

النتائج المورثية والهرمونية التعبيرية دراسة تغير عن المسؤولية للمورثات TCDD عن التعرض لمركب مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في خلايا مبيض BALB/c إناث فئران

نور الضللي⁽¹⁾ و شادي سكرية⁽²⁾ و عبد السميع هنانو⁽³⁾

المخلص

تعدُّ الديوكسينات سموم عضوية هالوجينية مستمرة، يَظهر أثرها السُمي من خلال التفعيل المثابر للمستقبل Aryl-hydrocarbon Receptor (AhR) وهو بروتين مستقبل داخل خلوي، وبالتالي منعه من القيام بدوره في حفظ الاستتباب الداخلي. والذي يؤدي عند الفقاريات إلى تغيرات في التعبير المورثي للعديد من المورثات مما قد ينجم عنه تغيرات في نمو الخلايا وتمايزها وتغيرات في السبل الاستقلابية والإشارية وبالتالي خلل في التوازن الهرموني، وينتج عن كل ذلك أضراراً متعددة تختلف باختلاف نوع الكائن الذي يتعرض لها. فنظراً لعدم توفر معطيات معمّقة حول الآليات الجزيئية التي قد تحدث ضمن خلايا المناسل الأنثوية بعدَ عملية التجريع التجريبي لهذه المركبات وما يرافقها من أثر على عملية تكوين الستيروئيد والتي تؤثر على خصوبة الإناث المعرضة. فقد هدف هذا البحث إلى تحري الأثر السمي لمركب TCDD (2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin) التابع لعائلة الديوكسينات الأعلى سمية، من خلال دراسة التغير النسبي في التعبير المورثي عن العديد من المورثات ضمن مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين والمسؤولة عن نقل واستقلاب الكولسترول الضروري لتكوين

عن المسؤولة للمورثات TCDD الناتج عن التعرض لمركب المورثي والهرموني التعبير دراسة تغير
BALB/c مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في خلايا مبيض إناث فئران

الهرمونات الجنسية الموجودة في الخلايا الغمدية للمبيض وهي (*AhR, CYP1A1*,
(*LHR, CYP11A1, 3βHSD 2, HSD17B1, CYP19A1*) وذلك باستعمال تقانة
التفاعل السلسلي للبوليميراز الكمي في الزمن الحقيقي RT-qPCR. بالإضافة إلى
التحري عن التغيرات الهرمونية لهرمون الإسترايول ومعايرته بالطرق المناعية، إذ قمنا
بتجريب إناث فئران بالغة من السلالة BALB/c بجرعة واحدة فموياً وهي بعمر 10
أسابيع بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ من مركب TCDD، مقارنةً بمجموعة الشاهد.
توصلت نتائجنا إلى أن لمركب TCDD قدرة على تغيير التعبير المورثي عن أهم
المورثات المسؤولة عن نزع السمية و المورثات الأساسية ضمن مسار الاصطناع الحيوي
للإستروجين في المبيض لدى الإناث المعرضة وبشكل معتمد على تركيز الجرعة
المعطاة، مصحوباً بالاضطراب الهرموني لهرمون الإسترايول، وبالتالي إمكانية تغير
مستويات الأنزيمات الصانعة للستيروئيدات، وما لذلك من أثر على اصطناع الهرمونات
الستيروئيدية الضرورية في تنظيم وظيفة المبيض، الأمر الذي يمكن أن يؤدي إلى حدوث
اضطرابات في الخصوبة.

الكلمات المفتاحية: TCDD، AhR، المبيض، التعبير المورثي، هرمون الإسترايول،
RT-qPCR.

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

الجمهورية العربية السورية، nour.aldelli@damascusuniversity.edu.sy.

(2) الأستاذ المشرف، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، الجمهورية

العربية السورية، chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy.

(3) الأستاذ المشرف المشارك، مدير بحوث، هيئة الطاقة الذرية السورية، الجمهورية العربية

السورية، ashanano@oec.org.sy.

