

## دور الإجهاد التأكسدي في حدوث اضطراب طيف التوحد (ASD)

علا نصرالله\*

سمر الزير\*

### الملخص

يُعد اضطراب طيف التوحد (ASD) Autism spectrum disorder من الاضطرابات العصبية الشائعة التي لا تزال حتى الآن مجهولة السبب. ويعتمد تشخيص هذا الاضطراب على الأعراض والسلوكيات التي يظهرها الطفل. ولهذا توجد حاجة ماسة لمؤشرات حيوية يمكن اعتمادها لتشخيص هذا الاضطراب. وبما أن الإجهاد التأكسدي هو واحد من المسببات المحتملة التي يتم دراسة ارتباطها باضطراب طيف التوحد جرى في هذه الدراسة قياس واحد من المؤشرات الحيوية الشائعة للإجهاد التأكسدي (المالون دي ألدهيد Malondialdehyde MDA) في 30 عينة بلازما لأطفال مصابين باضطراب طيف التوحد ومقارنتها مع عينات لأطفال سليمين مطابقين للمرضى بالعمر والجنس (وقسمت الشواهد إلى: 15 شاهداً لأخ الطفل المصاب باضطراب طيف التوحد، و15 شاهداً لا توجد أي صلة قرابة بينه وبين أطفال طيف التوحد). وتبين وجود فارق إحصائي بين مجموعتي الأطفال المصابين باضطراب طيف التوحد وكامل الشواهد، وبين مجموعتي الأطفال المصابين باضطراب طيف التوحد والشواهد غير الأخوة، وبين مجموعتي الشواهد الأخوة والشواهد غير الأخوة (P=0.0001)، بينما تبين عدم وجود فارق إحصائي بين مجموعتي الأطفال المصابين باضطراب طيف التوحد والشواهد الأخوة (P=0.656). مما يشير إلى دور الإجهاد التأكسدي في إحداث اضطراب طيف التوحد، وإمكانية استخدام مؤشراتته للكشف المبكر عن هذا الاضطراب.

الكلمات المفتاحية: التوحد، ASD، الإجهاد التأكسدي، الماون دي ألدهيد، MDA.

\* قسم تأثير الأدوية والسموم - كلية الصيدلة - جامعة دمشق - سورية

## The role of oxidative stress in the occurrence of autism spectrum disorder (ASD)

Nasrallah O.\*

Alzeer S.\*

### Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a common neurological disorder, which cause is still unknown. Diagnosis of this disorder depends on the child's symptoms and behaviors. Therefore, there is an urgent need for biomarkers that can be used to diagnose this disorder. Among these indicators are oxidative stress biomarkers, which is one of the causes, whose association with autism spectrum disorder, is being studied. One common biomarker of oxidative stress is Malondialdehyde (MDA), which was measured in 30 plasma samples of children with autism spectrum disorder and compared with samples of healthy children who matched the patients for age and sex (controls were divided into: 15 siblings of the child with autism spectrum disorder and 15 non-sibling controls). And it was found that there was a statistical difference between the two groups of children with autism spectrum disorder and all the controls, and between children with autism spectrum disorder and the non-sibling controls, and between the siblings and the non-sibling controls ( $P=0.0001$ ), while it was found that there was no statistical difference between the children with autism spectrum disorder and sibling controls ( $P=0.656$ ). All of this indicates the role of oxidative stress in causing autism spectrum disorder, and the possibility of using its biomarkers for early detection of autism spectrum disorder.

**Key words:** Autism, ASD, Oxidative stress, Malondialdehyde, MDA.

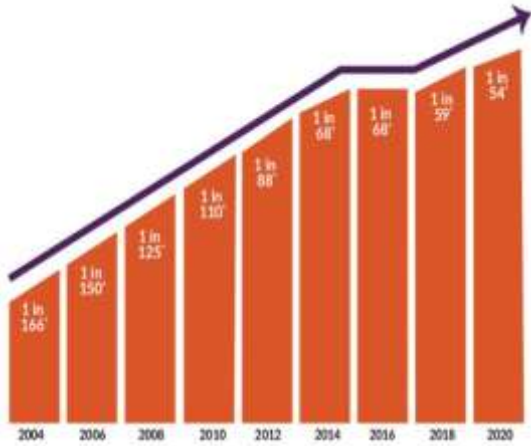
\* Department of Pharmacology and Toxicology - Faculty of pharmacy - Damascus University - Syria

## المقدمة Introduction:

اعتمدت المراجعة الأخيرة (الإصدار الخامس) للدليل التشخيصي والإحصائي للاضطرابات النفسية Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders fifth edition (DSM-5)، التي نُشرت في أيار 2013، المصطلح الشامل لاضطراب طيف التوحد دون تعريف لأنواع الفرعية، وأكدت على معيارين اثنين لتشخيص هذا الاضطراب:

- (1) الصعوبات في التّواصل والتّفاعل الاجتماعي.
- (2) السلوك و/أو الاهتمامات و/أو الأنشطة المقيدة والمتكررة.

كان انتشار اضطراب طيف التوحد في عام 2016، وفق شبكة مراقبة التوحد وإعاقات النمو، 18.5 لكل 1000 (أي 1 من 54) طفل بعمر 8 سنوات (الشكل 1).



الشكل (1): تقدير مراكز الـ CDC لانتشار التوحد ما بين 2004-2020 (Prevalence of autism, 2020).

