

تتبع الأثر السمي لمركب TCDD على خصوبة الأجيال عند إناث فئران BALB/c من خلال دراسة التغيرات المورثية والهرمونية والنسجية في المبيض

نور بديع الضللي¹ شادي الياس سكرية² عبد السميع محمد هنانو³

¹ طالبة دراسات عليا - دكتوراه، جامعة دمشق، علم الجنين،

nour.aldelli@damascusuniversity.edu.sy

² أستاذ مساعد دكتور، جامعة دمشق، علم الجنين جزئي،

chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy

³ أستاذ دكتور، هيئة الطاقة الذرية، علم السموم، ashanano@oec.org.sy

الملخص

تصنف الديوكسينات ضمن الملوثات العضوية المعقدة الواسعة الانتشار في البيئة، ويُعد مركب TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) من أكثر الديوكسينات سمية لكونه شديد التراكم في النسيج الشحمية، حيث يعتبر تتبع الأثر السمي لهذه المركبات على خصوبة إناث الثدييات موضوعاً ذو أهمية كبيرة. في ظل الانتشار الواسع لهذه المركبات في البيئة السورية وندرة الدراسات التي توضح الآليات الجزيئية والسبل الشارئة والتغيرات الهرمونية والنسجية التي ترافق عملية تعرض الإناث إلى الديوكسينات والتي تحدث ضمن خلايا المناسل الأنثوية وما يرافقها من أثر على خصوبة إناث الأجيال اللاحقة، فقد هدف هذا البحث إلى دراسة الأثر السمي لمركب TCDD في إناث الجيلين (F1,F2) Feneration للفئران المعرضة بشكل غير مباشر، نتيجة التعرض الحلمي لأمهاتها (F0)، وذلك من خلال دراسة تغيرات التعبير المورثي لأهم المورثات المسؤولة عن الاستجابة للديوكسينات في خلايا المبيض باستعمال تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز الكمي في الزمن الحقيقي RT-qPCR. بالإضافة إلى التحري عن التغيرات الهرمونية لهرمون الإستراديول ومعايرته بالطرق المناعية، ودراسة التغيرات النسجية التي تطرأ على بنية المبيض عند الأجيال. حيث قمنا في هذه الدراسة بتجريب أمهات فئران في اليوم الثامن من حملها بجرعة فموية واحدة، بتركيز 50 مكغ/كغ من مركب TCDD، والحصول على الجيلين (F1,F2). بيّنت النتائج وجود فروقات في التعبير المورثي للعينات المدروسة لخلايا المبيض وذلك تبعاً لاختلاف الأجيال، حيث وجدنا ارتفاعاً في التعبير عن المورثة *CYP11A1* لدى إناث F1 وانخفاض التعبير عنها لدى إناث F2، كما لوحظ انخفاض التعبير عن المورثة *3βHSD 2* لدى المجموعات التجريبية من إناث الجيلين (F1,F2)، وارتفاع التعبير عن المورثة *CYP19A1* لدى المجموعات التجريبية في إناث الجيلين (F1,F2) مقارنة مع المجموعات الشاهدة. وهو الأمر الذي ارتبط مع ارتفاع تركيز هرمون الإستراديول لدى (F1,F2) من المجموعة التجريبية، أما نسيجياً لوحظ وجود تغيرات عديدة من أهمها ضمور في حجم

تاريخ الإيداع: 2022/10/26
تاريخ الموافقة: 2023/02/28



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

المبيض لدى إناث الجيل F2، وحدث التخر في طبقة الخلايا الحبيبية وانحلال الخلية البيضية والنواة من الجريبات المبيضية عند إناث الجيلين (F1,F2)، ووجود احتقان في الأوعية الدموية، كما لوحظ انخفاض نسبة الذكور/الإناث في F2 وخصوبة الجيلين (F1,F2)، حيث توصلت دراستنا إلى أن لمركب TCDD مقدرة على تغيير التعبير المورثي في المبيض لدى الأجيال المعرضة بشكل غير مباشر نتيجة التعرض الحلمي لأمهاتها لهذا المركب، وأن ارتفاع التعبير عن *CYP19A1* والذي ترافق مع ارتفاع هرمون الإستراديول وحدث التخر في العينات النسيجية قد يؤثر على تكاثر الخلايا الحبيبية وبالتالي يحدث اضطراباً في اصطناع الهرمونات الستيرويدية، الأمر الذي يؤدي في النهاية إلى اضطرابات في خصوبة أجيال إناث الفئران.

الكلمات المفتاحية: TCDD، المبيض، التعبير المورثي، الاستراديول، الأجيال.

Toxicological Effects of TCDD on Intergenerational Fertility in Female BALB/c Mice: Genetic, Hormonal and Histological determinants in the Ovary

Nour Badee Aldelli¹ Chadi Elias Soukkarieh²
Abdulsamie Mohammad Hanano³

⁽¹⁾ Ph.D. Student, Damascus University, nour.aldelli@damascusuniversity.edu.sy

⁽²⁾ Assistant Professor, Damascus University,
chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy

⁽³⁾ Professor, Syrian Atomic Energy Commission, ashanano@oec.org.sy

Abstract

Dioxins are among the widespread persistent organic pollutants in the environment, which negatively affect the formation of female gametes in mammals. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is one of the most toxic congeners of dioxins due to its high accumulation in adipose tissue. Investigating of the toxicological effects of dioxins on mammalian fertility is a topic of great importance. In light of the wide spread of these compounds in the Syrian environment and the limited number of studies that clarify the molecular mechanisms, the pathways, and the hormonal and histological changes resulting from the exposure to dioxins, which occur within the female gonad cells and the accompanying effect on the fertility of female generations, the aim of this research is to investigate the toxicological effects of TCDD in female mice of the two generations (F1, F2) exposed indirectly, as a result of gestational exposure of their

mothers to TCDD (F0). This implies the evaluation of gene expression of the most important genes responsible for the response to dioxins in ovarian cells, using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). In addition, the hormonal changes of estradiol were performed by immunological essay. Moreover, the histological changes in the ovaries of F1 and F2 generations was determined. In this study, mice mothers on the eighth day of their pregnancy was exposed to a single oral dose of TCDD of 50 mcg/kg. Mother mice were kept in standard conditions to obtain two generations (F1, F2). The results showed that there were differences in the gene expression of TCDD-exposed ovarian, according to generations, where we found an increase in the expression of *CYP11A1* in F1 females and a decrease in its expression in F2 females. While a decrease in the expression of *3βHSD 2* gene was detected in both generations (F1, F2), as well as a higher expression of *CYP19A1* gene was observed in females of both generations (F1, F2) compared to the control groups. This was hormonally related to a net raise in the level of estradiol in (F1, F2) of the experimental group, while histologically, several changes were observed, the most important of which were atrophy in the size of the ovary in females of the F2 generation, and the occurrence of necrosis in the layer of granular cells and the dissolution of the oocyte and the nucleus of the ovarian follicles in generations of (F1, F2). In addition, F1 of the experimental groups showed the presence of congestion in the blood vessels. The male/female ratio of F2 and the fertility of the two generations (F1, F2) also decreased. We concluded that TCDD has the ability to change gene expression in the ovaries of generations exposed indirectly as a result of pregnancy exposure of their mothers to this compound, and that the high expression of *CYP19A1*, which was associated with the rise of estradiol hormone, and the occurrence of necrosis in tissue samples, may affect the proliferation of granulosa cells, that lead to disrupt on the synthesis of steroid hormones, which ultimately leads to disturbances in the fertility of generations female mice.

Key words: TCDD, Ovary, Gene Expression, Estradiol, Generations.

Received :2022/10/26

Accepted:2023/02/28



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

المقدمة:

يعد مركب 2,3,7,8-رباعي كلورو ثنائي بنزو-بارا-ديوكسين (TCDD) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin من أكثر الديوكسينات سميةً كونه أحد المواد الكيميائية المخلة بعمل الغدد الصماء (EDCs) endocrine-disrupting chemicals (Karman *et al.*, 2012). تتبع مركبات الديوكسين من مصادرها إلى البيئة الهوائية والمائية والبرية، فمن الطرق التي يتعرض من خلالها البشر لمركب TCDD هي عن طريق تناول الأغذية الملوثة، وخاصة الحليب والأسماك واللحوم (Hurst *et al.*, 2000).

من المعروف أن أسلوب حياة الأم والتعرض للعوامل البيئية أثناء الحمل مهم لصحة نسلها، إذ إن التعرض خلال الأيام الحرجة من التطور الجنيني أثناء الحمل قد يؤدي إلى ضعف وظيفي وزيادة خطر الإصابة بالأمراض، وعواقب صحية أخرى طويلة الأجل لاحقاً في حياة النسل (Hanson & Gluckman, 2014; Schug *et al.*, 2013). حيث تشير الدراسات التجريبية إلى أن انخفاض الوظيفة الإنجابية إلى جانب الآثار السلبية للمركبات السامة كالديوكسينات على الأجيال اللاحقة، تتم في المقام الأول عن طريق سلالة الآباء Paternal germline تأتي هذه الآثار مصحوبةً بتغييرات وراثية في خلايا الحيوانات المنوية، بما في ذلك تغييرات في مثيلة أنماط الجينات المنتسخة. توفر هذه المعطيات النظر في احتمال التعرض للديوكسين في فترة زمنية حرجة (الحمل، الرضاعة، البلوغ) قد يشكل مفزاً نحو الحث على أحداث تغييرات وراثية وهرمونية ومورفولوجية في التخلق عبر الأجيال المتعددة (Viluksela & Pohjanvirta, 2019).

