الدنا المتمم cDNA بدءاً من الرنا النقي. باستعمال طاقم اصطناع الدنا المتمم (M-MLV Reverse Transcriptase, SIGMA, USA) بحسب تعليمات الشركة المُصنَّعة.

اختبار مرئسات المورثات المرجعية والهدفية؛

صُممت المرئسات النوعية للمورثات المرجعية hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1) and succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SdhA) وكذلك المورثات الهدفية المدروسة المُرمزة لكلٍ من المستقبل aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (AhR) والبروتين الرابط للمستقبل (ARNT)، وإنزيمات نزع السمية cytochrome P450 1A1(CYP1A1)، واصطناع الأوكسيليبينات lipoxygenases (LOX15) وcyclooxygenases (COX2) و Perilipin 5 (Plin5) من بروتينات LDs، وكذلك مورثات Cell death-inducing DFFA- و like effector c (Cidec) و peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara)، peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg) ذات الأدوار التنظيمية في اصطناع LDs، وذلك بالعودة إلى قاعدة البيانات NCBI. ويوضح الجدول التالي (الجدول 1) المرئسات النوعية المستخدمة في النقايات. وأختبرت على عينات cDNA المُصنَّعة باختبار كمي للتفاعل السلسلي للبوليميراز RT-qPCR باستعمال طاقم QuantiTech SYBR Green PCR Kit, QIAGEN, Germany، حيث تم تحضير مزيج التفاعل بحجم نهائي قدره 20 ميكروليتر، كمية عينة cDNA بحدود 200 نانوغرام/تفاعل، ومرئسات نوعية بما يُعادل 1-0.5 ميكرومولر. وأُجري التفاعل باستخدام جهاز (RT-qPCR, Agilliant Technologies, USA)، مدة 45 دورة، ودرجة تشافع 58 درجة مئوية (الشكل 3).

الجدول 1: التسلسلات النكليوتيدية للمرئسات النوعية المستخدمة

المرئسة العكسية	المرئسة المباشرة	رمز الجين	الجين
TCATCGCTAATCACGACGCT	GCAGCGTTTCTGAGCCATTG	NM_013556.2	Hprt1
GACAAAGTCTGGCGCAACTC	ACCTGACAGCTACAGGACCA	NM_023281.1	Sdha
CTGCTGCTGGCAAGCCGAGT	TCCACCGCTGCTGGTGAGGT	NM_001314027.1	AhR
GTCTTGGCTGTAGCCTGGG	GCTCATTCCCTCCTAACCCC	NM_001037737.2	ARNT
CAGGGCATTCTGGGCCAGGC	CCTGTGGTGGTGCTGAGCGG	NM_009992.4	CYP1A1
CCAAGACAGAGGAACACAGGG	GAAGATGTAACCCACCACGTTT	XM_006532036.3	LOX15
CATGTTCCAGGAGGATGGAG	AACCGCATTGCCTCTGAAT	NM_011198.4	COX2
GGCCCGCAGGACCAAATCCA	GCGCAGCGTGGATGCTCTACA	NM_007408.3	Plin5
GCTTGGCCTTGGCAGGCTGT	TGCTCCGCTGGACCCTTCA	NM_178373.4	Cidec
CCCGACAGACAGGCACTTGTGA	TCGGCTGAAGCTGGTGTACGA	NM_011144.6	Ppara
TCGCCCTCGCCTGGCTTTG	CAGGTTTGGGCGGATGCCACA	NM_001127330.2	Pparg



الشكل 3: مخطط تمثيلي لبرنامج تفاعل RT-qPCR

عزل القطيرات الليبديّة وتوصيفها:

عزل القطيرات الليبديّة من كبّد الفأر:

يعتمد عزل LDs على خاصية العوم أو الطفو Buoyancy لـ LDs وهي أقل من 1 غ/سم³. إذ يمكن عن طريق استخدام الطرد المركزي بسرعات منخفضة على خطوتين، تتبعها سرعة فائقة على خطوة واحدة وعلى مدرج كثافة متقطع، عزل حوالي 95% من LDs من الحلاية الخلوية. هذا وقد تم أمثلة البروتوكول التالي (S. Zhang et al., 2016) مع بعض التعديلات لعزل LDs من كبّد الفئران BALB/c باستخدام مدرج السوربيتول.

أخذت عينات الكبّد لكل من الحيوانات الشاهدة والمُعاملة بـ TCDD وقُطعت إلى أجزاء صغيرة وطُحنت بالآزوت السائل. أُضيف حجم مناسب من وقاء الغسل (WB) wash buffer (50 ميلي مولار تريس- حمض كلور الماء، درجة الحموضة pH=7.5). جُونست الخلايا ونُقلت لأنبوب إندورف سعة 2 مل، ونُقلت الخلايا على السرعة 5,000 دورة/الدقيقة لمدة 15 دقيقة على الدرجة 4 مئوية. أُستبعد الطافي بحذر بواسطة الماصة الميكروية وأُضيف للرسابة 1 مل من وقاء المجانسة homogenization buffer (HB) (50 ميلي مولار تريس- حمض كلور الماء، درجة الحموضة pH=7.5، و 1 مولار سوربيتول). جُونست الخلايا على الثلج حوالي 10 مرات باستعمال إبرة سيرنغ 22 G. ونُقلت الخلايا على السرعة 10,000 دورة/الدقيقة لمدة 30 دقيقة على الدرجة 4 مئوية. نُقل السائل الطافي الحاوي على LDs لأنبوب إندورف نظيف سعة 2 مل، وأُضيف له حجم مماثل من وقاء التعويم Floating buffer (FB) (50 ميلي مولار تريس- حمض كلور الماء، درجة الحموضة pH=7.5، و 0.5 مولار سوربيتول). ونُقلت العينة على السرعة 15,100 دورة/الدقيقة لمدة ساعة واحدة على الدرجة 4 مئوية. بعد انتهاء التثقيف، جُمعت طبقة LDs الطافية بحذر ونُقلت لأنبوب إندورف نظيف سعة 2 مل، وأُضيف لها حجم مماثل من محلول HB، تم قلب الأنبوب 4-5 مرات وأُضيف لها حجم مماثل من محلول FB، ونُقلت العينة على السرعة 15,100 دورة/الدقيقة لمدة ساعة واحدة على الدرجة 4 مئوية. سُحب وأُستبعد السائل تحت طبقة LDs بواسطة إبرة سيرنغ. وبهدف تنقية LDs، أُضيف حوالي 500 ميكروليتر من محلول المجانسة الحاوي على 1 مولار يوريا (HUB)، وتم قلب الأنبوب عدة مرات. وأُضيف لها حجم مماثل من محلول التعويم (FUB) الحاوي على اليوريا، ونُقلت العينة على السرعة 15,100 دورة/الدقيقة لمدة ساعة واحدة على الدرجة 4 مئوية. سُحب وأُستبعد السائل تحت طبقة LDs بواسطة إبرة سيرنغ، وأُضيف لها حجم مناسب 100 ميكروليتر من وقاء الخزن الحاوي Storing buffer (SB) (50 ميلي مولار تريس- حمض كلور الماء، درجة الحموضة pH=7.5، و 10% غليسرول)، وحُفظت LDs على الدرجة