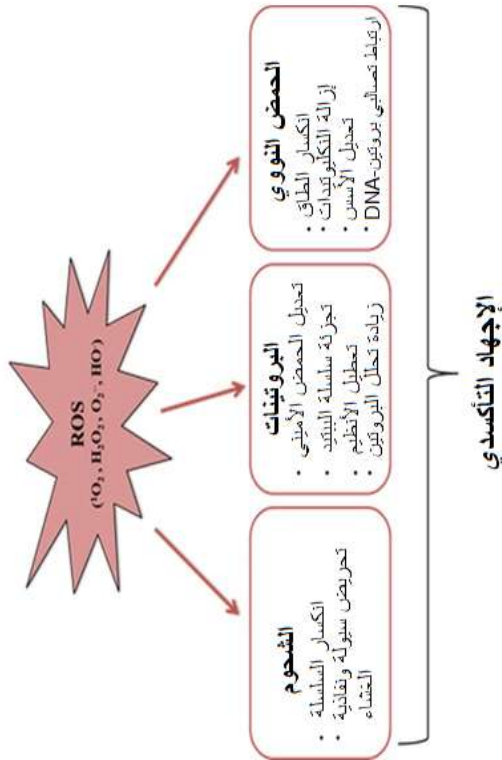
أما في البلدان العربية، فإن المعدلات أقل من تلك الموجودة في الدول المتقدمة، ولكن قد تساهم عوامل كثيرة في ذلك. على سبيل المثال، غالباً ما يكون من الصعب تشخيص الطفل المصاب باضطراب طيف التوحد بشكل صحيح، حيث أنّ عدد الأطباء النفسيين المتخصصين في مشاكل النمو في مرحلة الطفولة في الشرق الأوسط أقل من نظائرهم في الغرب. ومن المحتمل أيضاً، أن يكون أحد

اضطرابات النمو العصبي ( Neurodevelopmental disorders) هي عبارة عن مجموعة من الحالات التي تبدأ في فترة النمو، وتُحدث عجزاً ينتج عنه ضعف في الأداء الوظيفي. وهي من الاضطرابات الشائعة حول العالم، وتتميز بقصور في الإدراك، واللغة، والسلوك، والمهارات الحركية، مما يؤدي إلى ضعف الأداء الشخصي، والاجتماعي، والأكاديمي، والمهني ( Morris et al., 2020, 65; Lim et al., 2021, 764).

تشمل هذه الاضطرابات: الإعاقة الذهنية، اضطرابات التواصل، اضطراب طيف التوحد، اضطراب نقص الانتباه/فرط النشاط، واضطرابات التعلم ( Morris et al., 2020, 764).

نادراً ما يتم تناول موضوع اضطراب طيف التوحد في الوطن العربي، ولاسيما في سوريا. علماً أنّ سبب هذا الاضطراب لا يزال غير معروفاً حتى الآن، ولكن توجد عدّة مقترحات ودراسات حول مسببات هذا الاضطراب. حيث وُجدت العديد من عوامل الخطورة الوراثية وغير الوراثية، والتي تساهم في تطور اضطراب طيف التوحد، إما وحدها أو مجتمعةً. فقد بيّنت عدّة دراسات صلة اضطراب طيف التوحد بالجينات والوراثة، حيث أنّ 30-35% من حالات اضطراب طيف التوحد لها علاقة بالجينات، أما النسبة المتبقية (65-70%) من حالات طيف التوحد، تكون العوامل البيئية المتنوعة من مسبباتها ( Abruzzo et al., 2019, 332).

يمكن أن يُعزى سبب عدم وضوح الفزيولوجيا المرضية لاضطراب طيف التوحد بشكل كامل حتى الآن، إلى التحديات في إيجاد النماذج الحيوانية المناسبة، بالإضافة إلى تعقيد البيولوجيا العصبية في وظيفة الدماغ ( Eissa et al., 2018, 304).



الشكل (2): الأذية التأكسدية التي تسببها فصول الأكسجين التفاعلية (ROS) للشحوم والبروتينات والحمض النووي (DNA) (Maryam, vahid and hassan, 2019, 1310).

غالباً ما تمثل شحوم الغشاء الخلوي ركائز (substrates) للهجوم التأكسدي (لوفرة الروابط الثنائية فيها). فتحدث أكسدة الشحوم في ظروف الإجهاد التأكسدي؛ وهي عبارة عن سلسلة من التفاعلات التي تبدأ بواسطة الجذور الحرة التي تؤثر على الأغشية الخلوية والبروتينات الشحمية والجزيئات الأخرى التي تحتوي على الحموض الدسمة غير المشبعة، مما يؤدي إلى إتلافها. ويستمر هذا التفاعل بشكل تلقائي، وتكون النتيجة النهائية هي تغييرات هيكلية ووظيفية لهذه الركائز (Snezana and bojan, 2014, 416) بشكل عام، يمكن تقسيم عملية أكسدة الشحوم إلى ثلاث مراحل: البدء، الانتشار، الإنهاء، وهي إما أن تحدث بشكل أنزيمي (بواسطة أنزيمات لبيوأكسجيناز lipoxygenase، سيكلوأكسجيناز cyclooxygenases مثلاً) أو بشكل غير

العوامل هو نقص الوعي بين الأهالي فيما يتعلق باضطراب طيف التوحد، بما في ذلك الفشل في التعرف على الأعراض (Mostafa, 2011, 147).

ويعتمد تشخيص هذا الاضطراب فقط على الأعراض والسلوكيات التي يظهرها الطفل. لذلك توجد حاجة للبحث عن أسباب هذا الاضطراب للوقاية منها قدر الإمكان، وتجنب الوصول إلى درجات شديدة من اضطراب طيف التوحد.

واحد من المسببات التي يتم دراستها حالياً هو الإجهاد التأكسدي؛ ويُعرف بأنه حالة من اختلال التوازن بين إنتاج الجزيئات المؤكسدة (prooxidants) وبين مضادات الأكسدة الخلوية الموجودة بالجسم (antioxidants)، وذلك لصالح المؤكسدة، مما ينتج عنه عدّة أضرار محتملة، حيث لا تقتصر فقط على إصابات خلوية مباشرة نتيجة زيادة المؤكسدة، بل قد تتدخل أيضاً بنقل الإشارات والتعبير الجيني المنظم بآليات حساسة للأكسدة والإرجاع (Urs, 2003, 93)

احتواء الأكسجين على إلكترونين غير متزاوجين لهما حالة دوران متوازنة، يجعله عرضة للإرجاع من خلال مسار أحادي التكافؤ. ولذلك، يولد الاستقلاب الغذائي الهوائي الطبيعي مواد وسيطة تفاعلية خطيرة، ناتجة عن إرجاع الأكسجين، وهي ما تسمى بفصول الأكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (ROS) (Irwin, 2012, 132).

تعدّ فصول الأكسجين التفاعلية، بكميات منخفضة إلى متوسطة، مفيدة في تنظيم العمليات التي تنطوي على الحفاظ على التوازن ومجموعة واسعة من الوظائف الخلوية (Sharifi-Rad et al., 2020, 69). لكن ارتفاع مستويات ROS يُسبب أذيات متعدّدة، منها على الشحوم (lipids)، البروتينات، والحمض النووي DNA (الشكل 2).