تشير الأدلة الوبائية في الحوادث البيئية البشرية إلى أن تعرض الآباء لمركب TCDD، يمكن أن يؤدي إلى انخفاض نسبة الذكور/الإناث في النسل، تعتبر نسبة الذكور إلى الإناث عند الولادة مستقرة نسبياً في مختلف سكان البشر، وهي حوالي 0.515 (حيث تشكل نسبة الذكور حوالي 51.5% من إجمالي المواليد) (Grech, 2014). لذلك تم اقتراح نسبة الجنس لأن تكون مناسبة للاستخدام كمعامل بسيط في مراقبة الصحة الإنجابية (Terrell *et al.*, 2011). كما تشير البيانات حول الآلية الجزيئية لعمل الديوكسينات وتأثيراتها السامة في كل من النماذج التجريبية وفي البشر إلى أن التغييرات التي يسببها الديوكسين تنتقل إلى الأجيال في الغالب عن طريق السلالة الذكورية بعد التعرض لها (Viluksela & Pohjanvirta, 2019)، لذلك من المفيد تضمين الديوكسينات في محاولة لتوضيح خصائص وأهمية التغييرات التي يحدثها عن طريق السلالة الأنثوية، فالغرض من هذا البحث هو التركيز على الوساطة الأمومية في تأثيرات الديوكسينات عبر الأجيال من خلال التعرض لمركب TCDD أثناء حمل الأنتى F0، لذا من الضروري النظر في العلاقة ما بين تغير التعبير المورثي والهرموني في عضو المبيض وتحديد ما إذا كانت هذه التأثيرات سوف تغير النمط الظاهري وتنتقل إلى الأجيال القادمة وبالتالي تأثيرها على نسبة الجنس وعلى الصحة الإنجابية وخصوبة الإناث. يتم اصطناع الهرمونات الستيروئيدية بشكل رئيسي في المبيض ضمن الخلايا الحبيبية والخلايا الغمدية المحيطة ببويضة الجريب الناضج (LaVoie & King, 2009). حيث يمكن أن يُغيّر TCDD بشكل مباشر من ستيروئيدية تلك الخلايا، ويكون هذا التغيير من خلال تأثيره على أنزيمات السيتوكروم ضمن المسار الستيروئيدي. إذ تعمل الأنزيمات المفتاحية CYP11A1 (Cytochrome P450 19A1)، CYP19A1 (CytochromP450 19)، 3βHSD2 (3-beta hydroxysteroid dehydrogenase 2)، P45011A1 الموجودة في الخلايا الغمدية على اصطناع الهرمونات الستيروئيدية (Karman *et al.*, 2012)، فنظراً لأهميتها في خلايا المبيض والضرورية لتحويل الكولسترول بواسطة بروتين ناقل ينظم انتقاله ضمن المقدرات الحيوية بكميات محددة يدعى بروتين StAR إلى هرمون البريغنينولون، ومن ثم البروجسترون وتحويله في النهاية إلى هرمون الاستراديول Estradiol (Guo *et al.*, 2007). فقد ركزت دراستنا على تتبع الأثر السمي لمركب TCDD في تغير التعبير المورثي لمورثات (CYP11A1, 3βHSD 2, CYP19A1) المرمزة للأنزيمات المذكورة أعلاه، وتغير هرمون الإستراديول، إضافةً إلى كشف أثره السمي نسيجياً ضمن خلايا المبيض وذلك في الجيلين F1 و F2. وبالتالي تأثيرها في خصوبة أجيال الإناث ذوات الأمهات المعرضة أثناء حملها لمركب TCDD.

مواد البحث وطرائقه:

المواد الكيميائية:

مركب TCDD من شركة (SUPLECO, USA, 10µg/ml in toluene)، تم حلّه في ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) ثم خُفّف بزيت الذرة. محلول Trizol من شركة Sigma، كاشف عمل إليزا خاص لمعايرة هرمون الإستراديول في دم الفئران -Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit For Estradiol (E2) من شركة (MYBioSource, USA).

حيوانات التجربة:

شملت الدراسة كعددٍ كلي 68 فأر مختبري (48 أنثى و20 ذكر للتزاوج)، من نوع Albino mouse سلالة BALB/c، وجميعها بعمر 12 أسبوع، ومتوسط وزن يُعادل (23 غرام). بعد أسبوع من التأقلم، تم تزاوج الإناث والذكور بنمط 1:2 ليلاً. وضمان الحمل من خلال ظهور سداة مهبلية، وتم عزل الإناث وتمييزها على أنها يوم الحمل GD0، جُرعت الفئران الحوامل F0 بجرعة فموية واحدة من مركب TCDD قدرها 50 مكغ/كغ في اليوم الثامن من الحمل، والتي تتزامن مع الفترة الحساسة التي يمكن أن يسبب فيها TCDD سمية على الإنجاب (Nelson, 2008)، وتم اختيار الجرعة بناءً على أدنى مستوى تأثير سلبي ملحوظ لـ (LOAEL) TCDD lowest-observed-adverse-effect level، هو 0.01 مكغ/كغ/يوم من الوظيفة الإنجابية للفئران، ومتوسط الجرعة المميته (مكغ/كغ = 20-100) (LD₅₀) (Gray Jr et al., 1997) بالمقابل تلقت المجموعة الشاهدة زيت الذرة، وتم اختيار الإناث من الجيل F1 بعمر 12 اسبوع بشكل عشوائي والتزاوج مع ذكور غير معاملة للحصول على الجيل F2، مع تجنب تهجين الأشقاء في جميع حالات التزاوج. وتم ذلك في وحدة انتاج 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: من أصل 48 أنثى (العدد الفعلي لإجراء التجربة)، أُخذت 8 إناث حوامل بعمر 12 أسبوع فقط لتجربتها حيث تم تجريب مجموعتين من الفئران، المجموعة الأولى ضمت 4 إناث في اليوم الثامن من الحمل كمجموعة تجريبية مُجرعة بجرعة فموية واحدة من مركب TCDD قدرها 50 مكغ/كغ، أما الثانية فهي مجموعة شاهدة ضمت 4 إناث في اليوم الثامن من الحمل مجرعة فقط بزيت الذرة.

ولإجراء التجربة على إناث الأجيال أُخذت 40 أنثى (بعمر 12 إسبوع) قُسمت إلى 4 مجموعات تضمنت كل مجموعة 10 فئران كالتالي:

- المجموعة التجريبية الأولى: إناث الجيل الأول (F1) لأمهات مُجرعة بمركب TCDD.
- المجموعة الشاهدة الثانية: إناث الجيل الأول (F1) لأمهات مُجرعه بزيت الذرة فقط.
- المجموعة التجريبية الثالثة: إناث الجيل الثاني (F2) لأمهات مُجرعة بمركب TCDD.
- المجموعة الشاهدة الرابعة: إناث الجيل الثاني (F2) لأمهات مُجرعه بزيت الذرة فقط.

- استخدمنا 24 فأر في استخلاص الحمض النووي الريبي (n = 6/مجموعة).

- استخدمنا 16 فأر لاستخلاص عضو المبيض وإجراء الدراسة النسيجية (n = 4/مجموعة).

تحديد طول مدة الحمل (Gestation Length (GL): تعد المدة الطبيعية لفترة الحمل عند إناث فئران سلالة Balb/c هي 20 يوم (Tesci et al., 2015). وعند تزاوج إناث F1, F2 مع الذكور، تم تحديد (GL) كالتالي: بعد وضع الإناث مع الذكور، فُحصت الإناث في الصباح التالي للكشف عن وجود انتقاعات (سدادات) الجماع في المهبل، وهي عبارة عن مني مُتجلط ولونها

أصفر وذات بنية صلبة، وذلك باستخدام مجس مكون من قضيب زجاجي، حيث تم وضع الإناث التي ثبتت عندها وجود انتقاعات الجماع في أقفاص فردية وتم اعتبار اليوم الذي يُكتشف فيه وجود انتقاع الجماع هو اليوم الأول للحمل (Murray et al., 2010). تم قياس المؤشرات التالية (Mocarelli et al., 2000):

1- نسبة الجنس: [100 * ذكور / (ذكور + إناث)] ، [100 * إناث / (ذكور + إناث)].

2- النسبة المئوية للإخصاب: نسبة الخصوبة % = [عدد الإناث الحوامل / عدد الإناث الكلي * 100]

3- الوزن النسبي لعضو المبيض: [وزن العضو / الوزن الكلي للجسم * 100]

- جمع أمصال الدم وعضو المبيض:

عند وصول الأجيال إلى عمر 12 اسبوع في جميع المجموعات، سُحبت عينات الدم من الحيوانات وذلك من القلب مباشرة، ووضعت في أنابيب، ثم أُدخلت في جهاز الطرد المركزي (3000 دورة في الدقيقة، 15 دقيقة عند 4 درجات مئوية)، وتم جمع الأمصال لقياس تركيز الهرمون (عدد الأمصال 24 لقياس تركيز الهرمون $n = 6$ /مجموعة).

ومن ثم سُرحت الفئران وأُستخرج عضو المبيض (الأيمن والأيسر) منها، ووزنت بميزان الكتروني وتم تثبيت عينات المبيض بالفورمالين بتركيز 10% لغرض الدراسة النسيجية، بينما حُفظت عينات المبيض أخرى بالأزوت السائل لغرض الدراسة الجزيئية عليها.

- تقدير هرمون الأسترايول في المصل Estradiol:

حُدثت مستويات هرمون الإسترايول في المصل ($n = 6$ /مجموعة) عن طريق كاشف عمل تجاري إلبيزا خاص لمعايرة هرمون الإسترايول E2 الخاصة بالفئران من شركة (MYBioSource, USA). باستخدام المقايسة المناعية الأنزيمية التثبيطية التنافسية The Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay technique، وحُلل طبقاً لتعليمات الشركة الصانعة. حيث تم اتباع الخطوات التالية:

يوجد عدد من الصفيحات المايكروسكوبية في الحامل الحاوي على الحفر. أُضيف 50 ميكرو لتر من العينة والمحلل القياسي في الحفر. ثم أُضيف 50 ميكرو لتر من محلول الكاشف (Estradiol Biotin) A. رُجبت الصفيحات الرقيقة وتم تغطيتها لمدة 60 دقيقة بدرجة حرارة $37^{\circ}C$. ثم غُسلت المحتويات في كل الحفر ثلاث مرات بمحلول الغسيل Wash Solution 350 ميكرو لتر، وأُضيف 100 ميكرو لتر من محلول الكاشف (Avidin with HRP) B، رُجبت الصفيحات الرقيقة بلطف وتم تغطيتها لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة $37^{\circ}C$.