Investigation of Altered Gene Expression and Hormonal change Resulting from Exposure to TCDD of Genes Involved in the Estrogen Biosynthesis Pathway in Ovarian Cells of Female BALB/c Mice

N. Aldelli⁽¹⁾, Ch. Soukkarieh⁽²⁾, A. Hanano⁽³⁾

Abstract

Dioxins are persistent organic halogenated toxins. Their toxic effect appears through continuous activation of the Aryl-hydrocarbon Receptor (AhR), a receptor protein within cells, which prevents it from performing its role in maintaining homeostasis, which in vertebrates leads to changes in the gene expression of many genes, which may result in changes in cell growth and differentiation, changes in metabolic and signaling pathways, and thus an imbalance in hormonal balance. Thus, multiple damages appear that vary according to the type of organism that is exposed to it. Due to lack of data on molecular mechanisms that occur within the cells of the female gonads after experimental doses of these compounds and associated effect on the steroidogenesis, which affects fertility of exposed females.

the aim of this research is to investigate the toxicological effects of TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), which belongs to family of the most toxic dioxins, by studying the relative change in gene expression of several genes within estrogen biosynthesis pathway which responsible for transport and metabolism of necessary cholesterol for synthesis of sex hormones were present in the ovarian theca cells, the genes are (*AhR*, *CYP1A1*, *LHR*,

عن المسؤولة للمورثات TCDD الناتج عن التعرض لمركب المورثي والهرموني التعبير دراسة تغير
BALB/c مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في خلايا مبيض إناث فئران

CYP11A1, *3βHSD 2*, *HSD17B1*, *CYP19A1*) by using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). In addition, the hormonal changes of estradiol were performed by immunological essay. Where we dosed adult female mice of the BALB/c strain with a single oral dose at the age of 10 weeks, with two concentrations (25, 50) µg/kg of TCDD and compared them with the control group.

The results of our study concluded that TCDD has the ability to alter the gene expression of the most important genes responsible of dioxin detoxification and gens within the biosynthetic pathway of estrogen in the ovaries of exposed females, by depending on the concentration of the dose given, accompanied by the hormonal disruption of estradiol hormone, thus the possibility of changing levels of steroidogenesis enzymes, and the impact of this on the synthesis of steroid hormones, that necessary in regulating of ovarian function, which could ultimately lead to disorders in fertility

Keywords: TCDD, AhR, Ovarian, Gene Expression, Estradiol hormone, RT-qPCR.

-
- (1) Ph.D. Student, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic, nour.aldelli@damascusuniversity.edu.sy.
 - (2) Supervisor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic, chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy.
 - (3) Share Supervisor, Research Director, Syrian Atomic Energy Commission, Syrian Arab Republic, ashanano@oec.org.sy.

المقدمة:

"الديوكسينات" هو الاسم الشائع لعدد كبير من الملوثات البيئية القوية والثابتة، تتشكل كمادة ثانوية غير مرغوب بها، نتيجة العمليات الصناعية المتعددة كصناعة مركبات الكلورين والمبيدات الحشرية والصناعات المعدنية وصناعة البلاستيك من متعدد كلوريد الفينيل (Poly-Vinyl-Chloride (PVC) [1]، تتضمن الديوكسينات الكثير من المركبات لكن يعدُّ مركب رباعي كلورو ثنائي بنزو بارا ديوكسين (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) الذي يعرف اختصاراً بالـ (TCDD) المركب الأكثر أهمية من عائلة الهيدروكربونات الكلورة (polychlorinated-p- (PCDDs) و dioxins و polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) وذو معامل مكافئ سُمي Toxic Equivalency Factor (TEF) يساوي 1.0 [2]، ويعد أحد المواد الكيميائية التي تسبب اختلالاً بعمل الغدد الصماء endocrine-disrupting chemicals (EDCs) [3] وذلك نتيجة قدرته على أحداث اضطرابات في مسارات الإشارات للغدد الصماء والتي يمكن أن تسبب عيوباً خطيرة في النمو والتكاثر [4].