أنزيمي كما يحدث عندما تزيل جذور الهيدروكسيل إلكترونياً من حمض دسم غير مشبع، لينتج عن هذا جذر شحمي غير مستقر، والذي يمكن أن يتفاعل مع الأكسجين، مكوناً جذر بيروكسيل الحموض الدسمة، الذي يمكن أن يتفاعل مع حمض دسم غير مشبع آخر لتكوين هيدروبيروكسيد الحموض الدسمة وجذر شحمي جديد، وبالتالي يحدث انتشار للأذية. وهذه الحلقات المتكررة من أكسدة الشحوم يمكن أن تسبب أضراراً خطيرة لأغشية الخلايا ( Mitchel and Harmut, 2013, 74; Antonio, Mario and Sandro, 2014, 2 ). ومن نتائج هذه الأذية التأكسدية للشحوم؛ فقدان سلامة الغشاء و حدوث خلل شديد في وظيفته، الترابط المتصالب (cross-linking) والبلمرة لمكونات الغشاء، بالإضافة إلى تعديل كمون الغشاء (إزالة الاستقطاب)، وتعطيل المستقبلات والأنزيمات المرتبطة بالغشاء، وتغيرات في سيولة الغشاء، وزيادة نفاذية غير محددة للأيونات مثل تحرر الكالسيوم من الميتوكوندريا، تفعيل الكاسباز-3 (caspases-3)، وموت الخلايا المبرمج (apoptosis) (Zhengwei, 2005, 732).

ولأنّ الإجهاد التأكسدي يمكن أن يؤدي إلى أكسدة جميع الجزيئات الحيوية تقريباً (مثل الحمض النووي الريبوزي منزوع الأكسجين deoxyribonucleic acid (DNA)، الحمض النووي الريبوزي (RNA) ribonucleic acid، والكوليسترول، والشحوم، والكربوهيدرات، والبروتينات). ففي المقابل، ينتج عن أكسدة هذه الجزيئات الكبيرة منتجات نهائية متعددة، يمكن قياس تراكيزها لتقييم الإجهاد التأكسدي الحاصل في الجسم الحي ( Pietro and Gianfranco, 2015, 2).

تُقاس المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي عادةً في البلازما أو المصل، حيث يمثل كلاهما بيئة مستقرة نسبياً للمؤشرات الحيوية الجهازية ( Gyurászová et al., 2018, 5).

921). والمؤشر الحيوي هو خاصية يتم قياسها وتقييمها بشكل موضوعي كمؤشر على العمليات البيولوجية الطبيعية أو العمليات المسببة للأمراض أو الاستجابات الدوائية للتدخل العلاجي ( Biomarkers Definitions Working group, 2001, 91).

وغالبا، تُقِيم أكسدة الشحوم عن طريق قياس مؤشر المألون دي ألدهيد (MDA)، وهو أحد أفضل منتجات أكسدة الشحوم التي تم فحصها. ينتج المألون دي ألدهيد من الحموض الدسمة المتعددة اللاتشبع polyunsaturated fatty acids (PUFAs)، إما عن طريق التفاعلات الكيميائية أو التفاعلات المحفزة بواسطة الأنزيمات (Dimitrios, 2017, 13).

الصيغة الكيميائية لهذا الجزيء مؤلفة من ثلاث ذرات كربون مرتبطة مع مجموعتين من الأدهيد عند الكربون الأول والثالث (الشكل 3) (Melanie and Sergi, 2019, 1246).

ويعدّ ذو تفاعلية عالية وذلك بشكل أساسي بسبب ألفته للإلكترونات مما يجعله شديد التفاعل تجاه المركبات الأليفية للنواة، مثل بقايا الحموض الأمينية الأساسية (الليسين والهستيدين) ( Martin, Henk and Wilfried, 2012, 433).

وهو يوجد بشكلين (مونومير monomer وأوليغومير oligomer)، وفي ظل الظروف الفيزيولوجية يسبب ارتباط تصالبي بين البروتينات، كما يمكن أن يُشكّل معقدات مع البروتينات والDNA ( JR and KS, 2015, 5).

73, 2017)، وخاصة في اضطراب طيف التوحد، إذ يسهم الإجهاد التأكسدي كواحد من المسببات المحتملة في حدوث هذا الاضطراب ( Messina et al., 2018, 2; Nadeem et al., 2019, 355).

ويعدّ التشخيص المبكر أمراً ضرورياً في كل الأمراض والاضطرابات، وخاصةً اضطرابات النمو العصبي، حيث أنّ الكشف المبكر عن المرض يعتبر خطوة هامة جداً بالنسبة للمرضى، فالتشخيص المبكر، يحفز التدخّل المبكر، الذي يزيد الإمكانية على تغيير المسار التطوري للاضطراب (Pierce et al., 2009, 132).

لكنّ واحداً من الأسباب التي تجعل اضطراب طيف التوحد صعباً، هو عدم وجود مؤشرات حيوية محددة نستطيع استخدامها للتشخيص المبكر (Munib, 2019, 5).

ولذلك أُجريت هذه الدراسة، وتمّ اختيار مؤشر المالون دي ألدهيد كمؤشر على الإجهاد التأكسدي، لدراسة العلاقة بينه وبين اضطراب طيف التوحد. بالإضافة لدراسة إمكانية استخدام مؤشر الMDA للكشف المبكر عن هذا الاضطراب.

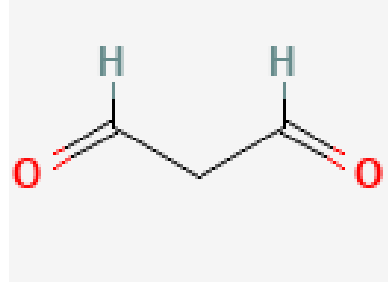
### مواد البحث وطرائقه:

#### Materials and methods

##### (1) مجموعات الدراسة:

بالنسبة للعينات المرضية: تمّ جمع 30 عينة دم من أطفال مصابين باضطراب طيف التوحد، تتراوح أعمارهم من 1.5-13 سنة، وذلك من جمعية زهرة المدائن وجمعية شمعة أمل بتاريخ 2021/9/16.