ثم غُسلت المحتويات في كل الحفر خمس مرات بمحلول الغسيل Wash Solution 350 ميكرو لتر. أُضيف 90 ميكرو لتر من محلول الأساس Substrate Solution لكل حفرة. تم تغطيتها لمدة 10-20 دقيقة بدرجة حرارة $37^{\circ}C$. ثم أُوقِفَ التفاعل الأنزيمي في كل الحفر بإضافة 50 ميكرو لتر من المحلول المخصص لإيقاف التفاعل Stop Solution. أخيراً تم قياس الامتصاصية في كل حفرة تحت طول موجي 450 نانومتر مباشرةً.

. الدراسة النسيجية: أُستخدم 16 فأر لاستخلاص عضو المبيض وإجراء الدراسة النسيجية ($n = 4$ /مجموعة) أُزيلت المبايض من الفئران من المجموعات التجريبية والشاهدة ووزنت قبل الفحص النسيجي. بعد القطع في أطول بُعد طولي، تم تثبيت أنسجة المبيض في الفورمالين 10% لمدة 24 ساعة. ثم تنظيف جميع العينات وتجفيفها ودمجها في البارافين وفقاً لطريقة Mescher method (Mescher & Junqueira, 2013). حيث تم تحضير مقطع بسمك أربع ملليمترات باستخدام مشرحاً وملون الهيماتوكسيلين والإيوزين. تم استخدام مجهر ضوئي بتكبير (10x, 20x, 40x) وتقييم جميع العينات وفقاً لتوصيات جمعية علم أمراض السموم في اتباع نهج تقييم مبيض القوارض في دراسات السمية العامة أو السمية الإنجابية

(Atis et al., 2012; Ergenoglu et al., 2015). فُحصت جميع الشرائح النسيجية، كما تم تقييم وإحصاء الجريبات بمراحلها المختلفة (ابتدائية، أولية، ثانوية، ناضجة، الجسم الأصفر، والرتقية). لكل مجموعة. وحُدثت التغيرات الشكلية (زيادة عدد

الجريبات الرتقية، انخفاض أعداد الجريبات والجسم الأصفر، النخر، انحلال الخلية البيضية والأنوية ضمور المبيض) وفقاً لطريقة (STP Ovary Evaluation Working Group, Regan, 2005).

- استخلاص الرنا الكلي RNA total من المبيض وتحويله إلى دنا متمم cDNA وإجراء تجارب (RT-PCR) بالزمن الحقيقي: أُستخدم 24 فأر في استخلاص الحمض النووي الريبي (n = 6/ مجموعة) إذ أنجزت 3 مكررات لكل فأر في اختبار التعبير المورثي للمورثات الهدف لجميع الفئران في المجموعات الأربع. حيث استُخلص الرنا الكلي RNA total من نسيج المبيض باستخدام محلول Trizol وفقاً لطريقة (Macedo & Ferreira, 2014) من ثم قيس تركيزه بواسطة جهاز النانودروب (Nano Drop technologies, Qiagen, Germany). وُصممت البادئات النوعية للمورثات الهدف (CYP11A1, 3βHSD 2, CYP19A1)، والمورثة المرجعية β-actin وذلك بالعودة إلى قاعدة البيانات NCBI، والتسلسلات موضحة في الجدول 1. ومن ثم حُصِر الدنا المتمم cDNA بدءاً من الرنا النقي بواسطة كاشف العمل (M-MLV Reverse Transcriptase, SIGMA, USA). وُدرس التعبير المورثي للمورثات الهدف، باستعمال كاشف العمل (SYBR Green-PCR Kit, QIAGEN, Germany). وحُصِر 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 qPCR System. Agilent technologies USA) لمدة 40 دورة، ودرجة حرارة تهجين 58 درجة مئوية، أتبع التفاعل بإنجاز منحنى الانصهار لضمان تجانسية منتج PCR.

الجدول 1: التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في هذه الدراسة.

Gene name	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
β-actin	5'-AAGGCCAACCGTGA AAAAGAT-3'	5'-TGGTACGACCAGAGGCATAC-3'
CYP11A1	5'-CACTTCTGGAGGGAGAGTGGC-3'	5'-AGTATCGACGCATCCTTGGGG-3'
3βHSD 2	5'-TGCCAGGGCATCTCTGTTGT-3'	5'-AGAGTTGGGCCCTGCAACAT-3'
Cyp19A1	5'-ATGCTGATTGCAGCCCCTGA-3'	5'-GGCTGGTACCGCATGCTTTC-3'

تم تحليل منحنيات الانصهار بواسطة برمجية خاصة. وحسب المتوسط الحسابي لقيم Cycle threshold (Ct) للمكررات الثلاثة وللحيوانات الست، وحُسب التغير النسبي في التعبير الكمي Relative Quantification (RQ) لعينات المجموعة التجريبية للجيلين (F1,F2) وما يقابلها من العينات للمجموعات الشاهدة كلاً على حدة وذلك من خلال العلاقة: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

الدراسة الإحصائية:

تم تحليل جميع العينات باستخدام البرنامج الإحصائي **GraphPad prism9**، وحساب القيمة الاحتمالية (p-value) باتباع النمط One-way ANOVA-Ordinary، حيث تبين لدينا القيم التالية لمعامل p-value كما موضح في الجداول رقم (2, 3, 4, 5)

الجدول 2: قيم p-value في المجموعات المدروسة من تغير التعبير المورثي ومعايرة هرمون E2.

E2 Hormone ELISA	CYP19A1 RT-PCR	3βHSD 2 RT-PCR	CYP11A1 RT-PCR	p-value
0,0001	0,0076	0,0290	0,0131	F1
0,0004	0,0191	0,0417	0,0100	F2

الجدول 3: يوضح قيم p-value في المجموعات المدروسة لعدد الجريبات المبيضية.

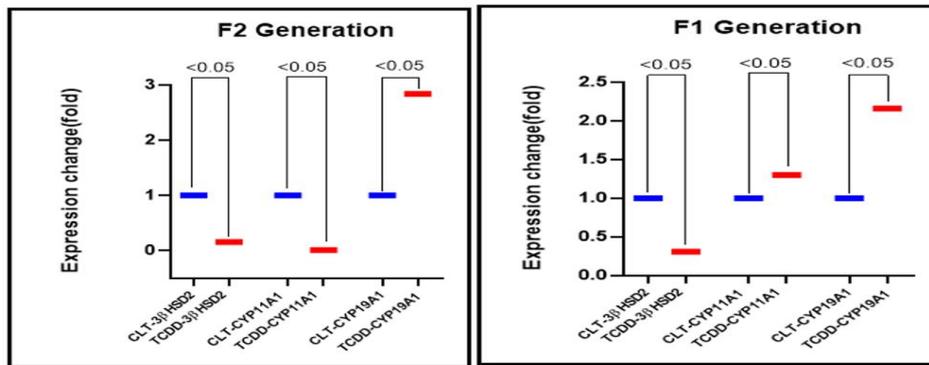
Corpus Lutium	Graafian follicles	Secondary follicles	Primary follicles	Primordial follicles	Number of follicles p-value
0.0535	0,0572	0,0663	0,0581	0,0027	F1
0,0006	0,0082	0,0028	0,0231	0,0032	F2

الجدول 4: يوضح قيم p-value في المجموعات المدروسة من نسبة الجنس ونسبة الخصوبة ووزن المبيض وطول مدة الحمل ومعدل الخصوبة العام.

General fertility Rate	Gestation Length	Ovary Weight	Gender Rate	p-value
0,0010	0,0163	0,0664	0,0625	F1
0,0136	0,0125	0,0034	0,0010	F2

النتائج:

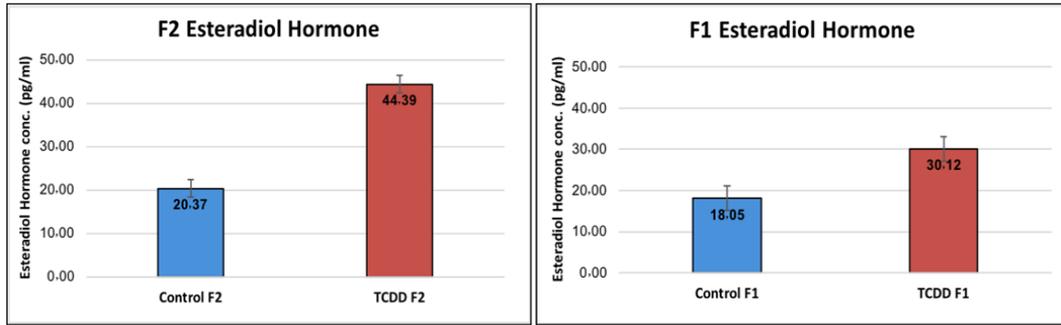
تغير التعبير المورثي للمورثات (*CYP11A1*, *3βHSD 2*, *CYP19A1*) في مبيض F1 و F2. بيّنت نتائج اختبار التعبير المورثي لدى إناث الجيل F1 ارتفاعاً معنوياً في التعبير المورثي للمورثتين (*CYP11A1*, *CYP19A1*) في عينات المبيض لدى المجموعة التجريبية F1 مقارنةً مع مجموعة الشاهد F1 وكانت الفروقات معنوية ($p < 0.05$). لكن انخفض التعبير المورثي للمورثة *3βHSD 2* في إناث الجيل F1 مقارنةً مع مجموعة الشاهد ($p < 0.05$) الشكل 1 يميناً. بيّنت نتائج اختبار التعبير المورثي لدى إناث الجيل F2 انخفاضاً في التعبير المورثي للمورثتين (*CYP11A1*, *3βHSD 2*) في عينات المبيض لدى المجموعة التجريبية F2 مقارنةً مع مجموعة الشاهد F2. لكن ارتفع التعبير المورثي للمورثة *CYP19A1* مقارنةً مع مجموعة الشاهد F2 وكانت جميع الفروقات معنوية ($p < 0.05$) الشكل 1 يساراً.