كما يغير TCDD من المظهر الهرموني للكائن الحي عن طريق ارتباطه بمستقبلات الهيدروكربونات العطرية Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)، وهو بروتين مستقبل داخل خلوي لمركب TCDD ينشط بواسطة الترابط مع عوامل الانتساخ، يرتبط بالحمض النووي في مواقع محددة تسمى عناصر الاستجابة للديوكسين Dioxin Response Elements (DREs) وهي تسلسلات خاصة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (Deoxyribonucleic acid (DNA)، والتي توجد في المنطقة المنظمة لانتساخ بعض المورثات الهدف. ولعلَّ أهمها المورثة (CYP1A1)، وهي من

عن المسؤولة للمورثات TCDD الناتج عن التعرض لمركب المورثي والهرموني التعبير دراسة تغير
BALB/c مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في خلايا مبيض إناث فئران

السيتوكرومات المؤكدة للمركبات الكيميائية المحبة للدهن Lipophilic كالدوكسينات،
ومن أهم المورثات المرمزة لأنزيم الاستقلاب الدوائي drug-metabolizing enzyme
في الطور الأول Phase 1 (CYP1A1) والذي يرمز له بالرمز P4501A1، حيث
يعمل مركب TCDD على تحريضها، يتبع ارتباط AhR مع DRE بتغيرات في شكل
الكروماتين، والاضطراب النووي في المنطقة المُنسخة من المورثة وتحرير mRNA
transcription [5] حيث يؤدي تنشيط AhR بواسطة TCDD غالباً إلى تغير تنظيم
التعبير المورثي [6]، ومجرد وجود AhR وظيفي يقوم بشكل أساسي بكبح النشاط
المورثي في الفئران، لكن تبقى الآليات الجزيئية لكبح الانتساخ المورثي من قبل AhR
مُفتقرةً إلى التعريف [7]. حيث أشارت الدراسات الوراثية في الفئران أن AhR يتحكم في
تكوين الجريبات عن طريق تحفيز موت الخلايا المبرمج apoptosis، مما يؤدي إلى
انهيار الخط الخلوي وتكوين الجريبات الابتدائية [8] إذ يلعب AhR دوراً في تنظيم نمو
الجريبات المبيضية وقدرتها على تنظيم وإنتاج هرمونات الستيروئيد الجنسية وفي عملية
الإباضة وتكوين الجسم الأصفر في المبيض. وبالتالي يتوسط AhR سمية المبيض
للمواد الكيميائية الغريبة [2].

ركزت الدراسات السابقة على النشاط الأنزيمي في مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين
باستخدام الخلايا المعاملة بال TCDD ضمن أوساط صناعية *invitro* مع وجود
اختلافات في النتائج، لكن تعتبر دراستنا هي الأولى من نوعها في تحديد الآلية التي
يعمل من خلالها ال TCDD على منع تكوين الستيروئيد وذلك ضمن وسط حي
invivo، إذ أن المعرفة الأساسية لمسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في المبيض
ضرورية لفهم كيف يمكن أن تؤثر المواد السامة وبالتحديد الديوكسين رباعي الكلور
(TCDD) على خصوبة الإناث وهو محور هذا البحث. والأثر الذي يحدثه هذا المركب
على النشاط الأنزيمي في مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين من خلال تأثيره المباشر