أما بالنسبة للعينات الشاهدة: فقد قُسمت هذه المجموعة إلى قسمين: قسم مؤلف من 15 عينة أُخذت من الأخوة والأخوات السليمين للأطفال المصابين باضطراب طيف التوحد، بتاريخ 2021/9/16 وذلك بمساعدة من جمعية زهرة المدائن، وقسم مؤلف من 15 عينة أُخذت من أطفال



الشكل (3): الصيغة الكيميائية للمالون دي ألدهيد ( PubChem (Compound Summary, 2022

بيّنت العديد من الدراسات أنّ الإجهاد التأكسدي يساهم في مجموعة واسعة من المشاكل الصحيّة، ويُعدّ أحد الأسباب الكامنة وراء العديد من الأمراض والسُميّات ( Yasemin and Kubra, 2016, 2; Henry and Hongqiao, 2021, 689). ويوجد نوعان من الآليات الرئيسيّة التي من خلالها يساهم الإجهاد التأكسدي في المرض:

**الآلية الأولى:** تنطوي على إنتاج فصول تفاعليّة أثناء الإجهاد التأكسدي، التي تعمل على أكسدة الجزيئات الكبيرة مباشرةً، بما في ذلك الشحوم الغشائيّة والبروتينات الهيكلية والأنزيمات والحموض النووية، مما يؤدي إلى خلل في وظيفة الخلية والموت.

**الآلية الثانية:** تكون بواسطة إشارات الأكسدة والإرجاع الشاذة. حيث يمكن أن تعمل المواد المؤكسدة، وخاصة بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ )، الناتجة عن التحفيز الفيزيولوجي للخلايا، كمرسال ثانٍ. أمّا في الإجهاد التأكسدي، فيمكن أن يتسبّب الإنتاج غير الفيزيولوجي لـ  $H_2O_2$  في انحراف إشارات الأكسدة والإرجاع. وقد تحدث كلاً الالتيان في مرضٍ واحدٍ ( Henry and Hongqiao, 2021, 91).

فعلى الرغم من عدم توافق الآراء حول أسباب اضطراب طيف التوحد، لكن في الآونة الأخيرة، وُجدت أدلة مُتزايدة تدعم دور الإجهاد التأكسدي في الفيزيولوجيا المرضية لعدد من الأمراض العصبيّة والنفسية ( Fransen et al., 2012, 1369; Cynthia and Irfan, 2017, 302; Torequl,

## (2) تحضير العينات:

جُمعت عينات الدم في أنابيب تحوي مضاد تخثر (ليثيوم هيبارين lithium heparin)، وثُقِّلت العينات 5000 دورة بالدقيقة round per minute (rpm) لمدة 10 دقائق، ومن ثم أُخذت البلازما الناتجة، بالممص المكروي، ووضعت بأنابيب ابندروف مع إضافة 3 ميكرو لتر من مادة هيدروكسي التولوين البوتيلي (BHT) الموجودة في عتيدة الMDA، لكل 1 مل من البلازما، وتم مزجها جيداً، ومن ثم حُفظت كامل أنابيب الابندروف المستخدمة في المجمدة.

## (3) الأجهزة المستخدمة:

- مثقلة Centrifuge (Rotofix 32a) من شركة Hettich الأمريكية.
- مثقلة أنابيب ابندروف Eppendorf centrifuge من شركة Abbott الأمريكية.
- مجمدة Freezer
- هزازة Vortex mixer من شركة Heidolph الأمريكية.
- حاضنة Incubator
- مقياس الطيف الضوئي متعدد الأبار (قارئ إليزا)، Multi-well spectrophotometer من شركة DiaMed EuroGen الألمانية.

## (4) المواد المستخدمة:

- حمض كلور الماء المركز (HCl 12N)
- أسيتونتريل Acetonitrile
- كحول ايزوبروبيلي Isopropyl alcohol
- ماء مقطر Distilled water
- عتيدة المألون دي ألدهيد (MDA Kit) من شركة BioVision الأمريكية، وهي حاوية على خمسة مواد، يوضحها الجدول (1).

سليمين بدون وجود صلة قرابة مع الأطفال المصابين باضطراب طيف التوحد، وذلك من مستشفى الأطفال بتاريخ 2021/9/26، وكانت أعمار الشواهد في المجموعتين تتراوح من 1.5-13 سنة.

وتم اختيار هذه الفئة العمرية لعدة أسباب:

- لتجنب التعرض لعوامل أخرى (مباشرة أو غير مباشرة) تقود لحدوث الشدة التأكسدية وارتفاع مؤشرات الحيوية عند كل من المرضى والشواهد.
- لأن من أهداف هذه الدراسة هو البحث عن إمكانية الكشف المبكر عن اضطراب طيف التوحد في المراحل العمرية الأولى قبل تطوره وزيادة شدته لتفادي حدوثه وتطور أعراضه لاحقاً.

## • معايير الاشتمال Inclusion criteria

1. الأطفال المصابين بالتوحد: وهذا بحسب الإفادة الطبية.
2. الفئة العمرية من 1.5 إلى 13 سنة.

## • معايير الاستبعاد Exclusion criteria

1. المصابون بأمراض عقلية ونفسية غير التوحد: وهذا بحسب الإفادة الطبية.
2. الفئة العمرية ما فوق 13 سنة.
3. المصابون بمرض السكري: وهذا بحسب الإفادة الطبية.
4. المصابون بأمراض الكلى والكبد: وهذا بحسب الإفادة الطبية.
5. المصابون بأمراض قلبية وعائية: وهذا بحسب الإفادة الطبية.
6. الذين عانوا من إصابات في الرأس: وهذا بحسب الإفادة الطبية.
7. الذين يعانون من إصابات أو أمراض قد تؤدي لزيادة الشدة التأكسدية لديهم: وهذا بحسب الإفادة الطبية.

الجدول (1): مكونات عتيدة الMDA

المكونات	سعة العبوة
كاشف كروموجينيك (مولّد للون)	6 مل
المادة الممدّدة A	5 مل
المادة الممدّدة B	5 مل
BHT	1 مل
عيارى MDA	200 ميكرو لتر

(5) مقايصة المألون دي أدهيد (MDA)

تستخدم عتيدة قياس أكسدة الشحوم التابعة لشركة BioVision مجموعة خاصة من الكواشف التي تُقلّ التداخل مع منتجات أكسدة الدسم الأخرى، بما في ذلك 4 هيدروكسي ألكينات.