الشكل 1. مخطط يوضح الفروقات النسبية RQ في التعبير المورثي للعينات المدروسة عند إناث (F1, F2). حيث يمثل المحور Y لوغاريتم قيم RQ للمورثات الهدف لعينات المبيض. في الشكل الأيمن الجيل F1، تظهر الفروقات واضحة في ارتفاع التعبير عن المورثتين (*CYP11A1*, *CYP19A1*) في عينات المبيض ونسبة ($CYP11A1 = [1,30]$, $CYP19A1 = [2,16]$)، بينما انخفض التعبير عن المورثة *3βHSD 2* بنسبة [0,31] لدى المجموعات التجريبية من F1 مقارنةً مع مجموعة الشاهد والذي نسبته دائماً هي (1). في الشكل الأيسر الجيل F2، تظهر الفروقات واضحة في انخفاض التعبير عن المورثتين (*CYP11A1*, *3βHSD 2*) ونسبة ($CYP11A1 = [0,015]$, $3βHSD 2 = [0,16]$)، لكن ارتفع التعبير عن المورثة *CYP19A1* بنسبة [2,84] لدى المجموعات التجريبية F2 مقارنةً مع مجموعة الشاهد F2.

نتائج اختبار هرمون الإستراديول (E2) لإناث الجيلين (F1, F2).

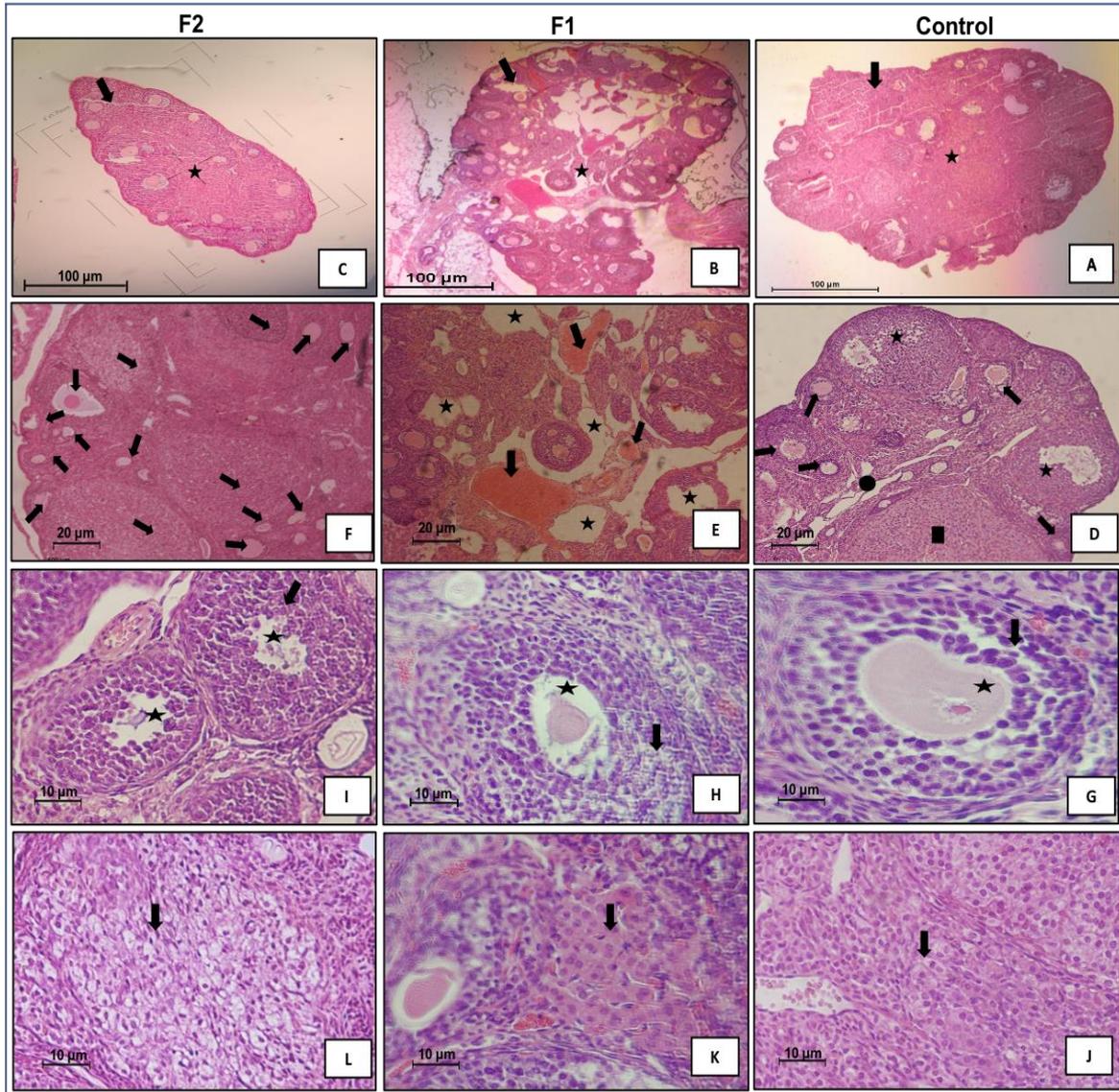
بينت النتائج بعد إجراء اختبار الإليزا الخاص بهرمون الإستراديول في عينات مصل دم الفئران للمجموعات التجريبية والشاهدة، ارتفاعاً معنوياً في هرمون الإستراديول في المجموعات التجريبية لدى إناث الجيلين (F1, F2)، مقارنةً مع انخفاضه في المجموعات الشاهدة لدى إناث الجيلين وكانت جميع الفروقات معنوية ($p < 0.05$) الشكل 2.



الشكل 2. مخطط بياني يوضح الفروقات النسبية في عينات مصل دم الفئران للمجموعات التجريبية والشاهدة، حيث يظهر ارتفاعاً في هرمون الإستراديول في المجموعات التجريبية لدى إناث (F1,F2)، بينما انخفض في المجموعات الشاهدة لدى إناث (F1,F2).

تأثير مركب TCDD على البنية النسيجية في المبيض للجيلين F1 و F2:

فُحصت الشرائح المجهرية تحت المجهر الضوئي بتكبير (40x, 10x, 4x) لتحديد التغيرات النسيجية في المبيض. حيث لوحظ وجود تغيرات نسيجية عديدة من أهمها احتقان في الأوعية الدموية ووجود بنى فراغية في النسيج الضام من المنطقة الداخلية أو اللبية الشكل 3 E لدى إناث F1 من المجموعة التجريبية مقارنة مع المجموعة الشاهدة. كما أظهرت نتائجنا ضمور في حجم المبيض الشكل 3 C ووجود عدد كبير من الجريبات الرتقية الشكل 3 F لدى إناث F2 من المجموعة التجريبية مقارنة مع المجموعة الشاهدة. وعند التكبير 40x تبين حدوث التخر في طبقات الخلايا الحبيبية وانحلال الخلية البيضية والنواه من الجريبات المبيضية عند إناث (F1,F2) من المجموعة التجريبية مقارنة مع الشاهدة الشكل 3 (H, I). وفي خلايا النسيج الضام الذي يدعى اللحمية أو السدى المُكون من الأرومات الليفية في المنطقة القشرية لوحظ وجود خلايا غير طبيعية في F1. وفراغات في النسيج الضام عند F2 الشكل 3 (K, L).



الشكل 3. مقاطع نسيجية في مبيض إناث بالغة لدى المجموعات (Control, F1, F2) بتكبير (4x, 10x, 40x) صبغة (E & H)، بعدسة عينية واحدة (4*5"/Norm).

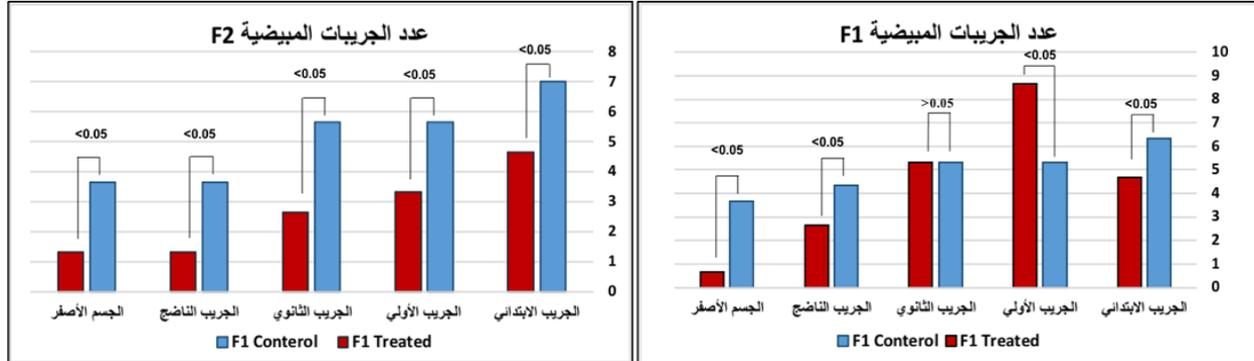
(A, B, C) مقاطع نسيجية بتكبير 4x توضح المقارنة في حجم المبيض، وتظهر بنية نسيج المبيض من منطقة محيطية (القشر) كما مؤشر في الأسهم والمنطقة المركزية (اللب) كما مؤشر بشكل النجمة. A مبيض لأنثى شاهدة يوضح بنية المبيض وحجمه. B مبيض لأنثى من F1 يوضح اضطراباً في بنية المبيض النسيجية. C مبيض لأنثى من F2 يوضح ضموراً في حجم المبيض.

(D, E, F) مقاطع نسيجية بتكبير 10x توضح المقارنة في بنية المبيض. D مبيض لأنثى شاهدة يشير المربع إلى الجسم الأصفر والأسهم إلى الجريبات الابتدائية والثانوية والنجمة إلى الجريبات الناضجة في منطقة قشر المبيض، والدائرة إلى منطقة لب المبيض بشكلها الطبيعي. E مبيض لأنثى F1 يشير السهم إلى وجود احتقان في الأوعية الدموية والنجمة إلى وجود بنى فراغية في النسيج الضام من منطقة لب المبيض. F مبيض لأنثى F2 يشير السهم إلى وجود عدد كبير من الجريبات الرتقية.

(G, H, I) مقاطع نسيجية بتكبير 40x توضح المقارنة في بنية الجريبات المبيضية. G مبيض لأنثى من شاهدة يشير السهم لشكل الخلايا الحبيبية والنجمة إلى الخلية البيضية وبداخلها النواة. H مبيض لأنثى F1 يشير السهم إلى وجود تنخر في الخلايا الحبيبية والنجمة إلى انحلال في الخلية البيضية وغياب النواة من الجريب. I مبيض لأنثى F2 حيث يظهر لدينا انخفاض في حجم الجريب مقارنة مع حجمها في انثى الشاهد كما يشير السهم إلى انحلال في الخلية البيضية وغياب النواة من الجريب.

