مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 40- عدد 3 (2024): 128-140

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 40 No.3 (2024): 128 -140

التحري عن التغيرات الانتساخية لمورثتي *CYP1A1/ CYP11A1* في الخصى والغدة الكظرية لدى ذكور فئران بالغة سلالة BALB/c ومجرعة بالديوكسين رباعي الكلور

ولاء يوسف فياض[1]، شادي الياس سكرية[2]، عبد السميع محمد هنانو[3]

1. طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق walaa8.faiad@damascus university.edu.sy

2. أستاذ مساعد، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق chadi.soukkarieh@damascus university.edu.sy

3. مدير بحوث، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية ashanano@aec.org.sy

الملخص

تصنف الديوكسينات ضمن الملوثات العضوية المستمرة واسعة الانتشار في البيئة والتي تؤثر سلبا على عملية الإنطاف عند العديد من الكائنات، وذلك من خلال قدرتها على إحداث اضطراب في اصطناع الهرمونات الجنسية الضرورية لإتمام هذه العملية بشكلها الطبيعي، لذا هدف هذا البحث إلى دراسة الأثر السمي لمركب الديوكسين رباعي الكلور TCDD على عملية اصطناع هرمون التستوستيرون T لدى ذكور الفئران BALB/C.

قسم 18 فأر ذكر بالغ من نوع BALB/C إلى 3 مجموعات (6 فئران في كل مجموعة) وهي مجموعة شاهدة جرعت بزيت الذرة، ومجموعة جرعت فمويا بتركيز 25 مكغ/كغ من TCDD ، ومجموعة أخيرة جرعت فمويا بتركيز 50 مكغ/كغ من TCDD. بعد أسبوع من التجريع تمت التضحية بهذه الفئران وعزل كلا من الغدة الكظرية والخصى من الحيوانات، ثم عزل mRNA من

هذه الأعضاء وحول إلى cDNA ودرست تغيرات التعبير المورثي عن أهم الإنزيمات المشاركة في نزع السمية وهو cyp1a1 والإنزيم المفتاح في سلسلة اصطناع هرمون T وهو cyp11a1 بتقانة Real time PCR. بينت نتائج هذه الدراسة قدرة الديوكسين على إحداث اضطراب في التعبير عن إنزيم cyp11a1، حيث لوحظ ارتفاعا بمقدار 3.4 و8.6 مرة في الخصى والغدة الكظرية لدى الفئران المجرعة بـ 25 مكغ/كغ من TCDD على التوالي، بينما كانت الجرعة 50مكغ/كغ ذات أثر تثبيطي في التعبير عن هذا الإنزيم في الخصى والغدة الكظرية، وكان الانخفاض بمقدار1.7 و 2 مرة للخصى والغدة الكظرية على التوالي، وذلك بالمقارنة مع الخصى والغدة الكظرية الفئران الشاهدة. أما فيما يخص إنزيم نزع السمية، فقد أظهرت النتائج ارتفاعا في التعبير عن إنزيم cyp1a1 في الغدة الكظرية والخصى بنسب (8.3، 4.7) للجرعة 25مكغ/كغ و (1.9، 1.5) للجرعة 50مكغ/كغ على التوالي بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة، حيث أن الجرعة 25 أكثر فعالية في التحفيز الإنزيمي من الجرعة 50مكغ/كغ. تشير نتائج

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

دراستنا الحالية إلى أن الديوكسين يؤثر على التعبير عن *CYP11A1/CYP1A1* بطريقة معتمدة على الجرعة.

تاريخ الإيداع: 2022/10/02
تاريخ الموافقة: 2022/12/12

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

الكلمات المفتاحية: الديوكسينات، الإنطاف، هرمون التستوستيرون، CYP11A1، CYP1A1، الغدة الكظرية، الخصية.

expression in testis Investigation of *CYP1A1/ CYP11A1* genes and adrenal gland of tetrachlorodibenzo-p- dioxin treated BALB/C adult mice male

Walaa yousef Faiad[1], Chadi Elias soukkarieh [2], Abdulsamie Mohamed hanano[3]

1.PHD student, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria
walaa8.faiad@damascus university.edu.sy
2. Assistant professor, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria
chadi.soukkarieh@damascus university.edu.sy
3Researches administrator, department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria ashanano@aec.org.sy

Abstract

Dioxins are among the persistent and widespread organic pollutants in the environment that negatively affect the spermatogenesis process in many organisms, through their ability to disrupt the synthesis of sex hormones necessary to complete this process in its natural form. Therefore, this research aimed to study the toxic effect of TCDD on the synthesis of testosterone in male BALB/C mice. To this end, eighteen adult male BALB/C mice were divided into 3 groups (6 mice in each group), the control (first) group was orally dosed with corn oil alone, the second group was dosed with 25 µg/kg of TCDD solved in corn oil, the third group was orally dosed with 50 µg/kg of TCDD. After a week, the mice were sacrificed and their adrenal and testes were isolated. The total mRNA of adrenal and testes tissues were isolated and their respective cDNA were synthetized. Gene expression changes of the most important enzymes involved in the dioxin-detoxification pathway, thecyp1a1, and the key enzyme in the T hormone synthesis chain, the cyp11a1, were studied using RT-qPCR. Our results showed the ability of dioxin to induce changes in the expression of cyp11a1 enzyme, where an increase of 3.4 and 8.6 times was observed in the testes and adrenals of mice dosed with 25 µg/kg of TCDD, respectively, while the dose of 50 µg/kg had inhibitory effect on the expression of this enzyme in the testes and adrenals, where the decrease was 1.7 and 2 times for the testes and adrenals, respectively, compared to the testes and adrenals of the control mice.