• مبدأ المقايصة:

يعتمد على التفاعل بين كاشف كروموجينيك (مولّد للون) محدّد والمألون دي أدهيد (MDA) عند الدرجة 45 درجة مئوية. ينتج عن هذه المقايصة إشارة لونية قوية ومستقرة عند طول موجة 586 نانومتر، تتناسب طردياً مع كمية الMDA في العينات. يمكن أن تكشف هذه المقايصة لما يصل إلى 3 نانومول من المألون دي أدهيد (MDA) في العينات.

• تحضير العينات:

تمّ أولاً أخذ 500 ميكرو لتر من البلازما التي قمنا مسبقاً بإضافة مادة BHT إليها وأضيف إليها 10 ميكرو لتر تقريباً من حمض كلور الماء المركز للوصول إلى pH=1.5، وتمّ التأكد من الحصول على درجة الpH المطلوبة باستخدام شريط الpH. بعد مزجها جيداً، أخذ 200 ميكرو لتر من المادة الطافية ذات الpH التي تساوي 1.5، ثمّ تمّ البدء بعملية حلمة لهذه العينات بوضعها بالحاضنة بدرجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة 80 دقيقة. خلال فترة الحضانة، تمّ تحضير الكواشف الموجودة في العتيدة.

• تحضير الكواشف:

1. تمّ تمديد الكاشف الكروموجينيك (المولّد للون) 10 أضعاف باستخدام الأسيتونتريل (أي 1 مل من الكاشف الكروموجينيك + 9 مل الأسيتونتريل). مُدّد الكاشف بما يكفي لعدد المعايير المطلوب إجراؤها، حيث يلزم (500 ميكرو لتر من الكاشف الكروموجينيك الممدّد / مقايصة).

2. تمّ تمديد المادة الممدّدة (أ) 62.5 ضعف باستخدام الكحول الإيزوبروبيلي (أي 64 ميكرو لتر من المادة الممدّدة (أ) + 3936 ميكرو لتر من الكحول الإيزوبروبيلي). مُدّدت بما يكفي لعدد المعايير المطلوب إجراؤها، حيث يلزم (200 ميكرو لتر من المادة الممدّدة (أ) المُحضّرة/ مقايصة).

3. تمّ تمديد المادة الممدّدة (ب) 10 أضعاف باستخدام الماء المقطّر (أي 500 ميكرو لتر من المادة الممدّدة (ب) + 4.5 مل من الماء المقطّر).

4. تمّ تحضير مزيج التطوير بمزج الكاشف الكروموجينيك المُمدّد مع المادة الممدّدة (أ) المُحضّرة بنسبة 1:3 (أي 495 ميكرو لتر من الكاشف الكروموجينيك المُمدّد + 165 ميكرو لتر من المادة الممدّدة (أ) المُحضّرة) حيث يلزم (650 ميكرو لتر من مزيج التطوير/ مقايصة).

5. عيارى الMDA كان جاهز للاستخدام كما هو دون أي تحضير.

• تحضير السلسلة العيارية:

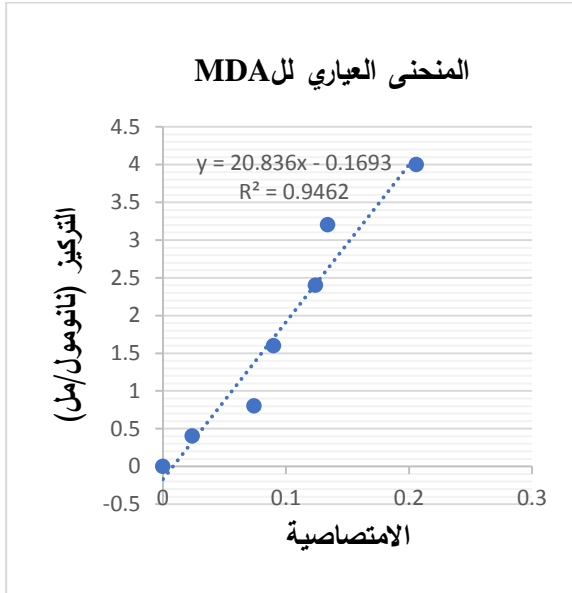
تمّ تحضير السلسلة العيارية بتمديد عيارى الMDA (6M) باستخدام المادة الممدّدة (ب) المُحضّرة (25 ميكرو لتر من عيارى الMDA + 1475 ميكرو لتر من المادة الممدّدة (ب) المُحضّرة). ثمّ تمّ زيادة التمديد بإضافة 100 ميكرو لتر عيارى الMDA المُمدّد إلى 900 ميكرو لتر من الماء المقطّر.



العياريات والعيّنات، ونُقلت إلى الآبار في اللوحة المسطحة الحاوية على 96 بئر. أخيراً، قيست الامتصاصية عند طول موجة 586 نانومتر بواسطة جهاز سبيكترو قارئ للإليزا، وتمّ الحصول على المخطط البياني (الشكل 4)، ومنه حُسب تركيز الـMDA الموجود في العيّنات الشاهدة والمرضية من معادلة المنحنى:

$$y = 20.836x - 0.1693$$

حيث x: امتصاصية العينة المقروءة.



الشكل (4): المنحنى العياري للـMDA

بعد ذلك، تمّ إضافة 20 ميكرو لتر من عياري الـMDA المُمدّد سابقاً إلى 980 ميكرو لتر من الماء المقطّر، وبهذا يكون محلول العمل من عياري الـMDA ذو التركيز 200 ميكرومول جاهزاً. أخيراً، يتمّ تحضير السلسلة العياريّة كما هو موضح بالجدول (2).

الجدول (2): تحضير السلسلة العياريّة لمقايسة الـMDA

رقم الأنبوب	الحجم المُضاف من عياري الـMDA ذو التركيز 200 ميكرومول (ميكرو لتر)	الماء المقطّر (ميكرو لتر)	تركيز السلسلة العياريّة (نانومول/بندروف)	تركيز السلسلة العياريّة (نانومول/مل)
1	0	200	0	0
2	10	190	2	0.4
3	20	180	4	0.8
4	40	160	8	1.6
5	60	140	10	2.4
6	80	120	16	3.2
7	100	100	20	4

#### • بروتوكول مقايسة الـMDA:

بعد نهاية فترة الحضان للعيّنات المُحلّمة، أُضيف 650 ميكرو لتر من مزيج التطوير (المُحضّر سابقاً بالخطوة رقم "4" بفقرة تحضير الكواشف) و150 ميكرو لتر من حمض كلور الماء المركز لكل أنبوب ابندروف يحتوي على 200 ميكرو لتر من العياريات و200 ميكرو لتر من العيّنات المُحلّمة. ثمّ احتُضنت العيّنات والعياريات عند الدرجة 45 درجة مئوية لمدة 60 دقيقة.