(J, K, L) مقاطع نسيجية بتكبير 100x توضح المقارنة في خلايا النسيج الضام. J مبيض لأنثى شاهدة يشير السهم لشكل الأرومات الليفية الطبيعية داخل النسيج الضام. K مبيض لأنثى F1 يشير السهم إلى تشكّل خلايا غير طبيعية في النسيج الضام ما بين الجريبات المبيضية. L مبيض لأنثى F2 حيث يظهر لدينا وجود فراغات بين خلايا النسيج الضام ما بين الجريبات المبيضية.

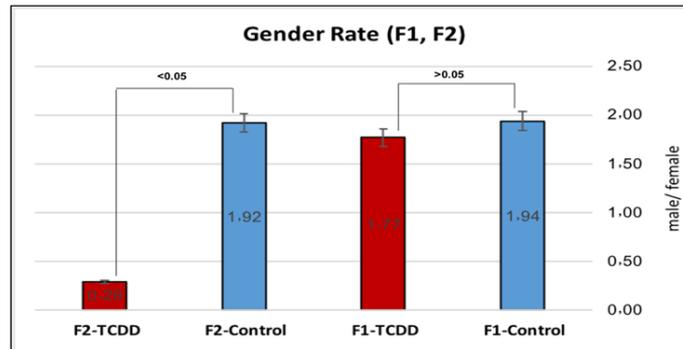
تأثير مركب TCDD على عدد الجريبات المبيضية: أظهرت نتائجنا انخفاضاً معنوياً في عدد الجريبات الابتدائية والناضجة والجسم الأصفر عند إناث F1, F2 ($p \leq 0.05$)، لكن ارتفع عدد الجريبات الأولية في إناث F1، وانخفض عدد الجريبات الأولية والثانوية في مبيض إناث F2 ($p \leq 0.05$) من المجموعات التجريبية مقارنةً مع الشاهدة كما موضح في الشكل 4.



الشكل 4. مخطط بياني يوضح الفروقات النسبية في عدد الجريبات المبيضية لدى الجيلين (F1, F2). يظهر انخفاضاً في عدد الجريبات الابتدائية والناضجة والجسم الأصفر عند مبيض إناث F1, F2، وارتفاع عدد الجريبات الأولية في مبيض إناث F1، وانخفاض عدد الجريبات الأولية والثانوية في مبيض إناث F2 من المجموعات التجريبية مقارنةً مع الشاهدة.

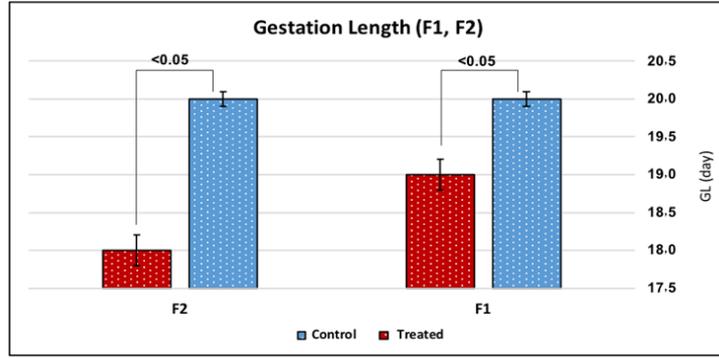
تأثير TCDD على نسبة الجنس Gender Rate في F1 و F2

تم حساب نسبة الجنس لدى جميع المجموعات الشاهدة والتجريبية في (F1, F2) بعد أخذ المتوسط حسابي لمجموع العائلات في كل جيل (4 عائلات لكل جيل) واعتماداً على المعادلة التالية في حساب نسبة الجنس $[100 * \text{ذكور} / (\text{ذكور} + \text{إناث})]$ ، $[100 * \text{إناث} / (\text{ذكور} + \text{إناث})]$ ، بينت نتائجنا في الجيل F1 انخفاضاً غير معنوي في نسبة الذكور/الإناث ($p > 0.05$) لدى المجموعة التجريبية من الجيل F1، وذلك بنسبة (Control: 1,94 و TCDD: 1,78). بينما أظهرت نتائجنا لدى الجيل F2 انخفاضاً معنوياً في نسبة الذكور/الإناث من المجموعة التجريبية ($p < 0.05$) بنسبة (Control: 1,92 و TCDD: 0,29) الشكل 5.



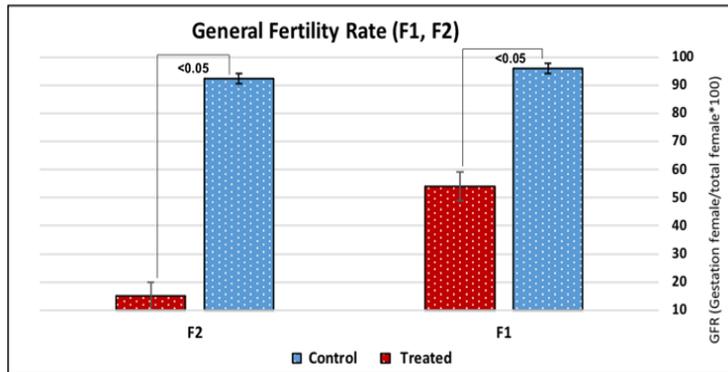
الشكل 5. مخطط بياني يوضح الفروقات النسبية في نسبة الجنس (الذكور/الإناث) لدى الجيلين (F1, F2). يظهر انخفاضاً غير معنوي في نسبة الذكور/الإناث من المجموعة التجريبية. بينما انخفضت نسبة الذكور/الإناث بشكل معنوي في المجموعة التجريبية F2.

تأثير TCDD على طول مدة الحمل Gestation Length (GL): لم تتأثر إناث F0 المعاملة بـ TCDD في اليوم 8 من الحمل على طول مدة الحمل. لكن عند تزواج إناث الجيل F1 (التي تعرضت وهي في الرحم) مع الذكور، نقصت طول فترة حمل إناث الجيل F1 (Control 20 days, TCDD 19 days) وبالتالي حدثت الولادات المبكرة preterm births وكانت الفروق معنوية ($p < 0.05$). وعند تزواج إناث الجيل F2 مع الذكور نقصت طول مدة الحمل أيضاً إلى (Ctr 20 days, TCDD 18 days) ($p < 0.05$) الشكل 6.



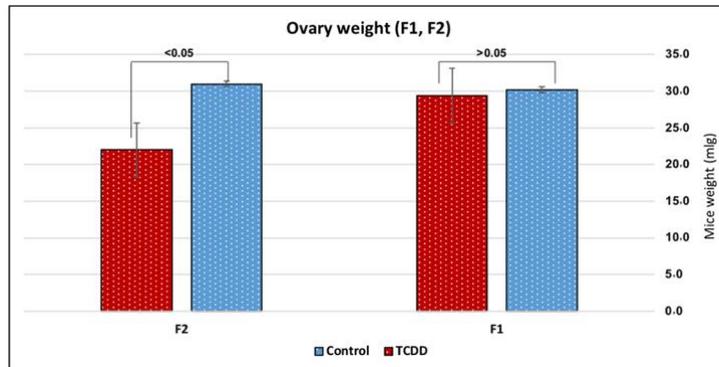
الشكل 6. مخطط بياني يوضح الفروقات النسبية في طول مدة الحمل لدى الجيلين (F1,F2). يظهر انخفاض مدة الحمل لدى الجيلين (F1,F2) من المجموعة التجريبية مقارنةً مع طول مدة حمل المجموعات الشاهدة.

- تأثير TCDD على نسبة الخصوبة (GFR): بينت نتائجنا انخفاضاً في خصوبة الجيل F1 بنسبة (54% فقط من الإناث أصبحت حاملاً) وكانت الفروق معنوية ($p < 0.05$), كما انخفضت خصوبة الجيل F2 من المجموعة التجريبية بشكل أكبر بنسبة (15% فقط من الإناث أصبحت حاملاً) وكانت الفروق معنوية ($p < 0.05$) الشكل 7.



الشكل 7. مخطط بياني يوضح الفروقات النسبية في نسبة الخصوبة لدى الجيلين (F1,F2). يظهر انخفاض خصوبة الجيلين (F1,F2) من المجموعة التجريبية مقارنةً مع نسبة خصوبة المجموعات الشاهدة.

- تأثير TCDD على وزن المبيض (Ovary weight): بينت نتائجنا انخفاضاً معنوياً في وزن المبيض ($p < 0.05$) لدى إناث الجيل F2 فقط، مقارنةً مع وزنه لدى إناث المجموعة الشاهدة. الشكل 8.



الشكل 7. مخطط بياني يوضح الفروقات النسبية في وزن المبيض لدى الجيلين (F1,F2). يظهر انخفاضاً معنوياً فقط لدى الجيل F2 فقط مقارنةً مع وزنه لدى المجموعة الشاهدة.