Regarding the dioxin detoxification, an increase in the expression of cyp1a1 enzyme in the testes and adrenal gland with percentages (8.3, 4.7) for the dose 25 µg/kg and (1.9, 1.5) for the dose 50 µg/kg, respectively, compared to the control group, where the dose 25 was more effective in Enzyme stimulation than dose 50. Thus, these data indicate that dioxin affects the expression of cyp1a1 and cyp11a1in a dose-dependent manner.

Keywords: Dioxins, spermatogenesis, testosterone hormone, *CYP11A1*, adrenal gland, *CYP1A1*, testis.

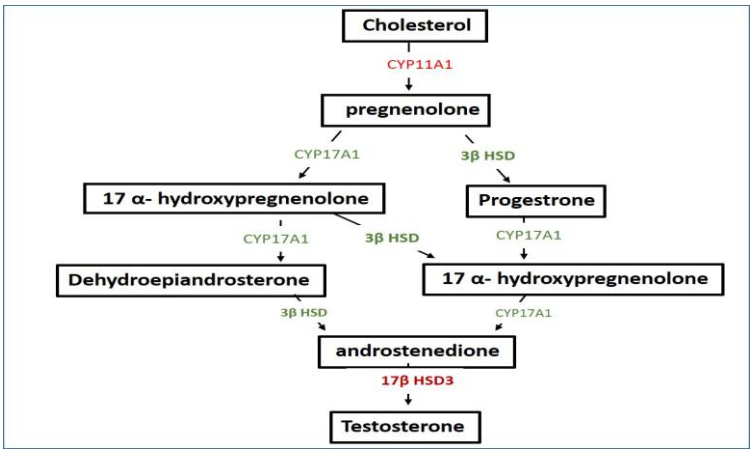
Received : 02/10/2022
Accepted:12/12/2022

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

المقدمة:

الإنطاف spermatogenesis هي عملية إنتاج الأعراس الذكرية ضمن النبيبات المنوية seminiferous tubules في الخصىtestis، وهي عملية معقدة تبدأ بعد البلوغ بتكاثر المنسليات النطفية spermatogonia لتعطي الخلايا النطفية الأولية Primary Spermatocytes والتي تنقسم الانقسام المنصف الأول تعطي بنتيجته الخلايا النطفية الثانوية Spermatocytes secondary التي تتحول بشكل مباشر إلى خلايا سليفة النطفة التي تطرأ عليها مجموعة من التمايزات لتتحول إلى النطفة القادرة على الإلقاح. يتم تنظيم هذه العملية من قبل العديد من العوامل ولعل أهمها العامل الصماوي، حيث يتم إفراز الهرمون المحرر للهرمونات المنبهة للغدة التناسلية Gonadotropin–releasing hormone (GnRH) والهرمون المحرر لموجهه القشر Corticotropin–Releasing hormone CRH من قبل الوطاء، حيث يحرض الأول الفص الأمامي للغدة النخامية على إفراز الهرمون الملوتن luteinizing hormone (LH) وهرمون المنبه للجريب Follicle-stimulating hormone (FSH) ويحرض CRH على إفراز الهرمون الموجه لقشر الكظر adrenocorticotropic hormone (ACTH) [1].

يساعد هرمون FSH على تنبيه الإنطاف من خلال ارتباطه بمستقبلاته النوعية في خلايا سرتولي، بينما يحفز هرموني ACTH وLH كلا من الغدة الكظرية وخلايا لايديغ في النسيج الخلالي الخصيوي على التوالي على إفراز هرمون التستوسترون، وهو الهرمون المسؤول عن نمو وتطور الجهاز التناسلي الذكري وظهور الصفات الجنسية الذكرية الثانوية بالإضافة إلى تحريض التشكل الطبيعي للنطاف. يتم اصطناع هذا الهرمون انطلاقا من مركب الكوليسترول داخل أغشية الجسيمات الكوندرية والشبكة السيتوبلاسمية الداخلية بوساطة مجموعتين من الإنزيمات وهي cytochrome p450 (cyp11a1) و إنزيم 3β-HSD ضمن الجسيمات الكوندرية وانزيمات تابعة لـ hydroxy steroid dihydrogenase ضمن الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية (CYP17A1, 3β-HSD, 17β-HSD3) [2] (الشكل. 1).



الشكل 1. مخطط يوضح مراحل اصطناع هرمون التستوستيرون انطلاقا من الكوليسترول وذلك بمشاركة مجموعة من إنزيمات cytochrome p450 وانزيمات hydroxy steroid dihydrogenase التي تتوسط تحويله إلى عدة مركبات وسطية انتهاء بهرمون التستوستيرون

يعتبر إنزيم cyp11a1 الإنزيم المفتاحي لسلسلة التفاعلات المؤدية لاصطناع هرمون التستوستيرون، ويتم التعبير عنه في النسج المنتجة للهرمونات الذكرية (بشكل أساس في الخصى والغدة الكظرية).

تتمثل المعايير المنظمة لعملية الإنطاف بالتحفيز الصماوي للخصى من خلال الهرمونات الستيروئيدية وهرمونات الوطاء والغدة النخامية وعوامل النمو والتعبير المنظم للمورثات في خلايا سرتولي والخلايا الجنسية وخلايا لايديغ بالإضافة إلى التأثرات الديناميكية بين خلايا سرتولي والمراحل التطورية المختلفة للنطاف، وبالتالي فإن الفشل في ضبط إحدى هذه المعايير أو اضطرابها سوف يؤدي بدوره إلى ضعف الإخصاب.