وفي نهاية هذه الفترة، نُقلّت العيّنات والعياريات (9000 دورة في الدقيقة، لمدة 10 دقائق). وجمّع 200 ميكرو لتر من المادة الطافية الزرقاء الصافية من كل من

## النتائج Results

### • نتائج السلسلة العيارية

حُضرت السلسلة العيارية لمقايضة المألون دي ألدهيد، ويوضّح الجدول (3) نتائج هذه السلسلة العيارية.

الجدول (3): نتائج السلسلة العيارية لمقايضة الMDA

رقم الأنبوب	الامتصاصية	تركيز عياري الMDA (نانومول/مل)
1	0.024	0.4
2	0.074	0.8
3	0.09	1.6
4	0.124	2.4
5	0.134	3.2
6	0.206	4

### • نتائج مقايضة الMDA (نانومول/مل) للعينات المرضية والشاهدة

يُبين الجدول (4) نتائج المقايضة وفق المجموعات المدروسة.

الجدول (4): نتائج مقايضة الMDA (نانومول/مل) للمجموعات المدروسة

رقم الأنبوب	عينة مرضية	عينة شاهدة ذو صلة قرابة (من 1-15)
		عينة شاهدة دون صلة قرابة (من 16-30)
1	20.4	24.2
2	21.4	22.5
3	22.1	17.5
4	27.2	0.5
5	25.2	25.2
6	24.9	23.6
7	25.3	17
8	17.4	16.6
9	20.3	16.6
10	20.3	15.7
11	24.3	24.1
12	22.2	21.3
13	13.2	27.5
14	19.4	23.2
15	16.7	17.7
16	24.6	3.4
17	18.5	3.8
18	12.7	5.4
19	28.7	6
20	25.6	3.7
21	20.9	3.4
22	21.3	2.3
23	25.5	4.2
24	16.5	3.4
25	23.2	3.8
26	10.5	5.5
27	14.5	5.9
28	21.6	3.6
29	18.9	3.4
30	19.7	2.2

## الدراسة الإحصائية Statistical study

### • الإحصاء الوصفي لقيم MDA

يُبين الجدول (5) الإحصاء الوصفي لقيم الMDA وفق المجموعات المدروسة.

الجدول (5): الإحصاء الوصفي لقيم الMDA

مقايضة الMDA	عدد الأفراد	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	
المجموعة المرضية (P)	30	11	29	21	4.4	
المجموعة الشاهدة	الأخوة (1C)	15	0.5	27.5	19.5	6.48
	غير الأخوة (2C)	15	2.2	6	4	1.18

### • اختبار تجانس التوزيع

تمّ أولاً التحقق من طبيعة التوزيع إن كان طبيعياً أم لا بالنسبة لقيم (MDA) لدى أفراد الدراسة في كل مجموعة، وذلك بإجراء اختبار كولموغوروف سميرونوف Kolmogorov-Smirnov عند مستوى معنوية 5% حيث توجد فرضيتان:

- الفرضية العدمية: التوزيع طبيعي في حال  $P > 0.05$ .
- الفرضية البديلة: التوزيع غير طبيعي في حال  $P < 0.05$ .

وتبين لدينا من نتائج التحليل الإحصائي أنّ ( $P < 0.05$ ) أي أنّ التوزيع غير طبيعي، ولذلك سيتم إجراء الاختبارات اللامعلمية، ومنها اختبار Mann-Whitney U test.

- اختبار مان ويتني لقيم MDA بين مجموعتي المرضى والشواهد كاملةً
  - اختبار مان ويتني لقيم MDA بين مجموعتي الشواهد الأخوة والشواهد غير الأخوة
- تم إجراء اختبار Mann-Whitney لمقارنة قيم مؤشر المالون دي أدهيد بين كامل المجموعة المرضية والشاهدة (الجدول 6).
- تم إجراء اختبار Mann-Whitney لمقارنة قيم مؤشر المالون دي أدهيد بين الشواهد الأخوة وغير أخوة (الجدول 9).

الجدول (6): مقارنة قيم MDA باستخدام اختبار Mann-Whitney U test بين المجموعة المرضية ومجموعة الشواهد كاملةً

	MDA
Mann-Whitney U	206.5
Wilcoxon W	671.5
Z	-3.601-
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.0001

الجدول (9): مقارنة قيم MDA باستخدام اختبار Mann-Whitney U test بين الشواهد الأخوة وغير أخوة

	MDA
Mann-Whitney U	15.000
Wilcoxon W	135.000
Z	-4.050-
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.0001

- اختبار مان ويتني لقيم MDA بين مجموعتي المرضى والشواهد الأخوة
  - اختبار كاي مربع للاستقلال لقيم MDA
- تم إجراء اختبار Mann-Whitney لمقارنة قيم مؤشر المالون دي أدهيد بين المجموعة المرضية والشواهد الأخوة (الجدول 7).
- أجري اختبار Chi-square لدراسة العلاقة بين مؤشر ال MDA للإجهاد التأكسدي واضطراب طيف التوحد في المجموعات المدروسة (الجدول 10)
- الجدول (10): دراسة ارتباط قيم MDA مع اضطراب طيف التوحد في المجموعة المرضية والمجموعة الشاهدة باستخدام اختبار Chi-square test of independence

الجدول (7): مقارنة قيم MDA باستخدام اختبار Mann-Whitney U test بين المجموعة المرضية ومجموعة الشواهد الأخوة

	MDA
Mann-Whitney U	206.5
Wilcoxon W	326.5
Z	-0.446-
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.656