4 مئوية، أو على الدرجة -20 مئوية. وبالنتيجة كان مجموع ما تمّ الحصول عليه هو 8 مكررات من LDs، كل اثنين منها تعود لمجموعة.

الفحص المجهرى للقطيرات الليبوية:

فُحصت LDs المعزولة وتحري نقاوتها وسلامتها مجهرياً باستعمال المجهر الضوئي وذلك باستخدام العدسة $100\times$ الغاطسة في زيت الأرز. كما استُخدمت صبغة نوعية محبة للدهن Nile Blue لتلوين LDs. إذ حُضرت الصبغة بتركيز 1 ملغ/مل في DMSO ومُدت عشر مرات $10\times$ في وقاء SB. أُضيف 9 ميكروليتر من الصبغة الممددة إلى 1 ميكروليتر من LDs النقية، مُزجت جيداً وحُضنت بدرجة حرارة المخبر لمدة 15 دقيقة، وأظهرت LDs تحت مجهر الفلورة (Fluorescence microscopy, Chroma Technology Corp, USA)، باستخدام الفلتر ذو الأطوال الموجية (إثارة 515-160 نانومتر، وانبعاث أكثر من 590 نانومتر)، وباستخدام العدسة $40\times$.

عدّ القطيرات الليبوية:

أُخذ حجم 10 ميكروليتر من LDs المعزولة، ومُدت بنسبة حجم/حجم بالماء المقطر، ووضعت على صفيحة العدّ (Marien Field Cell Counting Chamber Neubauer Improved, Germany)، وحُسب العدد في الملييلتر الواحد وفقاً للمعادلة التالية:

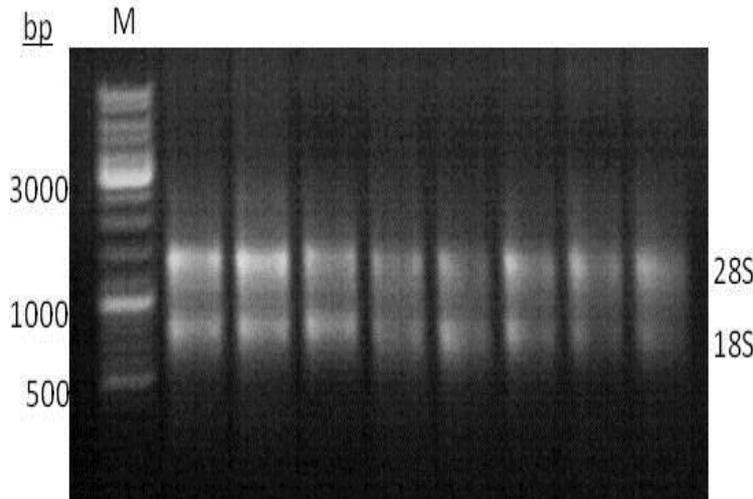
$$\text{عدد LDs/مل} = \text{عددها في مربع واحد كبير} \times \text{عامل التمديد} \times 10^4$$

معايرة البروتينات المرتبطة بالقطيرات الليبوية بطريقة برادفورد:

حُدّد تركيز البروتينات المرتبطة بـLDs بطريقة برادفورد (Bradford Assay (Bio-Rad) (Bradford, 1976). قيس الامتصاصية على طول موجة 595 نانومتر باستخدام محافد من الكوارتز (Quartz cuvettes, Hellma analytics, USA)، وجهاز مقياس الطيف الضوئي (6850 UV/Vis. Spectrophotometer, JENWAY).

النتائج والمناقشة:

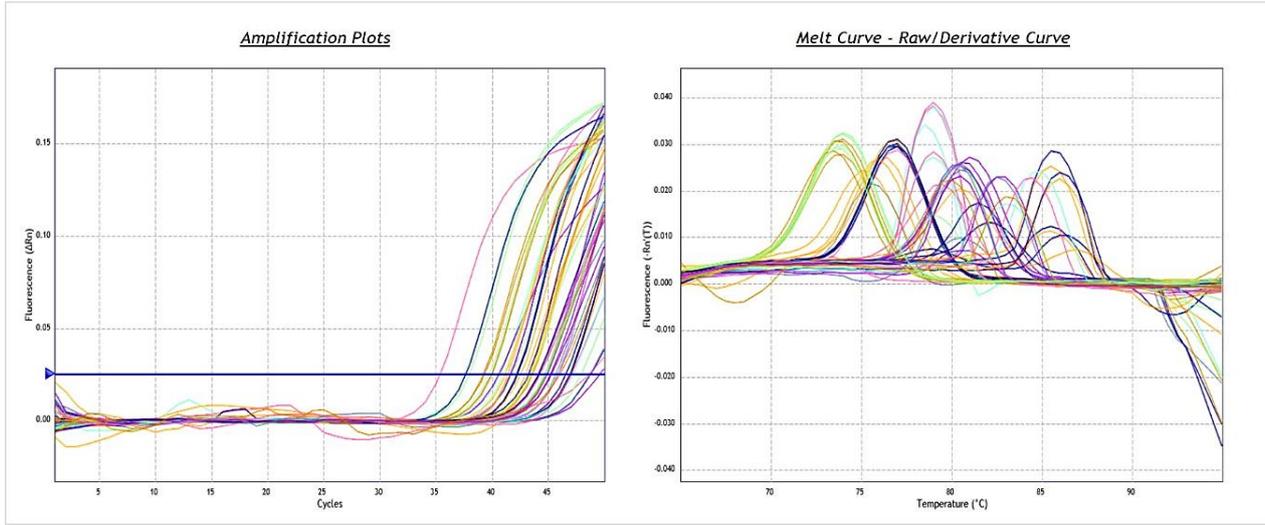
أُخذت عينات الكبد من جميع حيوانات التجربة والبالغ عددها 16 حيواناً [1 شاهد + 3 معامل $4\times$] من إناث الفئران BALB/c، بعمر 12-14 أسبوعاً، طُحنت كل منها على حدة باستعمال الهاون والمدقة وباستعمال الآزوت السائل وغُزل منها الرنا الكلي، وحُددت تراكيز العينات الناتجة ورُحّل منها ما يُعادل 1 ميكروغرام على هلامة آغاروز 1% للتأكد من جودة العينات ونقاوتها من الدنا الجينومي (الشكل 4).