يشهد العالم في الآونة الأخيرة تزايدا ملحوظا في حالات ضعف الخصوبة، ويشكل العامل الذكوري حوالي 40–50% من هذه الحالات، والتي يمكن أن تعزى إلى أسباب عدة وأهمها نمط الحياة غير الصحي والتعرض البيئي والمهني للملوثات الكيميائية المنبعثة عن العمليات الصناعية أو الحوادث البيئية. ولعل من أبرز هذه الملوثات وأكثرها سمية مركبات الديوكسينات والتي صنفت من حيث الخطورة في المرتبة الثانية بعد المواد المشعة، وهي عبارة عن هيدروكربونات عطرية هالوجينية عديمة اللون والرائحة، محبة للدهون غير قابلة للانحلال في الماء بينما تكون منحلة في بعض المركبات العضوية كالبنزن والأسيتون والكلوروفوم، تنبعث الديوكسينات من حرائق الغابات ومخلفات المشافي والمخلفات الصناعية الحاوية على الكلور بالإضافة إلى مخلفات تبييض الورق [3؛ 4]، وتضم المواد الحاوية على إحدى مجموعتي دي بنزو بارا ديوكسين عديد التكلور Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) ودي بنزوفوران عديد التكلور Polychlorinated dibenzofurans (PCDF)، بالإضافة إلى مجموعة من المركبات الشبيهة بالديوكسينات الحاوية على مجموعة بيفينيل عديد التكلور Polychlorinated biphenyls (PCBs)، وتعد البنية رباعية الكلور منها 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) هي الأكثر خطورة بسبب صعوبة تدركها، الأمر

الذي يفسر عمر النصف الطويل لهذه المركبات داخل النسج الحية [5] والذي يقدر بحوالي 7 سنوات داخل جسم الإنسان [6]، مؤديا بذلك إلى تراكمها في الأعضاء المخزنة للدهون في الأسماك والطيور والثدييات.

تعتمد درجة سمية هذه المركبات على العديد من العوامل وأهمها نوع وجنس وعمر الكائن الذي يتعرض لها وطريقة التعرض بالإضافة إلى العامل الأهم وهو عامل الجرعة [7؛ 8]، حيث ترتبط الديوكسينات بمستقبلها السيتوبلاسمي المسمى Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) وهو عبارة عن عامل انتساخ سيتوبلاسمي يتجه بدوره إلى النواة محرضا انتساخ العديد من المورثات المرمزة لمجموعة من السيتوكرومات P450، وأهمها المورثة المسؤولة عن إنزيم CYP1A1 أو Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) ، وهو الإنزيم الذي يبتدئ سلسلة تحطيم الديوكسينات [9]. وتكمن سمية هذه المركبات من خلال قدرتها على إحداث تغيرات في التعبير المورثي والاستقلاب وعرقلة بعض السبل الإشارية بالإضافة إلى اضطرابات في النمو والتمايز وتحريض التسرطن [10؛ 11].

أظهرت العديد من الدراسات التي أجريت على العديد من مركبات الديوكسينات قدرتها على إحداث آضطرابات سمية شديدة على الجهاز التكاثري الذكري تمثلت بضمور الخصية والغدد التناسلية وانخفاض معدل الإنطاف وزيادة نسبة النطاف الشاذة وانخفاض قوتها الحركية و تغيرات أخرى على المستوى التعبير المورثي للعديد من المورثات المسؤولة عن نقل الكولسترول واصطناع هرمون التستوستيرون، بالإضافة إلى تغيرات على المستوى الكيميائي الحيوي والتي تتمثل بزيادة نسبة Reactive Oxygen Species (ROS) وتناقص الفعالية الإنزيمية المضادة للأكسدة [12–14].

أهمية البحث وأهدافه

أكدت أبحاث عديدة مدى خطورة الديوكسينات على الخصوبة عند الذكور وذلك من خلال ما تحدثه من اضطرابات هرمونية تؤدي بدورها إلى فشل عملية الإنطاف عند العديد من الكائنات. وبالاعتماد على ما أظهرته الدراسات من وجود ارتباط وثيق بين الاضطرابات الجنسية لدى الذكور والخلل في إنتاج الهرمون الذكري التستوستيرون فقد هدف هذا البحث إلى التحري عن التغيرات الانتساخية الناجمة في الإنزيمات المفتاحية في اصطناع هذا الهرمون ونزع سمية هذه المركبات عند ذكور الفئران BALB/C البالغة والمجرعة بالديوكسينات.

مواد البحث وطرائقه

حيوانات التجربة

أجريت هذه الدراسة على ذكور بالغة لفئران سلالة BALB/c في مختبرات حيوانات التجربة في قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية في هيئة الطاقة الذرية السورية، حيث تم انتخاب ذكور ناضجة في أوج بلوغها بعمر 10 أسابيع تراوحت أوزانها بين 22–25 غ، وخضعت جميعها

لظروف بيئية متماثلة بدرجة حرارة وفترة ضوئية متماثلة، كما تم تزويدها بالماء والعلف المناسب اللازم مع المحافظة على دورة ظلام/ إنارة (12سا) في درجة حرارة 25 م ودرجة رطوبة 40-60%.

وقسمت الذكور البالغة عدد 18 بشكل عشوائي إلى 3 مجموعات، حيث تم تجريع المجموعة الأولى وهي المجموعة الشاهدة بجرعة فموية (25مكل) من زيت الذرة فقط، بينما جرعت المجموعة الثانية بجرعة فموية (25مكل) من زيت الذرة الحاوي على مركب ديوكسين رباعي الكلور TCDD (SIGMA) بتركيز نهائي 25مكغ/كغ من وزن الكائن)، أما المجموعة الثالثة فقد جرعت بجرعة (25مكل) من زيت الذرة الحاوي على (TCDD بتركيز نهائي 50مكغ/كغ من وزن الكائن) ، وبعد 7 أيام من التجريع، تم وزن الحيوانات ومن ثم التضحية بها وعزلت الأعضاء التالية (الخصى، الغدة الكظرية) وتم غسلها بـ 0.9% من Nacl ووزنها وتجميدها مباشرة بالآزوت السائل والاحتفاظ بها في درجة -20 م لحين الاستخدام.