المناقشة:

ركزت دراستنا على تتبع الأثر السمي لمركب الديوكسين رباعي الكلور (TCDD) في تغير التعبير المورثي لمورثات (*CYP11A1*) في الأجيال اللاحقة، وذلك نظراً لأهمية تلك المورثات في مسار الاصطناع الحيوي للهرمونات الستيرويدية في خلايا المبيض، وبالتالي تأثيرها على خصوبة الإناث، حيث تعمل الأنزيمات المصنعة للستيرويدات، كما هي حال عائلة السيتوكروم P450CYP، على تحفيز عملية التمثيل الغذائي للكولسترول لتشكيل هرمونات الستيرويد (Lan et al., 2015) إذ أن الخطوة الأولى المحددة لمعدل تحفيز تكوين الستيرويد تتم من خلال أنزيم P450scc المُرمز بواسطة المورثة *CYP11A1*. يكون التعبير عن هذه المورثة بمستوى عال في الخلايا الغمدية الأمر الذي يحفز تطور الجريبات النامية في المبيض، وهي ضرورية لتحويل الكولسترول إلى هرمون البريغنينولون (Guo et al., 2007)، حيث أظهرت نتائجنا ارتفاعاً في التعبير عن المورثة *CYP11A1* لدى F1، لكن على النقيض من ذلك، لوحظ انخفاضاً في التعبير عن المورثة *CYP11A1* لدى F2 من المجموعات التجريبية، وهذا ما أثبتته دراسة على الجرذان Sprague-Dawley (SD) تم فيها معاملة الأمهات بمركب TCDD أثناء الحمل في اليوم GD13 بجرع فموية متزايدة وهي (0, 0.04, 0.2, 1 مكغ/كغ)، للتحري عن تغير التعبير المورثي للمورثات في مسار الاصطناع الحيوي للأستروجين وذلك عند المواليد بالمرحلة العمرية (10 إلى 16 يوم) بعد الولادة، وقد تبين عند الكشف عن تغير التعبير المورثي ل *CYP11A1* أنه عند الجرعة 1مكغ/كغ، قد ارتفع التعبير عن *CYP11A1* لدى المواليد بالعمر من 10-14 يوم بعد الولادة، بينما انخفض التعبير عن *CYP11A1* عند المواليد بالعمر من 14-16 يوم بعد الولادة، يعود هذا الاختلاف في التعبير عن هذه المورثة إلى مقدرة مركب TCDD على التدخل في تحفيز نشاط بروتين STAR الذي يعمل على ادخال الكولسترول من خارج الخلية إلى داخلها وبالتالي زيادة استقلاب الكولسترول الذي ينتج عنه تغير التعبير عن *CYP11A1* وهذا التغير المتقطع ليس له علاقة بهرمون البروجسترون أو البريغنينولون (Myllymäki et al., 2005).

أما بالنسبة للمورثة *3βHSD 2* المرمزة لأنزيم *3βHSD* المشارك في إنتاج العديد من الهرمونات، حيث يتوسط عملية تحويل هرمون البريغنينولون إلى هرمون البروجسترون في كلا النمطين من الخلايا الغمدية والحببية في المبيض، كما يتوسط عملية تحوّل هرمون (DHEA) De Hydro Epi Androsterone إلى الأندروستيديون Androstenedione، طبيعياً تعمل العديد من عوامل النمو على تحفيز الفعالية الأنزيمية ل *3βHSD* حيث يعمل FSH على تحفيز انتساخ *3βHSD mRNA* في الخلايا الحبيبية البشرية وعند القوارض، أما في الخلايا الغمدية يعمل IGF1 على تحفيز انتساخ *3βHSD mRNA* (LaVoie & King, 2009)، بينما في بعض الحالات المرضية تعاني الإناث المصابات بنقص *3βHSD 2* من تشوهات بسيطة في الأعضاء التناسلية الخارجية عند الولادة، وعدم انتظام الحيض، وضعف الخصوبة (Pan et al., 2012) كما تسبب متلازمة تضخم الغدة الكظرية الخلقى التي تضعف إنتاج الهرمونات وتعطل النمو والنضج الجنسي (LaVoie & King, 2009). حيث بيّنت نتائجنا انخفاضاً في التعبير المورثي للمورثة *3βHSD 2* لدى كل المجموعات التجريبية في إناث الجيلين F1, F2، وهذا ما أظهرته دراسة تمّ فيها تجريب أمهات جرذان Wistar الحوامل بشكلٍ فموي بجرع متزايدة من TCDD (0.5، 1، 2 ملغم/كغم) في اليوم GD15، أدت إلى انخفاض كبير في مستويات تعبير *StAR* mRNA و *P450scc* و *3βHSD* و *17βHSD* في مرحلة البلوغ لدى ذكور الجيل F1 كما أظهر تقييم خصوبة الذكور البالغة انخفاضاً كبيراً في مؤشر التزاوج، والخصوبة، ومتوسط عدد عمليات انغراس وتعشيش الأجنة في الرحم (Mai et al., 2020).

أما المورثة *CYP19A1* فهي مُرمزة لإنزيم الأروماتاز *aromatase* الموجود في الشبكة الإندوبلازمية، يقوم هذا الإنزيم بتحويل هرمون الأندروجين إلى الأستروجين، يختلف نشاط الأروماتاز باختلاف أنواع الخلايا وذلك اعتماداً على حاجة الخلايا للأستروجين، لذا يكون أكثر نشاطاً في المبيض لدى الإناث، حيث يوجه التطور الجنسي في كل من الذكور والإناث (Mendelson, 2009). لكن في بعض الحالات تؤدي زيادة تحويل هرمون الأندروجين إلى الأستروجين إلى حدوث متلازمة فرط الأروماتاز (Czajka-Oraniec & Simpson, 2010)، إذ أن هناك أكثر من 10 عمليات إعادة ترتيب للمادة الوراثية للمورثة *CYP19A1*، تسبب هذه

المتلازمة مما ينجم عنها فترات حيض غير منتظمة وقصر القامة لدى الإناث ، تحدث في بعض عمليات إعادة الترتيب المورثي تضاعف أجزاء من المورثة *CYP19A1*، مما يؤدي لزيادة إنتاج الإنزيم المسؤول عنه. كما تحدث عمليات إعادة ترتيب وراثية أخرى، تسمى الحذف، إذ تحذف أجزاء من المورثة *CYP19A1* وأجزاء من مورثة أخرى قريبة ثم تدمج أجزاء المورثتين معاً نتيجة لهذه المورثات المدمجة، يعبر عن *CYP19A1* في الأنسجة التي لا يتم التعبير عنها بشكل طبيعي. في حالة أخرى يحدث انقلاب يتم فيه دمج المورثة *CYP19A1* مع أجزاء من مورثة مجاورة مما يؤدي إلى زيادة إنتاج الأروماتاز. وبالتالي ينتج عن جميع أنماط إعادة ترتيب المورثة *CYP19A1* زيادة إنتاج هرمون الاستروجين (Fukami et al., 2013)، وحدثت أمراض كسرطان المبيض والثدي، فقد أظهرت نتائجنا ارتفاع التعبير عن المورثة *CYP19A1* لدى كل المجموعات التجريبية في إناث الجيلين F1, F2، فقد يُعتبر هذا الارتفاع مؤشراً خطورة في حدوث متلازمة فرط الأروماتاز، ففي دراسة حديثة توصلت إلى ارتباط مستويات التعبير المورثي لـ *CYP19A1* بزيادة خطر الإصابة بسرطان الثدي، حيث يعد ازدياد التعبير عن المورثة *CYP19A1* ونشاط أنزيم الأروماتاز من بين الأحداث التنظيمية الرئيسية لإنتاج الأسترايديول E1 داخل الورم في الأنسجة الخبيثة في الثدي لدى النساء المصابات بالمقارنة مع المجموعة الغير مصابة (Barros-Oliveira et al., 2021). كما أظهرت دراسة أخرى على خطوط خلوية معزولة من خلايا سرطان المبيض، إلى ارتفاع التعبير المورثي لـ *CYP19A1* في الخطوط (HOSE, PEO4, PEO14, BG1) الخلوية الظهارية لسرطان المبيض والذي ترافق مع ارتفاع التعبير عن هرمون الإسترايديول (Cunat et al., 2005).

وهذا ما أكدته نتائجنا أيضاً بعد اختبار الإليزا الخاص بهرمون الإسترايديول E2 في عينات مصل دم الفئران للمجموعات التجريبية والشاهدة، إذ وجدنا ارتفاعاً في هرمون الإسترايديول في المجموعات التجريبية لدى إناث (F1, F2)، بالمقارنة مع انخفاضه في المجموعات الشاهدة لدى إناث (F1, F2). والذي قد يُعتبر كما ذكرناه سابقاً مؤشراً على حدوث كل من سرطان المبيض والثدي. فمن المعروف أن الأستروجين الأساسي المفرد من المبيض هو بيتا استرايديول 17β ، الضروري في خصوبة الثدييات، لأنه يساعد على تطور الجريبات المبيضية وتحفيز عملية الإباضة وتغيير قوام مخاط عنق الرحم لتسهيل نقل الحيوانات المنوية. وتحضير بطانة الرحم من أجل تعشيش الجنين، حيث تؤدي التعديلات في إنتاج الأسترايديول إلى تعطيل هذه العمليات التي تؤدي في النهاية إلى العقم (Sinchak & Wagner, 2012). حيث أشارت الدراسات إلى ارتفاع حساسية الإناث تجاه مركب TCDD ففي دراسة تم فيها تجريع إناث غير بالغة لجرذان (SD) بـ 10مكغ/كغ من TCDD تبين من خلالها أن الحرائك الدوائية الخاصة بالجنس (ECP) Estradiol Cypionate والتي استخدمت تجاه مركب TCDD قد أدت لزيادة خطر الأثر السمي على الإناث المعرضة وتنشيط الإباضة وبالتالي زيادة في تركيز هرمون الأستروجين، إذ أن الاختلافات في حساسية الإناث تجاه سمية TCDD تعتمد على المرحلة العمرية التي تمر بها الإناث ففي الإناث بعمر الشيخوخة (تفتقر للأستروجين) تختلف حساسيتها تجاه الـ TCDD عن الإناث في بداية البلوغ الجنسي (أول إباضة) وعن الإناث البالغة (Petroff et al., 2000).