الشكل 4: شكل تمثيلي لترحيل عدة عينات من الرنا الكلي totalRNA على هلامة آغاروز 1%

يُوضح الشكل نتيجة الرحلان الكهربائي الأفقي لبعض عينات الرنا الكلي totalRNA على هلامة آغاروز 1%. إذ يظهر في كل بئر عُصابتان بوزن جزئي منخفض تُمثلان نوعي الرنا الريبوزومي 28S و 18S، وعدم ظهور عُصابة في أعلى البئر بوزن جزئي مرتفع تُمثل الدنا الجينومي، ما يُؤكد نقاوة عينات الرنا من الدنا الجينومي.

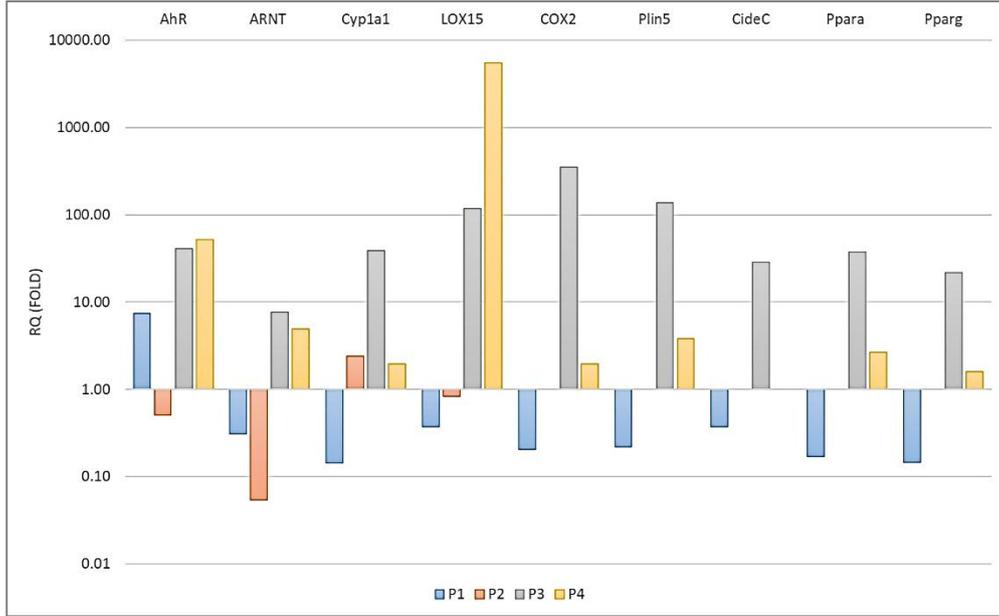
وحول ما يُعادل 3 ميكروغرام من كل عينة رنا إلى الدنا المتمم، ليتم لاحقاً اختبار جودة الـ cDNA المُصنَّع ودراسة التعبير المورثي باختبار RT-qPCR. تُدرس التغير النسبي في التعبير المورثي عن المورثات المدروسة (المذكورة أعلاه) بالنسبة للجين المرجعية Hprt1 من خلال تفاعل RT-qPCR، ويبيّن الشكل 5 نواتج التضخيم في تفاعل RT-qPCR ونوعية هذا التفاعل.



الشكل 5: شكل تمثيلي لنواتج تفاعل RT-qPCR لعدد من العينات المدروسة الشاهدة والمعالجة

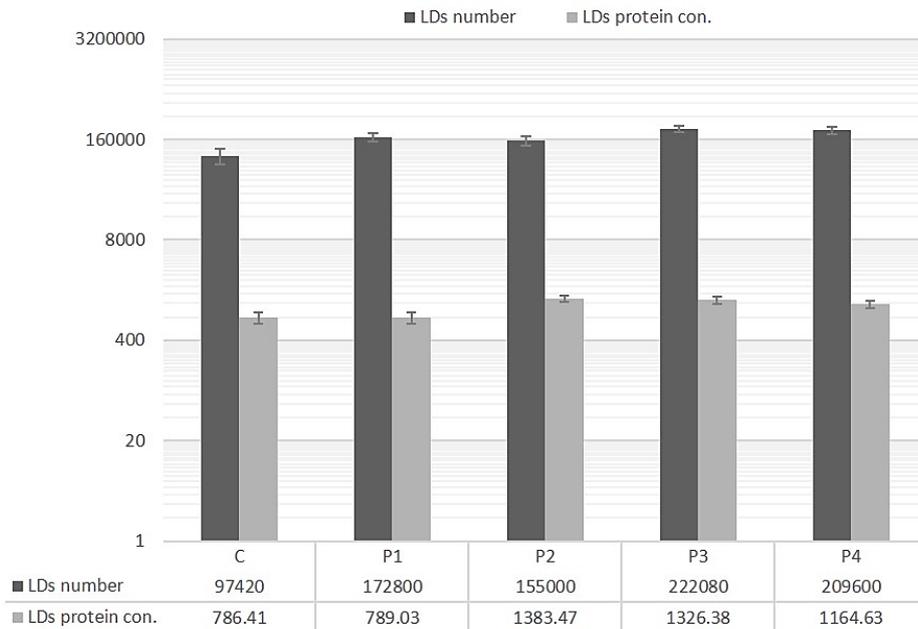
يُوضح الشكل مخطط ناتج التضخيم (إلى اليسار)، ومنحنيات الانصهار (إلى اليمين)، إذ يُمثل كل خط ملون في كلا المخططين عينة من العينات المدروسة مع كل من المورثات المرجعية والهدفية.