تحضير RNA من النسج وتحويله إلى cDNA

تم عزل الـ RNA باستخدام 1مل من Trizole لكل 50 مغ من نسج الخصى والغدة الكظرية بعد طحنها بالأزوت السائل ومن ثم إضافة 200مكل من الكلوروفورم والتثفيل لمدة 15د بسرعة xg12000، ومن ثم سحب الطور المائي واضافة 500 مكل من الإيزوبروبانول المطلق له لترسيب RNA والتثفيل بسرعة xg12000 لمدة 10د، بعد ذلك غسلت الرسابة بالإيثانول 75% وثفلت بسرعة xg7500 ليتم التخلص من الطافي ومن ثم تعليق الرسابة (RNA) في الماء الخالي من النوكلياز وحضنها في حمام مائي بدرجة حرارة 60°م لمدة 10د، وتخزين العينات في -80°م لحين الاستخدام.

وبعد التحضير تم حساب تركيز الـ RNA الذي تم الحصول عليه من خلال ضرب قيمة الامتصاصية (على طول موجة 260 نم) بمعامل الـ RNA وهو 40، رحلت كمية 1 ميكروغرام على هلامة أغاروز بتركيز 1% لمعرفة مدى نقاوة الـ RNA وما إذا كان تعرض للتدرك قبل الشروع في تحويله إلى cDNA. تم تحويل 5 مكغ من RNA إلى cDNA، باستخدام المرئسة Oligo(dt)$^{12-18}$، والإنزيم Reverse Transcriptase (sigma)، وأنجز التفاعل في حاضنة حرارية على الدرجة 37°م لمدة 55 دقيقة، أنهي التفاعل بعد ذلك برفع درجة الحرارة إلى 94°م لمدة 10د.

دراسة تغيرات التعبير المورثي باستخدام تفاعل qPCR

استخدم cDNA المحضر من النسج بحسب الخطوة السابقة في تفاعل بلمرة RT- qPCR لكل من المورثة المرجعية *B-ACTIN* هي مورثة لا يتغير تعبيرها المورثي بتغير الشروط التي تطرأ على الخلية) والمورثات الهدفية المرمزة لـ (CYP11A1 الإنزيم المفتاحي في اصطناع هرمون T في النسيج الخصيوي والغدة الكظرية ، وانزيم cyp1a1 المسؤول عن إزالة سمية

الديوكسينات) لكل من المجموعة الشاهدة والمجموعتين المعالجتين، أجري تفاعل التضخيم الكمي باستخدام الجهاز AriaMx Real-time PCR System من شركة Agillent technologies, USA، تضمن برنامج البلمرة فترة التمسخ الأولية Initial denaturation مدة 3 دقائق في الدرجة 95°م اتبعت هذه الخطوة بـ 35 دورة تفاعل بلمرة بحيث يتم في كل دورة (التمسخ Denaturation في الدرجة 94°م مدة 15 ثانية، الالتحام Annealing في الدرجة 58°م لمدة 45 ثانية، والاستطالة Extension في الدرجة 68°م مدة 1 دقيقة)، حيث تم إجراء التفاعل بثلاث مكررات ومن ثم قمنا بحساب التغير النسبي الكمي في التعبير عن هذه المورثات RQ (Relative Quantitative)في العينة المعالجة حسب المعادلة $RQ= 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، حيث حدد التغير في مستويات التعبير المورثي بالمقارنة مع المورثة المرجعية β actin. ويوضح الجدول 1 تسلسل المرئسات المستخدمة في تفاعل real time PCR.

الجدول 1: التسلسل النكليوتيدي للمرئسات التي تم استخدامها في التجربة

اسم المرئسة	رقم المورثة ضمن البنك المورثي	التسلسل النكليوتيدي للمرئسة	الطول
Actin-F	*β- actin* NM_007393.5	5'- TCCAGGCTGTGCTGTCCCTGT -3'	125bp
Actin-R		5'- ACGCAGGATGGCGTGAGGGA -3'	
cyp11a1-F	*CYP11A1* NM_019779.4	5'- CACTTCTGGAGGGAGAGTGGC -3'	140bp
cyp11a1-R		5'- AGTATCGACGCATCCTTGGGG -3´	
cyp1a1-F	*CYP1A1* NM_009992.4	5'- CCTGTGGTGGTGCTGAGCGG-3´	183bp
cyp1a1-F		5'- CAGGGCATTCTGGGCCAGGC-3´	

الدراسة الإحصائية

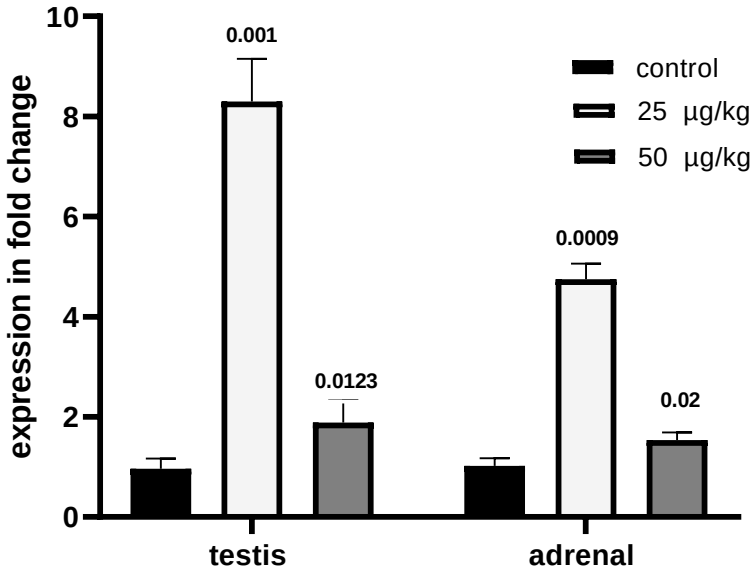
استخدم البرنامج Graph Pad prism 8 (USA) في الدراسة الإحصائية، إذ حللت الفروقات بين المجموعات التجريبية باستخدام اختبار student – T test، واعتبرت الفروقات معنوية عندما تكون قيمة $P <0.05$.