على الجريبات الغارية (الجريبات المبيضية الحويصلية) antral follicles ومنع اصطناع الهرمونات الستيروئيدية، حيث تُصنَّع الهرمونات الستيروئيدية بشكل رئيسي في المبيض ضمن الخلايا الحبيبية Granulosa cells والخلايا الغمدية Theca cells المحيطة ببويضة الجريب الناضج وتعد الأنزيمات المسؤولة عن اصطناع الستيروئيدات Steroidogenesis enzymes رئيسة من أجل القيام بالوظائف الفيزيولوجية الأساسية مثل التكاثر [9]. حيث يعتمد التكاثر في الثدييات على عملية الإفراز الهرموني من الغدد التناسلية كالهرمون الملوتن (LH) Luteinizing Hormone والهرمون المنبه للجريب Follicle-Stimulating Hormone (FSH) اللذان يعملان معاً لتنظيم وظيفة المبيض [10]، اذ يعمل كلاً من FSH مع الإستروجين بالتآزر مع عوامل النمو في الجريبات ما قبل الإباضة في تحريض المستقبلات الموجودة على الخلايا الحبيبية للهرمون LH والذي يدعى مستقبل الهرمون الملوتن (LHR) Luteinizing Hormone Receptor وهو بروتين سكري مقترن ببروتين G يقع على غشاء البلازما لخلايا الغدد التناسلية، يؤدي ارتباط المستقبل بـ LH إلى تنشيط مسارات تحويل الإشارة التي تنظم تمايز الخلايا ونتاج الستيروئيد وذلك نتيجة تحريض انتساخ المورثات المرمرزة للأنزيمات الهامة في الاصطناع الهرموني [11]. اذ تعمل الأنزيمات المفتاحية (3-beta CYP11A1 (Cytochrome P45011A1), 3βHSD2 (3-beta hydroxysteroid dehydrogenase 2), HSD17B1 (hydroxysteroid dehydrogenase 17B1), CYP19A1 (CytochromP450 19) الموجودة في الخلايا الغمدية على اصطناع الهرمونات الستيروئيدية [1].

فنظراً لأهمية المورثات المرمرزة لتلك الأنزيمات في خلايا المبيض والضرورية لتحويل الكولسترول بواسطة بروتين ناقل ينظم انتقاله ضمن المتقدرات الحيوية بكميات محددة

عن المسؤولة للمورثات TCDD الناتج عن التعرض لمركب المورثي والهرموني التعبير دراسة تغير
BALB/c مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في خلايا مبيض إناث فئران

يدعى بروتين Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) إلى هرمون
البريغنينولون، ومن ثم البروجستيرون وتحويله في النهاية إلى هرمون بيتا الإسترايول
Estradiol وهو الإستروجين الأساسي المفرز من المبيض [12]، والضروري في
خصوبة الثدييات، لأنه يساعد على تطور الجريبات المبيضية [13]. فقد هدفت دراستنا
إلى تتبع الأثر السمي لمركب TCDD باستكشاف التأثيرات المعتمدة على كمية الجرعة
المُعطاة، من خلال التغير النسبي في التعبير المورثي لأهم المورثات المسؤولة عن نزع
السّمية (*AhR, CYP1A1*) والمورثات الرئيسية في مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين
(*LHR, CYP11A1, 3βHSD 2, HSD17B1, CYP19A1*) والممرزة للأنزيمات
المذكورة أعلاه، بالإضافة إلى التحري عن التغيرات الهرمونية لهرمون الإسترايول وبالتالي
تأثيرها في خصوبة الإناث المعرضة للديوكسين رباعي الكلور.

مواد وطرق البحث:

المواد الكيميائية:

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

حيوانات التجربة:

شملت الدراسة (40) فأر مختبري من نوع Albino mouse سلالة BALB/c، وجميعها من الإناث بعمر 10 أسابيع، ومتوسط وزن يُعادل (24-23 غرام). تمّ العمل على إكثار الفئران ومن ثم معاملتها بالمادة المدروسة في وحدة انتاج الحيوانات المخبرية في هيئة الطاقة الذرية السورية، وضعت الفئران في أقفاص بلاستيكية ذات أغطية معدنية مفروشة بنشارة خشب ناعمة. وزودت بالماء بواسطة زجاجات، كما زودت بالغذاء حسب قواعد العليقة القياسية في البيت الحيواني. والحفاظ عليها ضمن شروط رعاية نموذجية بنظام إضاءة 12 ساعة ضوء/ ظلام، ودرجة رطوبة نسبية (50-60%)، ودرجة حرارة (22) درجة مئوية.