ومن خلال قيم Ct في تفاعل RT-qPCR، حُسب التغير النسبي في التعبير المورثي RQ من خلال العلاقة: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. بينت نتائج دراستنا وجود زيادة في التعبير المورثي في كل من مورثتي المستقبل AhR والبروتين الرابط للمستقبل ARNT، وكذلك مورثة السيتوكروم CYP1A1 المسؤولة عن نزع السمية للمركب TCDD، وذلك بشكل معتمد على الزمن، إذ تبدو الفروقات جلية في عينات الزمن P3 و P4 بالمقارنة مع P1 و P2 كما هو موضح في الشكل 6. كما لوحظ انخفاض في التعبير المورثي للمورثات المدروسة عدا مورثة AhR، في الزمن P1 من التجريب بالـ TCDD، أما في الزمن P2 وُجدَ انخفاض في التعبير المورثي في كلا مورثتي AhR و ARNT، وعلى العكس ارتفاع طفيف في المورثة CYP1A1، وعدم وجود فروقات تُذكر في باقي المورثات المدروسة. من جهة أخرى، تُظهر النتائج زيادة واضحة في التعبير المورثي لاسيما في الزمن P3, P4. لكل من مورثتي LOX15 و COX2 المسؤولين عن اصطناع الأوكسليبينات (اللوكترينات والبروستاغلاندينات)، على الترتيب، كوسائط التهابية استجابة للتعرض لـ TCDD. وتُظهر كذلك زيادة في التعبير عن مورثة Plin5 الأساسية ضمن عائلة بروتينات البيربليينات، وهي البروتينات الغشائية الأساسية في بنية LDs والهامة في الحفاظ على بنية LDs وثباتيتها. وبشكل مماثل، لوحظ ازدياد في التعبير عن مورثات CideC و Ppara و Pparg ذات الأدوار التنظيمية في اصطناع LDs في الزمن P3 بشكل خاص.



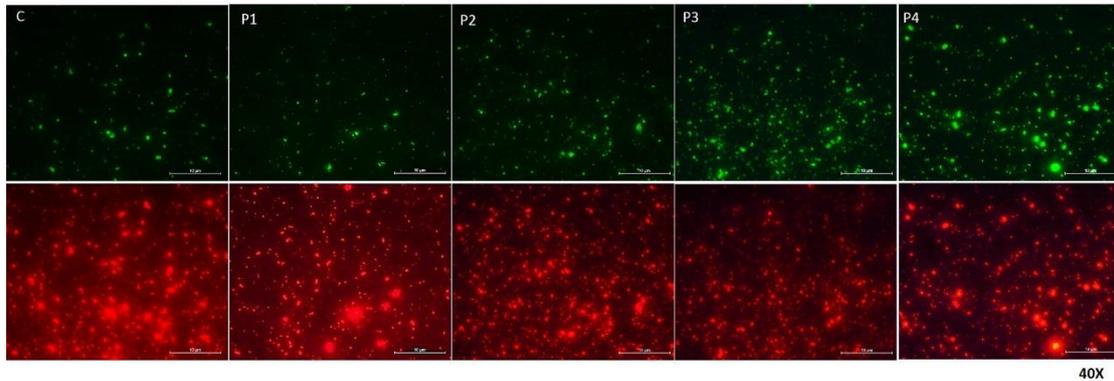
الشكل 6: مخطط يوضح الفروقات النسبية RQ في التعبير المورثي ما بين من العينات المدروسة بحسب اختلاف النقاط الزمنية (يمثل المحور Y لوغاريتم قيم RQ، ويمثل المحور X المورثات الهدفية مرتبة من اليسار إلى اليمين كالتالي (AhR, ARNT, CYP1A1, LOX15, COX2, Plin5, CideC, Ppara, Pparg) في العينات المدروسة في أربع نقاط زمنية متتالية خلال زمن الدراسة (P1, P2, P3, P4).

فيما يتعلق بـ LDs المعزولة، كانت هناك فروقات بسيطة في حجم طبقة LDs الناتجة أثناء العزل، وهذا ما توافق مع الاختلاف الطفيف في أعدادها وكذلك تراكيز بروتيناتها المرتبطة. إذ لوحظت هذه الاختلافات ما بين العينات المُعاملة خلال النقاط الزمنية المختلفة P1,P2,P3,P4 وبالمقارنة مع الشاهد. يُظهر الشكل 7 مخططاً يُعبر عن أعداد LDs (مُقدراتاً لكل عينة كبدية واحدة) في كل من النقاط الزمنية الأربعة بالإضافة إلى الشاهد، وكذلك تراكيز البروتينات المرتبطة. ولُوحظ أن هذه الزيادة في الأعداد متوافقة مع نتائج صور مجهر الفلورة وبعد التلوين بصبغة Nile Blue، كما هي موضحة في الشكل 8. أخيراً، لم يكن هناك اختلافات ملحوظة في حجم LDs ما بين العينات المدروسة والشاهدة، إذ كانت أحجامها متقاربة في جميع عينات الدراسة.



الشكل 7: مخطط يوضح العلاقة بين أعداد LDs* وتراكيز بروتيناتها المرتبطة

يُوضح الشكل العلاقة بين أعداد LDs المعزولة وتراكيز بروتيناها المرتبطة في الأربع نقاط زمنية (P1,P2,P3,P4)، بالإضافة للشاهد C. تُمثل الأعمدة الداكنة عدد LDs بينما تُمثل الأعمدة الباهتة تركيز البروتينات المرتبطة. وبشكل عام يُلاحظ تزايد بسيط في أعداد LDs في العينات المُعاملة بالمقارنة مع الشاهدة وذلك في الأربع نقاط زمنية (P1,P2,P3,P4). أما بالنسبة لتراكيز البروتينات المرتبطة فهي تتزايد بازدياد أعداد LDs بشكل عام. *القيم الحقيقية لأعداد LDs $\times 10^4$ ، وعُبر عنها لوغاريتمياً.



الشكل 8: شكل تمثيلي لعينات LDs تحت مجهر الفلورة

يُوضح الشكل صور لعينات LDs تحت مجهر الفلورة باستعمال اثنين من الفلاتر، الأحمر Red والأخضر Green، بعد تلوينها بالصبغة النوعية Nile Blue وعلى قوة التكبير 40X، والتي تُوضح الشكل الدائري السليم لـ LDs ونقاوتها ضمن الساحة المجهرية، وذلك خلال أربع نقط زمنية (P1,P2,P3,P4)، بالإضافة للشاهد C. مقياس الرسم — $10\mu\text{M}$.