النتائج والمناقشة:

دراسة تغيرات التعبير المورثي

درس التغير النسبي الكمي في التعبير عن المورثة المرمزة لإنزيم cyp1a1 في كلا من الخصى والغدة الكظرية للفئران المجرعة بالتركيزين (25–50) مكغ/كغ من TCDD المسؤول عن نزع سمية هذا المركب. حيث بينت النتائج ارتفاعا في التعبير عن هذا الإنزيم بمقدار 8.3 ضعف و4.7 ضعف في كلا من الخصى والغدة الكظرية للحيوانات المجرعة بـ 25مكغ/كغ من TCDDعلى التوالي بالمقارنة مع الحيوانات الشاهدة، أما الحيوانات المجرعة بتركيز فقد كان الارتفاع ضئيلا بمعدل 1.9 ضعف و1.5 ضعف للخصى والغدة الكظرية على التوالي مقارنة مع الحيوانات الشاهدة (الشكل. 2). تم نسب التعبير المورثي للمورثة المرجعية *β ACTIN*

واعطاء التعبير المورثي في الحيوانات الشاهدة القيمة 1، كما تم التعبير عن النتائج بقيم المتوسطات ± قيم الانحراف المعياري، $p<0.05$*.

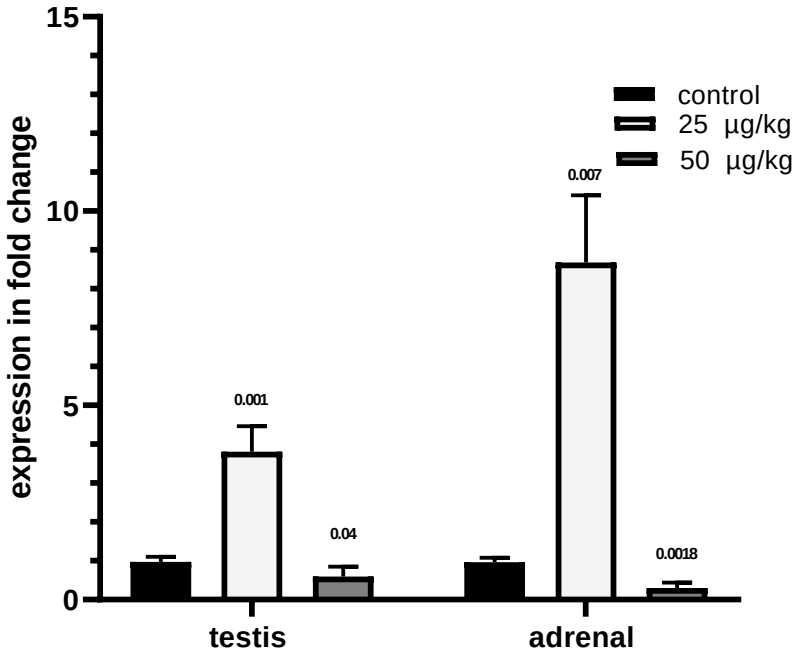


الشكل.2 تغير التعبير المورثي للمورثة *CYP1A1* في نسج الخصى والغدة الكظرية للفئران المعالجة بـ TCDD بالتركيزين (25–50) مكغ/كغ لمدة 7 أيام، تمت مقارنة التغير في التعبير المورثي مع المورثة المرجعية .*B-ACTIN*، عبر عن كمية التغير في التعبير المورثي بمرات الزيادة أو النقصان (expression fold change) بالمقارنة مع النسج الشاهدة وحسب المتوسط و نسبة الخطأ من مجموع ثلاثة تجارب مستقلة، تعبر الأرقام فوق الأعمدة عن قيم P value لكل تركيز.

يعد إنزيم cyp1a1 من الإنزيمات الهامة الخاصة بالطور الأول في استقلاب العقاقير والمواد الغريبة وأحد أهم المعلمات الحيوية في الاستجابات الخلوية الاستقلابية الذي يبتدئ سلسلة تحطيم الملوثات الهيدروكربونية العطرية كـ benzo[a]pyrene (BaP) ومركبات مجموعات الديوكسينات. حيث يؤدي التعرض لهذه المركبات إلى زيادة التعبير عن هذا الإنزيم لدى العديد من الأعضاء والخطوط الخلوية للإنسان والحيوانات المعرضة لمثل هذه الملوثات [15–17]، ، توافقت نتائج دراستنا مع الدراسات السابقة ، حيث لوحظ ارتفاعا في التعبير عن cyp1a1 في الخصى والغدة الكظرية في الجرعة 25مكغ/كغ من TCDD، والتي كانت أكثر كفاءة في تحريض انتساخ إنزيم نزع السمية من الجرعة 50مكغ/كغ الذي لم يبدي بدوره سوى ارتفاعا طفيفا، الأمر الذي من الممكن أن يعزى إلى أن التراكيز العالية من TCDD من الممكن أن تؤدي دورا تثبيطيا، وهذا ما تمت ملاحظته في دراسة أجريت على الكبد باستخدام جرعات عالية من مركب 3,3′,4,4′-tetrachlorodiphenyl (TCB) ومركب 3,3′,4,4′,5 pentachlorobiphenyl (PeCB) (من مجموعة الشبيهة بالديوكسينات) التي أدت إلى تثبيط التعبير عن هذا الإنزيم باستخدام الجرعات العالية مقارنة مع الجرعات الأخفض [18].