	MDA
Chi-Square	30.591
df	2
Asymp. Sig.	0.0001

## المناقشة Discussion:

- المقارنة بين نتائج المجموعات المدروسة في هذه الدراسة
  - اختبار مان ويتني لقيم MDA بين مجموعتي المرضى والشواهد غير الأخوة
- تم إجراء اختبار Mann-Whitney لمقارنة قيم مؤشر المالون دي أدهيد بين المجموعة المرضية والشواهد غير أخوة (الجدول 8).
- الجدول (8): مقارنة قيم MDA باستخدام اختبار Mann-Whitney U test بين المجموعة المرضية ومجموعة الشواهد غير الأخوة
- كانت مستويات المالون دي أدهيد أعلى بكثير في مجموعة الأطفال المصابين باضطراب طيف التوحد (المجموعة المرضية) مقارنةً بالمجموعة الشاهدة كاملة (دون تقسيمها الأخيرة لمجموعتين: أخوة/غير أخوة)، وبإجراء اختبار مان-ويتني، تبين وجود فارق إحصائي يُعند به بين هاتين المجموعتين ( $P=0.0001$ )، وعندما قُسمت مجموعة الشواهد إلى قسمين، وُجدت مستويات المالون دي أدهيد في المجموعة المرضية أعلى بكثير مقارنةً بالشواهد غير

الجدول (8): مقارنة قيم MDA باستخدام اختبار Mann-Whitney U test بين المجموعة المرضية ومجموعة الشواهد غير الأخوة

	MDA
Mann-Whitney U	0.0001
Wilcoxon W	120.000
Z	-5.420-
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.0001

التوحد، مما يشير إلى وجود علاقة ارتباط بين هذا المؤشر وبين اضطراب طيف التوحد. ويوضح أيضاً دور الإجهاد التأكسدي في إحداث هذا الاضطراب، وإمكانية استخدام مؤشرات للتشخيص المبكر ومراقبة هذا الاضطراب. ويُعدّ الدماغ، مقارنةً بالأعضاء الأخرى، معرض بشكل خاص للإجهاد التأكسدي لأسباب عدّة: (1) تستخدم خلايا الدماغ البشري 20% من الأكسجين الذي يستهلكه الجسم، وهي تشكل 2% فقط من إجمالي وزن الجسم، مما يشير إلى أن الدماغ يولّد العديد من الجذور الحرة بشكل أكبر من الأنسجة الأخرى. (2) تحتوي مناطق مختلفة من الدماغ على تركيز عالية من الحديد، والتي يمكن أن تحفز توليد الجذور الحرة. (3) الدماغ غني بالدهون مع الحموض الدسمة غير المشبعة، وتعدّ هذه أهدافاً للأكسدة. (4) يمتلك الدماغ أنظمة وقائية (مضادات أكسدة) منخفضة إلى متوسطة مقارنةً بالكلية أو الكبد (Ralf, 2000, 650). وكلّ هذه الأسباب تدلّ على ارتباط الاضطرابات العصبية (منها اضطراب طيف التوحد) بالإجهاد التأكسدي، ودوره في إحداث الأذية المباشرة أو غير المباشرة، التي تساهم بحدوث اضطراب طيف التوحد.

الأخوة، ولُوحظ وجود فارق إحصائي يُعدّ به بين هاتين المجموعتين ( $P=0.0001$ )، وكذلك عند مقارنة نتائج مجموعتي الشواهد الأخوة والشواهد غير الأخوة بواسطة اختبار مان-ويتني، تبيّن وجود فارق إحصائي يُعدّ به بين هاتين المجموعتين ( $P=0.0001$ )، وكل هذه النتائج تشير إلى دور الإجهاد التأكسدي في إحداث اضطراب طيف التوحد، وإمكانية استخدام مؤشرات للكشف المبكر عن هذا الاضطراب ومراقبته.

أمّا عند مقارنة نتائج المجموعة المرضية ومجموعة الشواهد الأخوة، لُوحظ عدم وجود فرق كبير في مستويات المالون دي أدهيد بين هاتين المجموعتين، وبتطبيق اختبار مان-ويتني، تبيّن عدم وجود فارق إحصائي يُعدّ به ( $P=0.656$ ). مما يشير إلى دور الوراثة في إحداث اضطراب طيف التوحد، كما يشير إلى دقة مؤشر المالون دي أدهيد الضعيفة في حال استخدامه بمفرده للكشف المبكر عن اضطراب طيف التوحد.

• **مقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة**  
وافقت نتائج هذه الدراسة العديد من نتائج الدراسات السابقة، من حيث ارتفاع مستويات المالون دي أدهيد في المجموعة المرضية مقارنةً بالمجموعة الشاهدة ( $P=0.0001$ )، ففي الدراسة التي أجراها (Ahmad, (Tawfeeq and Alameen, 2013, 9 في العراق، وجدوا ارتفاع يُعدّ به إحصائياً في مستويات هذا المؤشر ( $P\leq 0.05$ )، وكذلك بالنسبة لدراسة (Altun et al., 2018, 409 في تركيا، بالإضافة لدراسة (González-Fraguela et al., 2013, 313 في كوبا، حيث كانت النتائج  $P\leq 0.001$ ,  $P<0.001$  على التوالي.

• **اختبار كاي مربع للاستقلال لقيم MDA**  
يُتّضح من الجدول (10) وجود فارق يُعدّ به إحصائياً ( $P=0.0001$ ) في المجموعة المدروسة (المرضية والشاهدة) بالنسبة لمؤشر المالون دي أدهيد وحدوث اضطراب طيف

### الاستنتاجات: Conclusions

توصّلت هذه الدراسة إلى الآتي:

- وجود ارتفاع في مستويات الـ MDA ( 20.76 nmol/ml ) لدى الأطفال المصابين باضطراب طيف التّوحد مقارنةً بالشواهد السليمين، ممّا يدلّ على حدوث تدرّك للشحوم في أجسامهم، وعدم قدرة مضادات الأكسدة لديهم من إصلاح هذا الخل.
- التأكيد على حدوث اختلال بالتوازن بين مضادات الأكسدة والمؤكسدات عند الأطفال المصابين باضطراب طيف التّوحد.
- الإشارة إلى دور الإجهاد التأكسدي في إحداث اضطراب طيف التّوحد.
- إمكانية الاستفادة من المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي في تشخيص الأمراض والاضطرابات المختلفة، وذلك يتطلب متابعة الدراسة في هذا الموضوع.