بيّنت الدراسات السابقة أنّ الديوكسين يدخل إلى الخلية عن طريق الانتشار، وعند ارتباطه بالمستقبل AhR يتشكل معقد ربيطة-مستقبل (AhR-dioxin)، الذي ينتقل بدوره إلى النواة وهناك يرتبط مع بروتين ARNT ليشكل معقداً متغائراً هو AhR-ARNT، والذي بدوره يرتبط إلى مواقع محددة على DNA تُدعى Dioxin Response Elements (DREs) تتواجد في منطقة المحض لبعض المورثات الهدفية. وبالتالي، يكون له دورٌ في تفعيل انتساخ العديد من هذه المورثات (Hankinson, 1995; Poland, 1996; Glover, & Kende, 1976; Schmidt & Bradfield, 1996). ويُعتقد بأن الأثر السُمي للديوكسين يكون من خلال التفعيل المتأثر للمستقبل AhR وبالتالي منعه من القيام بأدواره الفيزيولوجية الأخرى داخل الخلية غير المتعلقة بالمواد الكيميائية الغريبة (Lahvis et al., 2000; Ma & Whitlock, 1996; Weiß, Kolluri, Kiefer, & Göttlicher, 1996). إذ أثبت العديد من الدراسات أن مسار AhR المفعل بهذه السموم ينتهي بتفعيل المورثة CYP1A1 وبالتالي زيادة فعالية الإنزيم المرمزة له (Whitlock Jr, 1999; Barouki, Coumoul, & Fernandez-Salguero, 2007; Hoffman EC, 1991; Okino & Mimura, 2005). إذ يُعد تفعيل مسار AhR الخطوة الأولى في السمية المسببة بالديوكسين، والتي ينتج عنها العديد من الاستجابات الكيميائية الحيوية والسُمية، إذ يُعرف عن الإنزيم CYP1A1 دوره في أكسدة الديوكسينات بهدف إزالة سُُميتها وجعلها أكثر قطبية وتسهيل عملية تفككها وطرحها في المنظومة الحية (Poellinger, 2000). وبالفعل توافقت نتائج دراستنا مع هذه الدراسات، إذ تُبين وجود زيادة في التعبير المورثي في كل من مورثات AhR و ARNT و CYP1A1 وبشكل معتمد على الزمن. ما يدعم فكرة الأثر المختلف لـ TCDD على التعبير المورثي بطريقة تعتمد على الزمن، بشكل مشابه لأثره المختلف بحسب الجرعة ومدة وطريقة التعرض للديوكسين وكذلك نوع الكائن (La Merrill et al., 2013; Jigyasi, Chotaliya, Kundu, & Sciences, 2019).

أما بالنسبة للزيادة الواضحة في التعبير المورثي لا سيما في P3 عن مورثات LOX15 و COX2 و Plin5 ومورثات CideC و Ppara و Pparg، فهي تتوافق مع دور LDs الذي أوضحته الدراسات. إذ تُعد LDs مصدراً أساسياً لحمض الأراشيدونيك AA

الذي يُمثل ركيزة أساسية لإنزيمات COX, LOX, CYP450 المتوضعة ضمن LDs (Bozza et al., 2011; Dichlberger et al., 2013)، وأن TCDD يزيد من تحفيز الإنزيمات المُستقلبة لحمض الأراشيدونيك AA كالسيتوكرومات P450 والسيكلوجيناز والليبوكسيجيناز (Rifkind, Gannon, & Gross, 1990; Gilday, Bellward, Sanderson, Janz, & Rifkind, 1998). وهذا يعني أن تفعيل هذه المورثات يؤدي لزيادة اصطناع الأوكسيليبينات نتيجة التعرض لـ TCDD وذلك بطريقة معتمدة على الزمن وبشكل مرتبط بـ LDs.

من ناحية أخرى، تُمثل البيربيلينات الدعامة الأساسية في بنية LDs (Itabe, Yamaguchi, Nimura, & Sasabe, 2017; Kory, Thiam, Farese Jr, & Walther, 2015). ويُعبر عن البروتين Plin5 بشكل أساسي في النسيج ذات النشاط التأكسدي العالي كالقلب والعضلات الهيكلية والكبد، ويُحفز اتصال LDs مع الميتوكوندريا (Wang et al., 2011). وبيّنت دراسة حديثة أن البروتين Plin5 يؤدي دوراً في إعادة تشكل LDs في الخلايا النجمية الكبدية (HSC) وزيادة المحتوى الليبيدي وذلك من خلال تحريض التعبير عن مورثات تحفيز اصطناع الليبيدات pro-lipogenic genes وكبح التعبير عن مورثات تحفيز تحلل الليبيدات pro-lipolytic genes وكذلك كبح تفعيل هذه الخلايا (Lin & Chen, 2016). وهذا يتفق مع نتائجنا التي بيّنت زيادة في التعبير المورثي لـ Plin5 بشكل مرتبط مع تزايد في أعداد LDs خاصةً في الزمن P3,P4، وكذلك مورثات CideC و Ppara و Pparg.

أما بالنسبة لـ LDs، فقد أوضحت العديد من الدراسات أن عدد LDs وحجمها يمكن أن يتغير تبعاً لظروف مختلفة كالغذائية، والسُمية الليبية، والحالة الاستقلابية. وهذا التغير قد يُشير إلى تبدلات في استقلاب الليبيدات وبالتالي قدرة الخلايا على تشكيل LDs (Mason et al., 2014; McDonough et al., 2009). هذا وإن الآلية الدقيقة لنمو وازدياد حجم LDs غير معروفة بشكل دقيق، ومع ذلك فإن عائلة البروتينات CIDE تلعب دوراً هاماً في هذه الآلية، وبشكل خاص البروتين CideC الذي يتوسط عملية اندماج LDs وانتقال الليبيدات المعتدلة من LDs الصغيرة إلى الكبيرة، كما في الخلايا الشحمية لدى الثدييات (Barneda et al., 2015; Gong et al., 2011; Puri et al., 2007; L. Wu et al., 2014). كما تؤدي بروتينات Ppar دوراً تنظيمياً في تشكل وتطور LDs من خلال دورها في التحكم في التعبير المورثي عن البيربيلينات، وكذلك في تخزين الغليسيريدات الثلاثية، وبشكل خاص بروتينات Ppara و Pparg التي تمتلك أدواراً شارية في نسيج مختلفة كالكبد والكلية (Dalen, Ulven, Arntsen, Solaas, & Simonsen, 2004; Motomura et al., 2006; Nebb, 2006; Mishra, Emancipator, Miller, Kern, & Simonsen, 2004). نتائجننا زيادة في التعبير المورثي لـ Plin5 و CideC و Ppara و Pparg وذلك في الزمن P3,P4 وذلك بعدما انخفض التعبير عنها في الزمن P1، أي وكأنّ هناك عودة تدرجية لزيادة التعبير عن هذه المورثات مع زيادة المدة الزمنية. وهذا يتوافق مع تزايد أعداد LDs في الزمن P3,P4 ولو بشكل طفيف بالمقارنة مع P2 التي انخفض فيها عدد الـ LDs بعد ارتفاعه في الزمن P1. هذا ويمكن أن يُفسر ازدياد عدد LDs في الزمن P1 بوجود آليات أو مسارات شارية أخرى تؤثر على تشكل LDs وتراكمها مثل مسار AhR-CD36، الذي يؤدي تفعيله إلى تسريع التقاط الأحماض الدسمة وتراكم الليبيدات داخل الخلايا الكبدية، وهذا يعني زيادة عدد LDs (Yao et al., 2016). وينفس الآلية يمكن تفسير انخفاض عدد LDs في الزمن P2، حيث انخفض فيها التعبير المورثي عن AhR، بالإضافة لانخفاض تعبير المورثات المذكورة.