كما توافقت نتائج دراستنا مع دراسة أجريت على على خلايا سرتولي معزولة من خصى جرذ Sprague Dawley بالغ ومعالجة بـ TCDD بتراكيز تراوحت بين 2−2000 بيكوغرام/مل، حيث لوحظ ارتفاعا طرديا في التعبير عن هذا الإنزيم بزيادة التركيز إلا أن التركيز 2000 بيكوغرام/مل كان أقل فعالية في تحفيز التعبير عنه بالمقارنة مع التركيز 200 بيكوغرام/مل [19].كما أظهرت نتائج دراستنا اختلافا واضحا في استجابة الأعضاء للديوكسينات حيث أبدت الغدة الكظرية زيادة في التعبير عن إنزيم cyp1a1 في كلا التركيزين أكبر منها في الخصى، الأمر الذي يتوافق مع دراسات سابقة أن نسبة الاستجابة لهذه المركبات من حيث تفعيل إنزيمات نزع السمية تختلف باختلاف نوع النسيج أو الخط الخلوي التابعة المعرض لهذه المركبات [20].

وبالمثل تمت دراسة التغير في النسبة الكمية للتعبير عن المورثة المرمزة لإنزيم cyp11a1 المسؤول عن اصطناع هرمون T في كلا من الخصى والغدة الكظرية للفئران المجرعة بالتركيزين (25−50) مكغ/كغ من TCDD ، حيث أظهرت النتائج ارتفاعا في التعبير عن هذا الإنزيم بمقدار 3.4 و8.6 ضعف في كلا من الخصى والغدة الكظرية للحيوانات المجرعة بـ25 مكغ/كغ من TCDDعلى التوالي بالمقارنة مع الحيوانات الشاهدة، بينما كان. هناك انخفاض بمقدار1.7 و2 ضعف للخصى والغدة الكظرية في الحيوانات المجرعة بتركيز 50 مكغ/كغ مقارنة مع الحيوانات الشاهدة (الشكل.3)، تم نسب التعبير المورثي للمورثة المرجعية $\beta ACTIN$ واعطاء التعبير المورثي في الحيوانات الشاهدة القيمة 1، كما تم التعبير عن النتائج بقيم المتوسطات ± قيم الانحراف المعياري، $p<0.05$*.



الشكل. 3 تغير التعبير المورثي لمورثة *CYP11A1* المرتبطة باصطناع هرمون T في نسج الغدة الكظرية والخصى للفئران المعالجة بـ TCDD بالتركيزين (25–50) مكغ/كغ لمدة 7 أيام، تمت مقارنة التغير في التعبير المورثي مع المورثة المرجعية *BETA-ACTIN*، عبر عن كمية التغير في التعبير المورثي بمرات الزيادة أو النقصان (expression fold change) بالمقارنة مع النسج الشاهدة وحسب المتوسط ونسبة الخطأ من مجموع ثلاثة تجارب مستقلة ، تعبر الأرقام فوق الأعمدة عن قيم P value.

يلعب إنزيم cyp11a1 بالإضافة إلى دوره في الاصطناع الحيوي لهرمون التستوستيرون دورا رئيسيا في تطور ونمو الأجنة حيث أظهرت دراسة أجريت على فئران تم إسكات مورثة *CYP11A1* لديها عدم قدرتها على إنتاج الستيروئيدات وموتها بعد فترة قصيرة من الولادة، كما أنه أمكن إنقاذها بحقنها بالستيروئيدات، حيث أبدت الفئران أعضاء أنثوية خارجية مع وجود غدد جنسية ذكرية غير متطورة ، كما أن الأقنية الناقلة والبربخ والخصى بالإضافة إلى الغدة الكظرية قد تراجعت أحجامها، الأمر الدي يؤكد الدور المهم للإنزيم بشكل عام في تمايز الأعضاء الجنسية الداخلية [21].

وبالاعتماد على ما سبق، فقد ركزت العديد من الأبحاث على دراسة العلاقة بين تغيرات التعبير عن هذا الإنزيم لدى حيوانات التجربة أو خطوط خلوية معالجة ببعض الملوثات العضوية والمعادن الثقيلة وعلاقتها باضطراب اصطناع هرمون T من خلال تثبيط التعبير عن إنزيم cyp11a1 ، حيث أظهرت دراسة أجريت على فئران Kunming (KM) المجرعة فمويا بـ phenanthrene انخفاضا في التعبير عن إنزيم cyp11a1 في خصى الفئران المعالجة مقارنة بالحيوانات الشاهدة [22]. كما أظهرت دراسة Wu وزملائه قدرة مركب كلور الكادميوم على تثبيط التعبير عن إنزيم cyp11a1 في خصى جرذان Sprague-Dawley والتي حقنت بتركيز 1مغ/ كغ من كلور الكادميوم ضمن البريتوان [23]. كما أظهرت نتائج دراسة أخرى حول

تأثير Sodium Arsenic على خط خلوي سرطاني لخلايا لايديغ TM3 قدرة هذا المركب على تثبيط التعبير عن هذا الإنزيم [24]. أما فيما يخص تأثير الديوكسينات على التعبير عن هذا الأنزيم فقد أظهرت نتائج دراسة لـ Lai وزملائه حول أثر TCDD بتراكيز (0.2–2) نانوغرام/مل على خلايا لايديغ المعزولة من الجرذ Sprague–Dawley انخفاضا في التعبير عن إنزيم CYP11A1 حيث تتوافق هذه النتيجة مع دراستنا الحالية في الجرعة 50 فقط والتي أدت إلى انخفاض التعبير عن هذا الإنزيم[25].