### المقترحات: Suggestions

- متابعة الدراسة في هذا المجال، وقياس مؤشرات أخرى للإجهاد التأكسدي تكون أكثر دقة، ونوعيّة، خاصّةً المؤشرات المتعلّقة بأكسدة الحمض النووي DNA.
- قياس مستويات المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي عند مجموعة أكبر من الأطفال المصابين باضطراب طيف التّوحد، كذلك عند مجموعة أكبر من الشواهد السليمين بوجود صلة قرابة ودون وجود صلة قرابة مع الأطفال المصابين باضطراب طيف التّوحد.
- قياس مستويات المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي عند الأطفال المصابين باضطراب طيف التّوحد في عينات مختلفة للوصول إلى العينة الأنسب لإعطاء النتيجة الأفضل والأدق، لاعتماد هذه الطريقة لاحقاً في التّشخيص المبكر لاضطراب طيف التّوحد ومراقبة تطوره.

## References

1. Morris-Rosendahl, Deborah J. Crocq, Marc-Antoine. (2020). **Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept.** Dialogues in clinical neuroscience. V:22(1). p: 65-72.
2. Lim. S.-H. et al. (2021). **Nanoplasmonic immunosensor for the detection of SCG2. a candidate serum biomarker for the early diagnosis of neurodevelopmental disorder.** Scientific Reports. V:11(1). p. 764.
3. Abruzzo, P.M. et al. (2019). **Plasma peroxiredoxin changes and inflammatory cytokines support the involvement of neuro-inflammation and oxidative stress in Autism Spectrum Disorder.** Journal of Translational Medicine. v:17(1): p. 332.
4. Eissa, N. et al. (2018). **Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder.** Frontiers in neuroscience. V:12. p. 304.
5. Southwest Autism Research & Resource Center (SARRC). **Prevalence of Autism Increases by 10%, to 1 in 54 Children.** Autismcenter. 2020. URL: <https://autismcenter.org/prevalence-autism-increases-10-1-54-children>.
6. Amr, Mostafa. (2011). **Addressing autism in the Arab world.** Nature Middle east. p. 147.
7. Urs A. Boelsterli (2003). **Mechanistic Toxicology-the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets.** New York: United States. Taylor & Francis. p. 339.
8. Fridovich, Irwin. ( 2012). **Oxygen: How do we stand it? Medical principles and practice.** International journal of the Kuwait University. Health Science Centre. V:22. p. 131-137.
9. Sharifi-Rad,M. et al. (2020). **Oxidative Stress. and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases.** Lifestye. V:11 p:69.
10. Rezayian, M. V. Niknam. and H. Ebrahimzadeh. (2019). **Oxidative damage and antioxidative system in algae.** Toxicology Reports. V: 6: p. 1309-1313.
11. Jancic. S.A. and B.Z. Stosic. (2014). **Cadmium Effects on the Thyroid Gland. in Vitamins & Hormones.** G. Litwack. Editor. Academic Press. p. 391-425.
12. Ayala. A.. M.F. Muñoz. and S. Argüelles. (2014). **Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal.** Oxidative medicine and cellular longevity. p. 31.
13. McGill. M.R. and H. Jaeschke. (2013). **Oxidant Stress. Antioxidant Defense, and Liver Injury. in Drug-Induced Liver Disease.** N. Kaplowitz and L.D. DeLeve. Editors. Boston: United States. Academic Press. p. 71-84.
14. Cai. Z. (2005). **Lipid Peroxidation. in Encyclopedia of Toxicology.** P. Wexler Editor. New York: United States. Elsevier. p. 730-734.
15. Celi. P. and G. Gabai. (2015). **Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation.**V(48). p.13.
16. Gyurászová. M.. et al. (2018). **Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice.** Physiol Res. V:67(6). p. 921-934.
17. (2001) Biomarkers Definitions Working. G. **Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework.** Clin Pharmacol Ther. V:69(3). p. 89-95.
18. Tsikas. D. (2017). **Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges.** Anal Biochem. p. 13-30.

19. Morales. M. and S. Munné-Bosch. (2019). **Malondialdehyde: Facts and Artifacts**. Plant physiology. V:180(3). p. 1246-1250.
20. Giera. M., H. Lingeman. and W.M. Niessen. (2012). **Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview**. Chromatographia. V:75(9-10): p. 433-440.
21. Roede. J.R. and K.S. Fritz. (2015). **Hepatotoxicity of Reactive Aldehydes in Reference Module in Biomedical Sciences**. Elsevier. p. 14.
22. National Center for Biotechnology Information. **Compound Summary for Malonaldehyde**. PubChem. 12/January/2022. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malonaldehyde>.
23. Forman. H.J. and H. Zhang. (2021). **Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy**. Nature Reviews Drug Discovery. V:20(9). p. 689-709.
24. Ozsurekci. Y. and K. Aykac. (2016). **Oxidative Stress Related Diseases in Newborns**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. p. 1-9.
25. Islam. M.T. (2017). **Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders**. Neurol Res. V:39(1). p. 73-82.
26. Messina. A. et al. (2018). **Sympathetic, Metabolic Adaptations, and Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorders: How Far From Physiology?** Front Physiol. V:9. p. 6.
27. Nadeem. A. et al. (2019). **Dysregulated enzymatic antioxidant network in peripheral neutrophils and monocytes in children with autism**. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. V:88. p. 352-359.
28. Pierce. K. et al. (2009). **The power and promise of identifying autism early: insights from the search for clinical and biological markers**. Annals of clinical psychiatry : official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists. V:21(3). p. 132-147.
29. Haroon. M. (2019). **ABC of Autism 1st Edition**. John Wiley & Sons. P. 88.
30. T.Y. A. F. Tawfeeq. and S. Alameen. (2013). **Biochemical Studies of Autism Spectrum Disorder Patients in Mosul City**. Research Journal of Chemical Sciences. V:3. p. 8-15.
31. Altun. H. et al. (2018). **Assessment of malondialdehyde levels, superoxide dismutase, and catalase activity in children with autism spectrum disorders**. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology. V:28(4). p. 408-415.
32. González-Fraguela. M.E., et al. (2013). **Oxidative stress markers in children with autism spectrum disorders**. p. 307-317.
33. Dringen. R. (2000). **Metabolism and functions of glutathione in brain**. Progress in Neurobiology. V:62(6). p. 649-671.