أخيراً، أثبتت الدراسات أوار LDs الحيوية الهامة في الخلية الحية بمختلف مستوياتها التطورية، واستجابتها للظروف والعوامل المحيطة التي تتعرض لها الخلية، كالتوتر STRESS والعوامل المرضية والتعرض للسموم داخلية وخارجية المنشأ، لاسيما السموم التي تتجذب لـ LDs بحكم طبيعتها المُحبة للدهن. فمن خلال بنية LDs الفريدة وديناميكيته والبروتينات المرتبطة بها يمكن لها أن تتأثر وتؤثر في استجابة الخلية بشكل عام لهذه العوامل والظروف المختلفة. إذ بيّنت العديد من الدراسات كيف أنّ LDs قادرة على احتجاز ومُراكمة الهيدروكربونات الحلقة العطرية Polycyclic Aromatic Hydrocarbon المُحبة للدهن كمركبات عديد الكلور ثنائي الفينيل (PCBs) polychlorinated biphenyl compounds وحماية الغُضيات الأخرى والخلية ككل من الأثر السُمي لها

(Bourez et al., 2012; Bourez et al., 2013; Verdin, Sahraoui, Laruelle, Grandmougin-Ferjani, & Durand, 2006).

مما سبق؛ نستنتج أهمية التركيز على LDs وأدوارها وعلى سُمية مركب TCDD وقدرته على التراكم ضمن LDs الكبدية وتأثيره في تعدادها، وربما كذلك على تركيبها ومحتواها الليبي والبروتيني من خلال تعديل منظومة التعبير المورثي، الأمر الذي يتطلب مزيداً من البحث.

محدوديات الدراسة:

أنجز العمل على عدد قليل من الحيوانات المخبرية وبتركيز وحيد وجرعة وحيدة. ومن الممكن توسيع الدراسة على مجموعات أكبر وتراكيز مختلفة، سواءً على جرعة واحدة أو عدة جرعات، وهذا ما يتطلب مزيداً من مادة TCDD التجارية النقية. وعندها يمكن دراسة معنوية النتائج التي تم التوصل إليها إحصائياً. من ناحية أخرى، إنَّ توفر الأضداد النوعية الموجهة لبروتينات LDs يُمكن من كشف التغيرات في المحتوى البروتيني إثر التعرض لـ TCDD.

الاستنتاجات:

بيّنت نتائج دراستنا أثر مركب TCDD على التعبير المورثي لأهم المورثات المسؤولة عن نزع السُّمية واصطناع الأوكسيلينات وLDs لدى إناث فئران مُجرّعة فمويّاً بجرعة وحيدة من مركب TCDD، وكذلك الأثر المُحتمل في تعداد LDs وحجمها، وذلك بطريقة معتمدة على الزمن، إذ لم يكن نمط الاستجابة ثابتاً باختلاف النقاط الزمنية للدراسة. ونستنتج مما سبق أهمية التركيز على LDs وأدوارها وعلى سُمية مركب TCDD وقدرته على التراكم ضمن LDs الكبدية وتأثيره في تعدادها وتركيبها ومحتواها الليبي والبروتيني من خلال تعديل منظومة التعبير المورثي، وهذا يتطلب مزيداً من البحث.

المراجع:

1. Safe, S. H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical reviews in toxicology*, 24(2), 87-149 .
2. Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., . . . Haws, L. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological sciences*, 93(2), 223-241 .
3. Ma, Q. (2001). Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Current drug metabolism*, 2(2), 149-164 .
4. Whitlock Jr, J. P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 103-125 .
5. Birnbaum, L. S. (1994). The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environmental health perspectives*, 102(Suppl 9), 157 .
6. Pollitt, F. (1999). Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30(2), S63-S68 .
7. Inui, H., Itoh, T., Yamamoto, K., Ikushiro, S., & Sakaki, T. (2014). Mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls. *Int J Mol Sci*, 15(8), 14057-4044doi:10.3390/ijms150814044
8. Zoeller, M., Stengl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., & Mueller, M. J. (2012). Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology*, 160(1), 365-378 .
9. Canonne, J., Froidure-Nicolas, S., & Rivas, S. (2011). Phospholipases in action during plant defense signaling. *Plant signaling & behavior*, 6(1), 13-18 .
10. Duplus, E., Glorian, M., & Forest, C. (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 30749-30752 .
11. Jump, D. B. (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 41(1), 41-78 .
12. Mueller, M. J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 441-448 .
13. Walley, J. W., Kliebenstein, D. J., Bostock, R. M., & Dehesh, K. (2013). Fatty acids and early detection of pathogens. *Current opinion in plant biology*, 16(4), 520-526 .
14. Bozza, P. T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R. A., & Bandeira-Melo, C. (2011). Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 85(5), 205-213-
15. Dichlberger, A., Kovanen, P. T., & Schneider, W. J. (2013). Mast cells: from lipid droplets to lipid mediators. *Clinical science*, 125(3), 121-130 .
16. Murphy, D. J. J. P. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *249(3)*, 541-585 .
17. Bozza, P. T., Magalhães, K. G., Weller, P. F. J. B. e. B. A.-M., & Lipids, C. B. o. (2009). Leukocyte lipid bodies—biogenesis and functions in inflammation. *1791(6)*, 540-551 .
18. Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., & Fujimoto, T. J. J. o. B. C. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *277(46)*, 44507-44512 .
19. Walther, T. C., & Jr., R. V. F. (2012). Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *81(1)*, 687-714. doi:10.1146/annurev-biochem-061009-102430
20. Dhiman, R., Caesar, S., Thiam, A. R., & Schrul, B. (2020). Mechanisms of protein targeting to lipid droplets: A unified cell biological and biophysical perspective. *Semin Cell Dev Biol*, 108, 4-13. doi:10.1016/j.semcd.2020.03.004
21. Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F., & Schneiter, R. (2011). Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 124(Pt 14), 2424-2437. doi:10.1242/jcs.076836
22. Valm, A. M., Cohen, S., Legant, W. R., Melunis, J., Hershberg, U., Wait, E., . . . Lippincott-Schwartz, J. (2017). Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature*, 546(7656), 162-167. doi:10.1038/nature22369