كما بينت نتائجنا وجود تغيرات نسيجية عديدة من أهمها ضمور في حجم المبيض، وحدثت التخر في طبقة الخلايا الحبيبية وانحلال الخلية البيضية والنواة من الجريبات المبيضية عند إناث (F1, F2) من المجموعة التجريبية مقارنة مع الشاهدة. ووجود احتقان في الأوعية الدموية عند F1، وزيادة عدد الجريبات الرتيقة عند F2، كما وجدنا انخفاضاً في عدد الجريبات الابتدائية والناضجة والجسم الأصفر عند F1, F2، وارتفاع عدد الجريبات الأولية في F1، وانخفاض عدد الجريبات الثانوية في F2 من المجموعات التجريبية مقارنة مع الشاهدة. وهذا يتفق مع دراسات توصلت إلى ارتباط اضطراب الجريبات المبيضية بنضوب احتياطي المبيض من الجريبات البدائية مع زيادة تموت الخلايا الحبيبية، حيث وجد أن نسبة 10% من الخلايا الحبيبية تميل إلى الخضوع لموت الخلايا المبرمج apoptosis عند اضطراب الجريب المبيضي مما يؤدي بشكل مباشر أو غير مباشر إلى رتق الجريب (Yang et al., 2017). في دراسة أخرى تهدف لإظهار تأثير تعرض الأمهات لمركب TCDD على مستويات هرمون AMH (anti Müllerian hormone) في المصل عبر الأجيال لما لهذا الهرمون المفرد من الخلايا الحبيبية المحيطة ببويضة الجريب الغاري أهمية كبيرة في عملية التطور الجريبي والإباضة حيث تم تجريع جرذان (SD) الحوامل بشكلٍ فموي، بمركب

TCDD مقدارها 100 و 500 نانوغرام/كغ من أيام الحمل 8-14 يوم، مما أدى الى ضعف الإباضة وانخفاض عدد الجريبات المبيضية وبالتحديد الجريبات الابتدائية والثانوية في F3 و F1 والموت الخلوي المبرمج في الخلايا الحبيبية للمبيض في ذرية الجرذان البالغة F1 و F2، في حين ارتفعت أعداد الجريبات الابتدائية والثانوية والجسم الأصفر ومستويات AMH, AMHR2 mRNA في مجموعات F2، مما تسبب في حدوث سلسلة من الاضطرابات الهرمونية والخلل الوظيفي. بالتوافق مع ضعف التمايز الجريبي (Yu et al., 2020).

فيما يتعلق بتأثير TCDD على نسبة الجنس (الذكور/الإناث) فقد وجدنا انخفاضاً غير معنوي في الجيل F1 من المجموعة التجريبية. بينما انخفضت نسبة الذكور/الإناث بشكل معنوي في المجموعة التجريبية F2. وهذا يتوافق مع دراسة تمت على ذكور جرذان تعرضت فيها الأمهات لمركب TCDD (الجرعة الإجمالية ~ 1050 نانوغرام/كغ) في الرحم وفترة الرضاعة (F1) تزوجت مع إناث غير معرضة، تبين في ذرية F2 من ذكور الجرذان انخفاضاً كبيراً في نسبة الذكور/الإناث بنسبة (38%)، لكن لم يتأثر معدل الجنس أو الوفيات أو أعداد الحيوانات المنوية لدى F1، بينما انخفض وزن الجسم عند الفطام في F2 (Ikeda et al., 2005)، وفي دراسة تعرض فيها ذكور الفئران ل TCDD لمدة 5 أسابيع باستخدام نظام الجرعات (0، 4، 4000 نانوغرام/كغ من وزن الجسم) وذلك قبل التزاوج مع إناث غير معرضات، حيث انخفضت نسبة الذكور/الإناث من ذرية F1 بنسبة (48.8% و 46.2% على التوالي) اعتماداً على الجرعة (Ishihara et al., 2007)، كما أشارت دراسات أخرى أنه عند مستوى الجرعة العالية، انخفض عدد الحيوانات المنوية البربخية وحركتها كما انخفضت نسبة الحيوانات المنوية spermatozoa الحاملة للصبغي Y/الحاملة X بشكل طفيف، وانخفضت نسبة الجنس لدى المواليد (53.95% Ctr:، 47.92% TCDD)، مما يشير إلى أن نسبة الجنس في النسل تنخفض عند الإخصاب وبالتالي انخفاض نسبة الجنس عند الولادة، بسبب انخفاض خصوبة الحيوانات المنوية الحاملة للصبغي Y (Ishihara et al., 2010)، بناءً على هذه الدراسات نتوصل إلى أن المعاملة بال TCDD لحيوانات المنوية في المختبر يؤدي إلى انخفاض حيوية الحيوانات المنوية Y مما يؤدي إلى انخفاض نسبتها و انخفاض قدرتها على تخصيب البويضات أكثر من الحيوانات المنوية X، وبالتالي تساهم هذه التغييرات في انخفاض نسبة الذكور/الإناث (You et al., 2018).

إضافة إلى التأثيرات التي ظهرت على نسبة الجنس قمنا بتتبع الأثر السمي على نتائج الحمل في ذرية الفئران المعرضة. حيث أشارت الدراسات التجريبية إلى التأثيرات بواسطة الأب أو الأم على الأجيال المتعددة (F1 – F3)، نتيجة التعرض لمركب TCDD فقد أظهرت دراسة ل Ding وزملائه تم فيها إعطاء إناث الفئران الحوامل (F0) جرعة فموية واحدة مقدارها 10 مكغ/كغ من مادة TCDD في اليوم GD15.5 (مرحلة تكوين الأعضاء مكتملة) وعند تزواج حيوانات الجيل F1 مع الفئران الغير معاملة من الجنس الآخر. كانت النتائج كالتالي لم تتأثر F0 المعاملة ب TCDD على طول فترة الحمل، لكن ذكور الجيل F1 المعرضة، انخفضت خصوبتها بنسبة (47% فقط من أزواجها الإناث أصبحت حاملاً)، ومن المثير للاهتمام أنها نقصت طول فترة حمل أزواجها الإناث غير المعرضين وبالتالي حدوث الولادات المبكرة preterm births (Ctr 20 days, TCDD 18.5 days) كما انخفضت أوزان المشيمة وأوزان المواليد pup وانخفض التعبير عن مستقبلات mRNA البروجسترون (PGR) A و B ولكن ارتفعت تلك الخاصة بالمستقبلات Toll-Like Receptor (TLR4)، وهي أول مستقبلات الاستجابة المناعية لإشارات الخطر (Ding et al., 2011). وهذا يتوافق مع نتائجنا إذ لم يؤثر مركب TCDD لدى إناث F0 على طول مدة حملها. لكن إناث الجيل F1 المعرضة، نقصت طول فترة حملها بالتالي تم حدوث الولادات المبكرة preterm births (Ctr 20 days, TCDD 19 days)، وعند تزواج إناث F2 مع ذكور F2 نقصت طول مدة الحمل أيضاً إلى (Ctr 20 days, TCDD 18 days). كما انخفضت خصوبة الجيل F1 بنسبة (54% فقط من الإناث أصبحت حاملاً)، أما F2 انخفضت الخصوبة بنسبة (15% فقط من الإناث أصبحت حاملاً). فقد وجد أنه في نهاية الحمل، يحرص انخفاض هرمون البروجسترون حدوث الولادة وقد تم ربط ذلك بالولادة المبكرة في كل من البشر والفئران (Mendelson, 2009). فالولادات المبكرة التي يسببها TCDD هي نتيجة انخفاض التعبير المشيمي عن PGRs بالتوافق مع ارتفاع TLR4 وإنتاج السيتوكينات الالتهابية cytokine inflammatory (Wang et al., 2013) حيث أظهرت نتائجنا

انخفاض في التعبير عن المورثة $3\beta HSD 2$ المرمزة لأنزيم $3\beta HSD$ المسؤول عن اصطناع هرمون البروجسترون وبالتالي انخفاضه في كلا الجيلين والذي قد يرتبط بحدوث الولادة المبكرة. كما أظهرت نتائجنا لدى المجموعة التجريبية من الجيل F2 انخفاضاً معنوياً في وزن المبيض مقارنةً مع المجموعة الشاهدة. حيث تتضح الحساسية الزائدة في الجهاز التناسلي من خلال الدراسات التالية، نسل الجرذان Long Evans و Holtzman والتي تعرضت لـ 1مكغ/كغ من TCDD أثناء الحمل في اليوم GD15 قد انخفضت فيها أوزان المبيض وحدثت تشوهات في الأعضاء التناسلية (Gray et al., 1995). وفي دراسة أخرى أظهرت أن تعرض أنثى الهامستر السوري لـ 2 مكغ/كغ من TCDD في GD11.5، أثر سلباً على الجهاز التناسلي الذكري والأنثوي لدى أفراد نسلها حيث أدى لحدوث تشوهات الأعضاء التناسلية الخارجية كتغير فتحة المهبل وتغير في دورة الشبق المهبلية، وفشل الإنجاب، مع الأخذ بعين الاعتبار أن الهامستر يعتبر نوعاً مقاوماً للتأثيرات المميتة لـ TCDD (Wolf et al., 1999). إذن توضح رؤية التأثيرات الضارة في تكاثر هذه القوارض "الحساسية الكبيرة في تطور الجهاز التناسلي" تجاه مركب TCDD حتى في الأنواع الأخرى المقاومة للتأثيرات المميتة لـ TCDD. نستنتج من ذلك أن الآليات الكامنة وراء قدرة تأثير هذه المواد السامة على إحداث تغيرات متباينة على مستوى التعبير المورثي والهرمونات الستيروئيدية لدى الأجيال المعرضة لسمية الديوكسينات بشكل غير مباشر عن طريق الآباء تعود إلى اختلافات في الأساليب التجريبية، ونوع المادة الملوثة، والنموذج الحيواني المستخدم، ونوع النسيج الخلوي، واختلاف التراكيز المعطاة.

الاستنتاجات:

تقدم نتائج دراستنا دليلاً على مقدرة الديوكسينات في إحداث تغيرات وراثية مستمرة لأجيال متعددة، وذلك من خلال دراسة الأثر السمي لمركب TCDD على إحداث تغيرات في التعبير المورثي لعدد من المورثات ذات الأهمية الكبيرة في مسار الاصطناع الحيوي للهرمونات الستيروئيدية مصحوباً بالاضطراب الهرموني لهرمون الأسترايول وذلك في كل من المجموعات التجريبية مقارنةً بالمجموعة الشاهدة في خلايا المبيض لدى الجيلين (F1,F2). كما ظهرت التأثيرات عبر الأجيال لـ TCDD بالاقتران مع التغيرات النسيجية والشكلية من ضمور في حجم المبيض وانخفاض وزنه لدى F2 وحدث التنخر في الخلايا الحبيبية في الجريبات المبيضية عند إناث الجيلين (F1,F2) من المجموعة التجريبية. مما أدى إلى انخفاض في نسبة الجنس لدى F2، وطول مدة الحمل وخصوبة الجيلين (F1,F2). مما يدل على الحساسية الزائدة في الجهاز التناسلي الأنثوي عند الأجيال المعرضة للأثر السمي للديوكسين.