كما توافقت نتائج الجرعة 50 مكغ/كغ من TCDD أيضا مع دراسة أخرى على فئران C57BL/6J التي حقنت ضمن البريتوان بالديوكسينات بجرعة 100مكغ/كغ والتي أظهرت انخفاضا في التعبير عن هذا الإنزيم في النسيج الخصيوي في الفئران المعالجة مقارنة مع الفئران الشاهدة [26]. أما فيما يخص نتائج التجريع بالجرعة 25 فقد كانت متعارضة مع الدراسات السابقة حيث كان لهذا الجرعة أثرا تحفيزيا في التعبير عن هذا الإنزيم، الأمر الذي من الممكن أن يفسر باختلاف نوع الاستجابة باختلاف تركيز الجرعة المستخدمة، كما تضاربت نتائجنا مع دراسة أجريت على خلايا لايديغ المعزولة من الفئران CD-1 والتي لم تبدي أي تغير في التعبير عن هذا الإنزيم بعد 6 ساعات من المعالجة بـ 25 نانومول من TCDD [27]، الأمر الذي من الممكن أن يعزى إلى اختلاف السلالة المدروسة بالإضافة إلى كون الدراسة الأخيرة كانت على خلايا معزولة في الزجاج *in vitro* وليست ضمن الجسم الحي *in vivo*.

أما فيما يخص الغدة الكظرية، فقد أظهرت نتائج دراستنا ارتفاعا في التعبير عن الإنزيم في الجرعة 25 وانخفاضا في الجرعة 50 [26] الأمر الذي تعارض مع نتائج دراسة Fukuzawa على الفئران C57BL/6J المحقونة ضمن البريتوان، حيث لم يبدي النسيج الكظري أي تغير في التعبير عن هذا الإنزيم، مقترحا بذلك الأثر النوعي السمي للديوكسين على النسيج الخصيوي فقط والذي يمكن أن يبرر باختلاف طريقة التجريع واختلاف السلالة المستخدمة في الدراسة.

وعلى النقيض من ذلك وباستخدام مركب Bisphenol A (BPA) (ملوث عضوي يؤثر سلبا أيضا على الإنطاف) فقد أظهرت الدراسة التي أجريت على خط خلوي سرطاني لخلايا كظرية Y1 قدرة هذا المركب على تحريض زيادة التعبير عن هذا الإنزيم بتراكيز منخفضة أقل من 1000 نانومول [28].

الخلاصة conclusions

أكدت دراستنا الحالية قدرة الديوكسين رباعي الكلور بالجرعتين (25–50) على إحداث تغيرات في انتساخ المورثة المرمزة لإنزيم cyp11a1 بطريقة معتمدة على الجرعة. حيث أن الجرعة المنخفضة نسبيا (25) مكغ/كغ من TCDD أظهرت قدرة على تحفيز التعبير عن الإنزيم المفتاحي لاصطناع هرمون التستوستيرون في الخصى لدى ذكور الفئران سلالة BALB/C المجرعة فمويا بهذا المركب، وبصورة مشابهة فإن الغدة الكظرية قد أظهرت تزيدا في التعبير عن cyp11a1 في الفئران المجرعة بـ 25 مكغ/كغ، بينما كانت الاستجابة معاكسة في خصى

وكظر الفئران المجرعة بجرعات مرتفعة 50مكغ/كغ من TCDD. حيث أبدت هذه الأعضاء انخفاضا في التعبير عن هذا الإنزيم.

كما أظهرت دراستنا ارتفاعا أكبر في انتساخ المورثة المرمزة لإنزيم cyp1a1 في النسيجين (الخصى والغدة الكظرية) المجرعة بالتركيز الأدنى (25) منه في التركيز الأعلى (50) بالمقارنة مع النسيجين السابقين للعينات الشاهدة، حيث أن التغير في التعبير عن هذا الإنزيم في الخصى والغدة الكظرية للفئران المجرعة بالجرعة 50 منTCDD كان طفيفا.

يمكن بالاعتماد على ما سبق التوجه في المراحل التالية إلى دراسة الأثر السمي لهذه المركبات على المستوى النسيجي للخصى والكشف عن التغيرات التي من الممكن أن تطرأ على بنية الأنابيب المنوية ونسبة الأنماط الخلوية الموجودة فيها، بالإضافة إلى تحري التغيرات الانتساخية والنسيجية التي ممكن أن تطرأ على الغدد الجنسية الملحقة بالجهاز الذكري كغدة البروستات والحويصل المنوي.

المراجع

[1] de Kretser, D.M., Loveland, K.A. and O'Bryan, M.K. (2016). Spermatogenesis. In Endocrinology: Adult & Pediatric (Elsevier), pp. 2325-2353.

[2] Zirkin, B.R. and Papadopoulos, V., 2018. **Leydig cells: formation, function, and regulation**. Biol Reprod, V. 99, No. 1, pp. 101-111

[3] Lohmann, R., Lee, R.G., Abbott, J., Coleman, P. and Jones, K.C., 2006. **Verifying emission factors and national POPs emission inventories for the UK using measurements and modelling at two rural locations**. J Environ Monit, V. 8, No. 1, pp. 79-88

[4] Pandelova, M., Stanev, I., Henkelmann, B., Lenoir, D. and Schramm, K.W., 2009. **Correlation of PCDD/F and PCB at combustion experiments using wood and hospital waste. Influence of (NH(4))(2)SO(4) as additive on PCDD/F and PCB emissions**. Chemosphere, V. 75, No. 5, pp. 685-691

[5] Leung, H.W., Kerger, B.D. and Paustenbach, D.J., 2006. **Elimination half-lives of selected polychlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans in breast-fed human infants**. J Toxicol Environ Health A, V. 69, No. 6, pp. 437-443