طريقة العمل:

قسمت حيوانات الدراسة إلى أربع مجموعات، تضمنت كل مجموعة عشرة فئران وجُرعت فموياً لمرة واحدة كالتالي

- 1- مجموعة تجريبية مُجرعة بجرعة قدرها 50 مكغ/كغ من TCDD.
- 2- مجموعة شاهدة مُجرعة بجرعة قدرها 50 مكغ/كغ من زيت الذرة.
- 3- مجموعة تجريبية مُجرعة بجرعة قدرها 25 مكغ/كغ من TCDD.
- 4- مجموعة شاهدة مُجرعة بجرعة قدرها 25 مكغ/كغ من زيت الذرة.

. جمع أمصال الدم وعضو المبيض:

تمت التضحية بالحيوانات بعد أسبوع واحد من التجريع، حيث سُحبت عينات الدم 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. ومن ثم سُرحت الفئران، وأُستخرج عضو المبيض (الأيمن والأيسر) منها، ثم وزنت بميزان الكتروني وحُفظت عينات المبيض بالآزوت السائل لغرض الدراسة الجزيئية عليها.

. تقدير هرمون الإستراديول (E2) في المصل:

حُدثت مستويات هرمون الإستراديول في المصل (عدد الأمصال الكلي 24، n = 6/مجموعة). عن طريق كاشف عمل تجاري إليزا خاص لمعايرة هرمون الإستراديول E2 الخاصة بالفئران من شركة (MYBioSource, USA). باستخدام المقايسة المناعية الأنزيمية التثبيطية التنافسية The Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay technique، وُحُل طبقاً لتعليمات الشركة الصانعة.

. استخلاص الرنا الكلي RNA total من المبيض وتحويله إلى دنا متمم cDNA

وأجراء تجارب التفاعل السلسلي للبوليميراز الكمي في الزمن الحقيقي (RT-PCR):

استُخلص الرنا الكلي (RNA total) Ribonucleic acid total من نسيج المبيض باستخدام محلول Trizol، من ثم قيس تركيزه بواسطة جهاز قياس تراكيز الحموض النووية Nano Drop (Nano Drop technologies, Qiagen, Germany). وُصممت البادئات النوعية للمورثات الهدف (*AhR*, *CYP1A1*, *LHR*, *CYP11A1*, *3βHSD 2*, *HSD17B1*, *CYP19A1*) والمورثة المرجعية *β-actin* بالعودة إلى قاعدة البيانات NCBI، والتسلسلات موضحة في الجدول 1. ومن ثم حُصِر الدنا المتمم

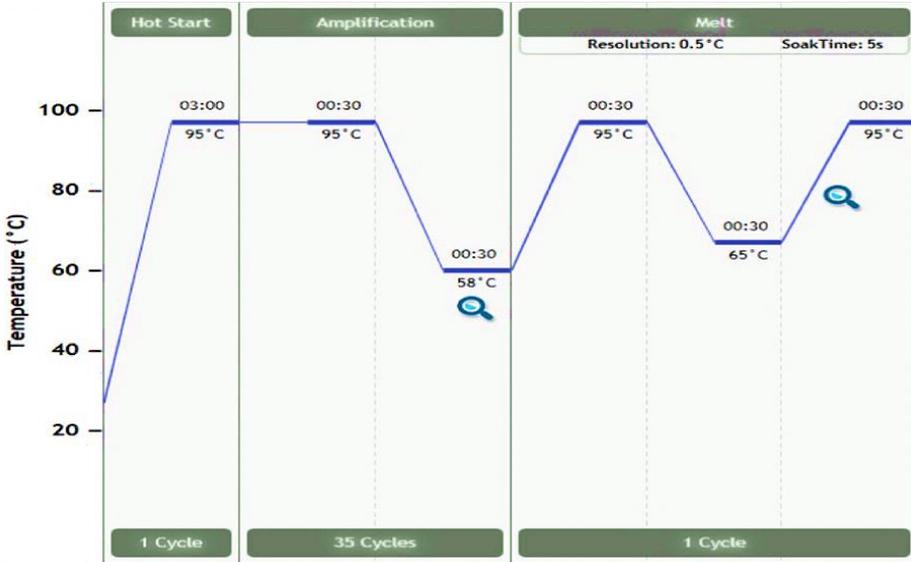
cDNA بدءاً من الرنا النقي بواسطة كاشف عمل (M-MLV Reverse Transcriptase, SIGMA, USA). وُدس التعبير المورثي للمورثات الهدف، باستعمال كاشف عمل خاص (SYBR Green-PCR Kit, QIAGEN, Germany). وحُضِر مزيج التفاعل بحجم نهائي قدره 20 ميكرو لتر، وبادئات نوعية بما يعادل 1-0,5 ميكرومولر، وكمية cDNA بحدود 200 نانوغرام/التفاعل. وأجري التفاعل بواسطة جهاز