تشير النتائج إلى ضرورة تحري تأثيرات سمية الديوكسين على التعبير عن مورثات أخرى هامة في المسار الستيروئيدي، بما في ذلك أنماط المثيلة المتغيرة للمورثات المنتسخة والتحقق مما إذا كان هناك علاقة سببية وتحديد المورثات الرئيسية التي تتأثر بذلك وتؤدي إلى تعديلات فوق وراثية يسببها الديوكسين بوساطة الآباء وعبر الأجيال، الأمر الذي سيعزز فهمنا بشكل أكبر للأثار المحتملة للسموم البيئية خاصةً الديوكسينات على الصحة الإنجابية لدى الأجيال المعرضة بشكل غير مباشر من ذكور وإناث.

المراجع:

1. Atis, A., Aydin, Y., Ciftci, F., Sakız, D., Arslan, A., Toklu, A. S., Donmez, M., & Goker, N. (2012). Hyperbaric oxygen increases atresia in normal & steroid induced PCO rat ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-8.
2. Baldrige, M., Marks, G., Rawlins, R., & Hutz, R. (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.
3. Barros-Oliveira, M. d. C., Costa-Silva, D. R., Dos Santos, A. R., Pereira, R. O., Soares-Júnior, J. M., & Silva, B. B. d. (2021). Influence of CYP19A1 gene expression levels in women with breast cancer: a systematic review of the literature. *Clinics*, 76.
4. Cunat, S., Rabenoelina, F., Daurès, J.-P., Katsaros, D., Sasano, H., Miller, W., Maudelonde, T., & Pujol, P. (2005). Aromatase expression in ovarian epithelial cancers. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 93(1), 15-24.
5. Czajka-Oraniec, I., & Simpson, E. R. (2010). Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynologia Polska*, 61(1), 126-134.
6. Ding, T., McConaha, M., Boyd, K. L., Osteen, K. G., & Bruner-Tran, K. L. (2011). Developmental dioxin exposure of either parent is associated with an increased risk of preterm birth in adult mice. *Reproductive Toxicology*, 31(3), 351-358.
7. Ergenoglu, M., Yildirim, N., Yildirim, A. G. S., Yeniel, O., Erbas, O., Yavasoglu, A., Taskiran, D., & Karadadas, N. (2015). Effects of resveratrol on ovarian morphology, plasma anti-mullerian hormone, IGF-1 levels, and oxidative stress parameters in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Reproductive Sciences*, 22(8), 942-947.
8. Fukami, M., Tsuchiya, T., Vollbach, H., Brown, K. A., Abe, S., Ohtsu, S., Wabitsch, M., Burger, H., Simpson, E. R., & Umezawa, A. (2013). Genomic basis of aromatase excess syndrome: recombination- and replication-mediated rearrangements leading to CYP19A1 overexpression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(12), E2013-E2021.
9. Gray Jr, L., Wolf, C., Mann, P., & Ostby, J. (1997). In utero exposure to low doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicology and applied pharmacology*, 146(2), 237-244.
10. Gray, L., Kelce, W., Monosson, E., Ostby, J., & Birnbaum, L. (1995). Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long-Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicology and applied pharmacology*, 131(1), 108-118.
11. Grech, V. (2014). Secular trends in newborn sex ratios. *Early Human Development*, 90(11), 755-760.
12. Guo, C., Shih, M.-C., Lan, H.-C., Hsu, N.-C., Hu, M.-C., & Chung, B.-c. (2007). Transcriptional regulation of human CYP11A1 in gonads and adrenals. *Journal of biomedical science*, 14(4), 509-515.
13. Hanson, M. a., & Gluckman, P. (2014). Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological reviews*.
14. Hites, R. A. (2011). Dioxins: an overview and history. *Environmental science & technology*, 45(1), 16-20.
15. Hoyer, P. B., & Hoyer, P. B. (2004). Ovarian toxicology. CRC Press Boca Raton, FL.
16. Hurst, C. H., DeVito, M. J., Setzer, R. W., & Birnbaum, L. S. J. T. S. (2000). Acute administration of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats: association of measured tissue concentrations with developmental effects. *Toxicology and applied pharmacology*, 53(2), 411-420.
17. Ikeda, M., Tamura, M., Yamashita, J., Suzuki, C., & Tomita, T. (2005). Repeated in utero and lactational 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F2 progeny. *Toxicology and applied pharmacology*, 206(3), 351-355.
18. Ishihara, K., Ohsako, S., Tasaka, K., Harayama, H., Miyake, M., Warita, K., Tanida, T., Mitsuhashi, T., Nanmori, T., & Tabuchi, Y. (2010). When does the sex ratio of offspring of the paternal 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure decrease: in the spermatozoa stage or at fertilization? *Reproductive Toxicology*, 29(1), 68-73.
19. Ishihara, K., Warita, K., Tanida, T., Sugawara, T., Kitagawa, H., & Hoshi, N. (2007). Does paternal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affect the sex ratio of offspring? *Journal of veterinary medical science*, 69(4), 347-352.

20. Karman, B. N., Basavarajappa, M. S., Craig, Z. R., & Flaws, J. A. (2012). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activates the aryl hydrocarbon receptor and alters sex steroid hormone secretion without affecting growth of mouse antral follicles in vitro. *Toxicology and applied pharmacology*, 261(1), 88-96.
21. Karman, B. N., Basavarajappa, M. S., Hannon, P., & Flaws, J. A. (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.
22. Lan, H.-C., Lin, I.-W., Yang, Z.-J., & 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*, 148(1), 26-34.
23. LaVoie, H. A., & King, S. R. (2009). Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Experimental biology and medicine*, 234(8), 880-907.
24. Macedo, N. J., & Ferreira, T. L. (2014, April). Maximizing total RNA yield from TRIzol reagent protocol: a feasibility study. In ASEE zone I conference (pp. 1-8).
25. Mai, X., Dong, Y., Xiang, L., & Er, Z. (2020). Maternal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses male reproductive functions in their adulthood. *Human & Experimental Toxicology*, 39(7), 890-905.
26. Mendelson, C. R. (2009). Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Molecular Endocrinology*, 23(7), 947-954.
27. Mescher, A. L., & Junqueira, S. (2013). Basic histology text and atlas. In: McGraw Hill e-book. Indiana.
28. Mocarelli, P., Gerthoux, P. M., Ferrari, E., Patterson Jr, D. G., Kieszak, S. M., Brambilla, P., Vincoli, N., Signorini, S., Tramacere, P., & Carreri, V. (2000). Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *The Lancet*, 355(9218), 1858-1863.
29. Murray, S. A., Morgan, J. L., Kane, C., Sharma, Y., Heffner, C. S., Lake, J., & Donahue, L. R. (2010). Mouse gestation length is genetically determined. *PloS one*, 5(8), e12418.
30. Myllymäki, S., Haavisto, T., Brokken, L., Viluksela, M., Toppari, J., & Paranko, J. (2005). In utero and lactational exposure to TCDD; steroidogenic outcomes differ in male and female rat pups. *Toxicological sciences*, 88(2), 534-544.
31. Nelson, C. E. (2008). Teaching evolution (and all of biology) more effectively: strategies for engagement, critical reasoning, and confronting misconceptions. *American Zoologist*, 48(2), 213-225.
32. Pan, Y., Zhong, S., Hu, R.-M., & Gong, W. (2012). Mutation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) at the 3'-untranslated region is associated with adrenocortical insufficiency. *Molecular Medicine Reports*, 6(6), 1305-1308.
33. Petroff, B. K., Gao, X., Rozman, K. K., & Terranova, P. F. (2000). Interaction of estradiol and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in an ovulation model: evidence for systemic potentiation and local ovarian effects☆. *Reproductive Toxicology*, 14(3), 247-255.
34. Schug, T. T., Barouki, R., Gluckman, P. D., Grandjean, P., Hanson, M., & Heindel, J. J. (2013). PPTOX III: environmental stressors in the developmental origins of disease—evidence and mechanisms. *Toxicological sciences*, 131(2), 343-350.
35. Sinchak, K., & Wagner, E. J. (2012). Estradiol signaling in the regulation of reproduction and energy balance. *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(4), 342-363.
36. Soubry, A. (2018). POHaD: why we should study future fathers. *Environmental epigenetics*, 4(2), dvy007.
37. STP Ovary Evaluation Working Group, Regan, K. S., Cline, J. M., Creasy, D., Davis, B., Foley, G. L., ... & Stebbins, K. (2005). STP position paper: ovarian follicular counting in the assessment of rodent reproductive toxicity. *Toxicologic pathology*, 33(3), 409-412.
38. Terrell, M. L., Hartnett, K. P., & Marcus, M. (2011). Can environmental or occupational hazards alter the sex ratio at birth? A systematic review. *Emerging health threats journal*, 4(1), 7109.
39. Tesic, D., Hawes, J. E., Zosky, G. R., & Wyrwoll, C. S. (2015). Vitamin D deficiency in BALB/c mouse pregnancy increases placental transfer of glucocorticoids. *Endocrinology*, 156(10), 3673-3679.
40. Viluksela, M., & Pohjanvirta, R. (2019). Multigenerational and transgenerational effects of dioxins. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 2947.
41. Wang, X., Miller, D. C., Harman, R., Antczak, D. F., & Clark, A. G. (2013). Paternally expressed genes predominate in the placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(26), 10705-10710.

42. Wolf, C., Ostby, J., & Gray Jr, L. (1999). Gestational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 51(2), 259-264.
43. Yang, M., Cushman, R., & Fortune, J. (2017). Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 23(5), 282-291.
44. You, Y.-A., Mohamed, E. A., Rahman, M. S., Kwon, W.-S., Song, W.-H., Ryu, B.-Y., & Pang, M.-G. (2018). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin can alter the sex ratio of embryos with decreased viability of Y spermatozoa in mice. *Reproductive Toxicology*, 77, 130-136.
45. Yu, K., Zhang, X., Tan, X., Ji, M., Chen, Y., Wan, Z., & Yu, Z. (2020). Multigenerational and transgenerational effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on ovarian reserve and follicular development through AMH/AMHR2 pathway in adult female rats. *Food and Chemical Toxicology*, 140, 111309.