[6] Birnbaum, L.S., 1994. **The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment**. Environ Health Perspect, V. 102 Suppl 9, No. pp. 157-167

[7] Poland, A. and Knutson, J.C., 1982. **2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity**. Annu Rev Pharmacol Toxicol, V. 22, No. pp. 517-554

[8] Safe, S.H., 1986. **Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans**. Annu Rev Pharmacol Toxicol, V. 26, No. pp. 371-399

[9] Tang, N.J., Liu, J., Coenraads, P.J., Dong, L., Zhao, L.J., Ma, S.W., et al., 2008. **Expression of AhR, CYP1A1, GSTA1, c-fos and TGF-alpha in skin lesions from dioxin-exposed humans with chloracne**. Toxicol Lett, V. 177, No. 3, pp. 182-187

[10] McGregor, D.B., Partensky, C., Wilbourn, J. and Rice, J.M., 1998. **An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis**. Environ Health Perspect, V. 106 Suppl 2, No. pp. 755-760

[11] Huff, J., Lucier, G. and Tritscher, A., 1994. **Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence**. Annu Rev Pharmacol Toxicol, V. 34, No. pp. 343-372

[12] El-Gerbed, M.S., El-Saad, A.M.A. and Haussein, A.B., 2015. **2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin induced testicular toxicity in rats and the protective effect of quercetin: Biochemical, histopathological and immunohistochemical studies**. Journal of Applied Pharmaceutical Science, V. 5, No. 01, pp. 099-109

[13] Rune, G.M., de Souza, P., Krowke, R., Merker, H.J. and Neubert, D., 1991. **Morphological and histochemical pattern of response in rat testes after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**. Histol Histopathol, V. 6, No. 4, pp. 459-467

[14] Rune, G., Desouza, P., Krowke, R., Merker, H. and Neubert, D., 1991. **Morphological and histochemical effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on marmoset (Callithrix jacchus) testes**. Archives of andrology, V. 26, No. 3, pp. 143-154

[15] Bofinger, D.P., Feng, L., Chi, L.-H., Love, J., Stephen, F.D., Sutter, T.R., et al., 2001. **Effect of TCDD exposure on CYP1A1 and CYP1B1 expression in explant cultures of human endometrium**. Toxicological Sciences, V. 62, No. 2, pp. 299-314

[16] Ibrahim, M., MacFarlane, E.M., Matteo, G., Hoyeck, M.P., Rick, K.R., Farokhi, S., et al., 2020. **Functional cytochrome P450 1A enzymes are induced in mouse and human islets following pollutant exposure**. Diabetologia, V. 63, No. 1, pp. 162-178

[17] Shi, Z., Dragin, N., Galvez-Peralta, M., Jorge-Nebert, L.F., Miller, M.L., Wang, B., et al., 2010. **Organ-specific roles of CYP1A1 during detoxication of dietary benzo [a] pyrene**. Molecular Pharmacology, V. 78, No. 1, pp. 46-57

[18] Schlezinger, J.J. and Stegeman, J.J., 2001. **Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3, 3′, 4, 4′, 5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (Stenotomus chrysops)**. Aquatic toxicology, V. 52, No. 2, pp. 101-115

[19] Lai, K.P., Wong, M.H. and Wong, C.K., 2005. **Effects of TCDD in modulating the expression of Sertoli cell secretory products and markers for cell-cell interaction**. Toxicology, V. 206, No. 1, pp. 111-123

[20] Beedanagari, S.R., Taylor, R.T. and Hankinson, O., 2010. **Differential regulation of the dioxin-induced Cyp1a1 and Cyp1b1 genes in mouse hepatoma and fibroblast cell lines**. Toxicology letters, V. 194, No. 1-2, pp. 26-33

[21] Hu, M.-C., Hsu, N.-C., El Hadj, N.B., Pai, C.-I., Chu, H.-P., Wang, C.-K.L., et al., 2002. **Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1**. Molecular endocrinology, V. 16, No. 8, pp. 1943-1950

[22] Huang, J., Fang, L., Zhang, S., Zhang, Y., Ou, K. and Wang, C., 2021. **Long-term exposure to environmental levels of phenanthrene disrupts spermatogenesis in male mice**. Environmental Pollution, V. 285, No. pp. 117488

[23] Wu, X., Guo, X., Wang, H., Zhou, S., Li, L., Chen, X., et al., 2017. **A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis**. Scientific reports, V. 7, No. 1, pp. 1-11

[24] Taşçi, T., Eldem, V. and Erkan, M., 2019. **Sodium Arsenic Alters the Gene Expression of some Steroidogenic Genes in TM3 Leydig Cell**. Celal Bayar University Journal of Science, V. 15, No. 3, pp. 265-270

[25] Lai, K.P., Wong, M.H. and Wong, C.K., 2005. **Inhibition of CYP450scc expression in dioxin-exposed rat Leydig cells**. J Endocrinol, V. 185, No. 3, pp. 519-527

[26] Fukuzawa, N.H., Ohsako, S., Wu, Q., Sakaue, M., Fujii-Kuriyama, Y., Baba, T., et al., 2004. **Testicular cytochrome P450scc and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the mouse**. Mol Cell Endocrinol, V. 221, No. 1-2, pp. 87-96

[27] Naville, D., Rebourcet, D., Chauvin, M.-A., Vega, N., Jalabert, A., Vigier, M., et al., 2011. **Direct and indirect impact of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on adult mouse Leydig cells: an in vitro study**. Toxicology letters, V. 207, No. 3, pp. 251-257

[28] Lan, H.-C., Lin, I.-W., Yang, Z.-J. and Lin, J.-H., 2015. **Low-dose bisphenol A activates Cyp11a1 gene expression and corticosterone secretion in adrenal gland via the JNK signaling pathway**. Toxicological Sciences, V. 148, No. 1, pp. 26-34