23. Barbosa, A. D., & Siniosoglou, S. (2017). Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(9), 1459-1468. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.04.001
24. Gao, Q., & Goodman, J. M. (2015). The lipid droplet-a well-connected organelle. *Front Cell Dev Biol*, 3, 49. doi:10.3389/fcell.2015.00049
25. Schuldiner, M., & Bohnert, M. (2017). A different kind of love - lipid droplet contact sites. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862(10 Pt B), 1188-119 .doi:10.1016/j.bbalip.2017.06.005
26. Kuerschner, L., Moessinger, C., & Thiele, C. (2008). Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, 9(3), 338-352 .
27. Accioly, M. T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C. M., Carrossini, N ,Robbs, B. K., Oliveira, S. S., . . . Viola, J. P. J. C. r. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. 68(6), 1732-1740 .
28. Audet-Walsh, E., Vernier, M., Yee, T., Laflamme, C., Li, S ,Chen, Y., & Giguere, V. (2018). SREBF1 Activity Is Regulated by an AR/mTOR Nuclear Axis in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res*, 16(9), 1396-1405. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0410
29. Huang, W.-C., Li, X., Liu, J., Lin, J., & Chung, L. W. J. M. C. R. (2012). Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells. 10(1), 133-142 .
30. Geng, F., Cheng, X., Wu, X., Yoo, J. Y., Cheng, C., Guo, J. Y., . . . Kim, S.-H. J. C. C. R. (2016). Inhibition of SOAT1 suppresses glioblastoma growth via blocking SREBP-1-mediated lipogenesis. 22(21), 5337-5348 .
31. Zhang, Y., Sun, Y., Rao, E., Yan, F., Li, Q., Zhang, Y., . . . Cleary, M. P. J. C. r. (2014). Fatty acid-binding protein E-FABP restricts tumor growth by promoting IFN-β responses in tumor-associated macrophages. 74(11), 2986-2998 .
32. Furuta, E., Pai, S. K., Zhan, R., Bandyopadhyay, S., Watabe, M., Mo, Y.-Y., . . . Miura, K. J. C. r. (2008). Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. 68(4), 1003-1011 .
33. Wu, H., Han, Y., Rodriguez Sillke, Y., Deng, H., Siddiqui, S., Treese, C., . . . Glauben, R. (2019). Lipid droplet-dependent fatty acid metabolism controls the immune suppressive phenotype of tumor-associated macrophages. *EMBO Mol Med*, 11(11), e10698. doi:10.15252/emmm.201910698
34. Fazolini, N. P., Cruz, A. L., Werneck, M. B., Viola, J. P., Maya-Monteiro, C. M., & Bozza, P. T. J. C. c. (2015). (Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. 14(16), 2667-2676 .
35. Goswami, S., & Sharma-Walia, N. J. O. (2016). Crosstalk between osteoprotegerin (OPG), fatty acid synthase (FASN) and, cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer: implications in carcinogenesis. 7(37), 58953 .
36. Ackerman, D., Tumanov, S., Qiu, B., Michalopoulou, E., Spata, M., Azzam, A., . . . Kamphorst, J. J. (2018). Triglycerides Promote Lipid Homeostasis during Hypoxic Stress by Balancing Fatty Acid Saturation. *Cell Reports*, 24(10), 2596-2605.e2595. doi:10.1016/j.celrep.2018.08.015
37. Shimano, H., & Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology — divergent pathophysiology. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(12), 710-730. doi:10.1038/nrendo.2017.91
38. Hoffmann, R., Grabińska, K., Guan, Z., Sessa, W. C., & Neiman, A. M. J. G. (2017). Long-chain polyprenols promote spore wall formation in *Saccharomyces cerevisiae*. 207(4) .1386-1371 ,(
39. Schlaepfer, I. R., Hitz, C. A., Gijón, M. A., Bergman, B. C., Eckel, R. H., Jacobsen, B. M. J. M., & endocrinology, c. (2012). Progesterin modulates the lipid profile and sensitivity of breast cancer cells to docetaxel. 363(1-2), 111-121 .
40. Shyu, P., Wong, X. F. A., Crasta, K., & Thibault, G. J. B. r. (2018). Dropping in on lipid droplets: insights into cellular stress and cancer. 38(5) .(
41. Wyss, A., Cordente, N., Von Stockar, U., & Marison, I. (2004). A novel approach for the extraction of herbicides and pesticides from water using liquid-core microcapsules. *Biotechnol Bioeng*, 87(6), 734-742 .
42. Hanano, A., Almously, I., Shaban, M., Rahman, F., Blee, E., & Murphy, D. J. (2016). Biochemical, Transcriptional, and Bioinformatic Analysis of Lipid Droplets from Seeds of Date Palm (Phoenix

- dactylifera L.) and Their Use as Potent Sequestration Agents against the Toxic Pollutant, 2, 3, 7, 8-Tetrachlorinated Dibenzo-p-Dioxin. *Frontiers in plant science*, 7 .
43. Zhang, S., Wang, Y., Cui, L., Deng, Y., Xu, S , Yu, J., . . . Liu, P. (2016). Morphologically and Functionally Distinct Lipid Droplet Subpopulations. *Sci Rep*, 6, 29539. doi:10.1038/srep29539
 44. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
 45. Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 35(1), 307-340 .
 46. Poland, A., Glover, E., & Kende ,A. S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 251(16), 4936 .4946-
 47. Schmidt, J. V., & Bradfield, C. A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annual review of cell and developmental biology*, 12(1), 55-89 .
 48. Lahvis, G. P., Lindell, S. L., Thomas, R. S., McCuskey, R. S., Murphy, C., Glover, E., . . . Bradfield, C. A. (2000) .Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19), 10442-10447 .
 49. Ma, Q., & Whitlock, J. P. (1996). The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Molecular and cellular biology*, 16(5), 2144-2150 .
 50. Weiß, C., Kolluri, S. K., Kiefer, F., & Göttlicher, M. (1996). Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor. *Experimental cell research*, 226(1), 154-163 .
 51. Barouki, R., Coumoul, X., & Fernandez-Salguero, P. M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS letters*, 581(19), 3608-3615 .
 52. Hoffman EC, R. H., Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, 252(5008), 954-958. doi: 10.1126/science.1852076
 53. Okino, S. T., & Whitlock, J. P. (2000). The aromatic hydrocarbon receptor, transcription, and endocrine aspects of dioxin action. *Vitamins & Hormones*, 59, 241-264 .
 54. Fujii-Kuriyama, Y., & Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 311-317 .
 55. Poellinger, L. (2000). Mechanistic aspects the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Food Additives & Contaminants*, 17(4), 261-266 .
 56. La Merrill, M., Emond ,C., Kim, M. J., Antignac, J. P., Le Bizec, B., Clement, K., . . . Barouki, R. (2013). Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect*, 121(2), 162-169. doi:10.1289/ehp.1205485
 57. Jigyasi, J., Chotaliya, A., Kundu, R. J. I. J. o. P., Animal, & Sciences, E. (2019). Dose and Duration Dependent 2, 3, 7, 8 TCDD (Dioxin) induced Enzymatic and Histopathological changes in the Liver Cells of Mice. 9(4), 237-245 .
 58. Rifkind, A. B., Gannon, M., & Gross, S. S. (1990). Arachidonic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450: a new hypothesis on the role of P-450 in dioxin toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 172(3), 1180-1188 .
 59. Gilday, D., Bellward, G., Sanderson, J., Janz, D., & Rifkind, A. (1998). 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces hepatic cytochrome P450-dependent arachidonic acid epoxygenation in diverse avian orders: regioisomer selectivity and immunochemical comparison of the TCDD-induced P450s to CYP1A4 and 1A5. *Toxicol Appl Pharmacol*, 150(1), 106-116 .
 60. Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S., & Sasabe, N. (2017). Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids in health and disease*, 16(1), 83 .
 61. Kory, N., Thiam, A.-R., Farese Jr, R. V & ,Walther, T. C. J. D. c. (2015). Protein crowding is a determinant of lipid droplet protein composition. 34(3), 351-363 .
 62. Wang, H., Sreenivasan, U., Hu, H., Saladino, A., Polster, B. M., Lund, L. M., . . . Sztalryd, C. (2011). Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *Journal of lipid research*, 52(12), 2159-2168 .

63. Lin, J., & Chen, A. (2016). Perilipin 5 restores the formation of lipid droplets in activated hepatic stellate cells and inhibits their activation. *Lab Invest*, 96(7), 791-806. doi:10.1038/labinvest.2016.53
64. Mason, R. R., Mokhtar, R., Matzaris, M., Selathurai, A., Kowalski, G. M., Mokbel, N., . . . Watt, M. J. J. M. m. (2014). PLIN5 deletion remodels intracellular lipid composition and causes insulin resistance in muscle. 3(6), 652-663 .
65. McDonough, P. M., Agustin, R. M., Ingermanson, R. S., Loy, P. A., Buehrer, B. M., Nicoll, J. B., . . . technologies, d. d. (2009). Quantification of lipid droplets and associated proteins in cellular models of obesity via high-content/high-throughput microscopy and automated image analysis. 7(5), 440-460 .
66. Barneda, D., Planas-Iglesias, J., Gaspar, M. L., Mohammadyani, D., Prasannan, S., Dormann, D., . . . Kagan, V. J. E. (2015). The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. 4, e07485 .
67. Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., . . . Li, P. (2011). Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *Journal of Cell Biology*, 195(6), 953-963 .
68. Puri, V., Konda, S., Ranjit, S., Aouadi, M., Chawla, A., Chouinard, M., . . . Czech, M. P. J. J. o. B. C. (2007). Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. 282(47), 34213-34218 .
69. Wu, L., Zhou, L., Chen, C., Gong, J., Xu, L., Ye, J., . . . Li, P. (2014). Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue. *Sci China Life Sci*, 57(1), 107-116. doi:10.1007/s11427-013-4585-y
70. Dalen, K. T., Ulven, S. M., Arntsen, B. M., Solaas, K., & Nebb, H. I. (2006). PPAR α activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. *Journal of Lipid Research*, 47(5), 931-943 .
71. Mishra R., Emancipator, S. N., Miller, C., Kern, T., & Simonson, M. S. (2004). Adipose differentiation-related protein and regulators of lipid homeostasis identified by gene expression profiling in the murine db/db diabetic kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(5), F913-F921 .
72. Motomura, W., Inoue, M., Ohtake, T., Takahashi, N., Nagamine, M., Tanno, S., . . . Okumura, T. (2006). Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochemical and biophysical research communications*, 340(4), 1111-1118 .
73. Yao, L., Wang, C., Zhang, X., Peng, L., Liu, W., Zhang, X., . . . Zhu, Y. (2016). Hyperhomocysteinemia activates the aryl hydrocarbon receptor/CD36 pathway to promote hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 64(1), 92-105. doi:10.1002/hep.28518
74. Bourez, S., Le Lay, S., Van den Daelen, C., Louis, C., Larondelle, Y., Thome, J. P., . . . Debier, C. (2012). Accumulation of polychlorinated biphenyls in adipocytes: selective targeting to lipid droplets and role of caveolin-1. *PLoS One*, 7(2), e31834. doi:10.1371/journal.pone.0031834
75. Bourez, S., Van den Daelen, C., Le Lay, S., Poupaert, J., Larondelle, Y., Thome, J. P., . . . Debier, C. (2013). The dynamics of accumulation of PCBs in cultured adipocytes vary with the cell lipid content and the lipophilicity of the congener. *Toxicol Lett*, 216(1), 40-46. doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.027
76. Verdin, A., Sahraoui, A. L.-H., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., & Durand, R. J. M. r. (2006). Effect of the high polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo [a] pyrene, on the lipid content of *Fusarium solani*. 110(4), 479-484 .