Real Time-quantitative Polymerase chain reaction (RT-qPCR)

من نوع (Real-Time qPCR System. Agilent technologies USA) لمدة 35 دورة، ودرجة حرارة تهجين 58 درجة مئوية، أتبع التفاعل بإنجاز منحني الانصهار لضمان تجانسية منتج PCR كما في الشكل 1

الجدول 1: التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في هذه الدراسة.

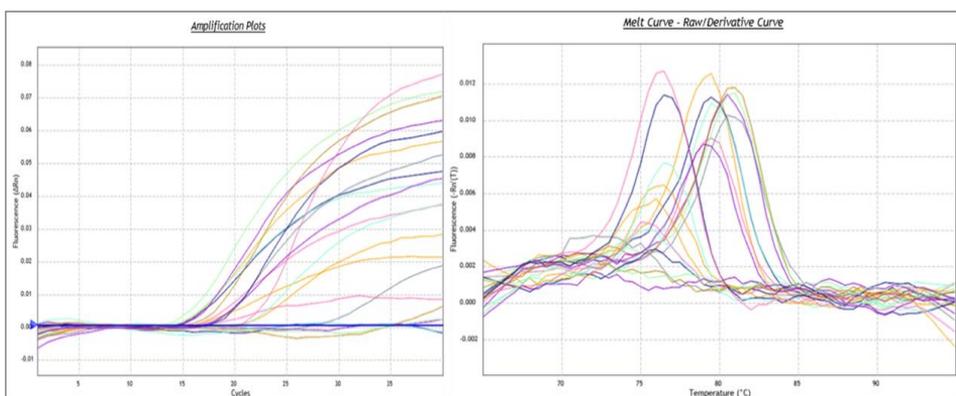
المورثات Genes	المرنسة المباشرة Forward primer	المرنسة العكسية Reverse primer
<i>AhR</i>	5'-TCCACCGCTGCTGGTGAGGT-3'	5'-CTGCTGCTGGCAAGCCGAGT-3'
<i>CYP1A1</i>	5'-CCTGTGGTGGTGTGAGCGG-3'	5'-CAGGGCATTCTGGGCCAGGC-3'
<i>CYP11A1</i>	5'-CACTTCTGGAGGGAGAGTGGC-3'	5'-AGTATCGACGCATCCTTGGGG-3'
<i>LHR</i>	5'-TGGAGTGCACAGTGAGACAGC-3'	5'-GGTTTGTCCCGAGCCATCCT-3'
<i>3βHSD 2</i>	5'-TGCCAGGGCATCTCTGTTGT-3'	5'-AGAGTTGGGCCCTGCAACAT-3'
<i>Hsd17B1</i>	5'-TCTGCCAGACATGAAGAGGCG-3'	5'-CACTGCCCCACACTCGATGA-3'
<i>CYP19A1</i>	5'-ATGCTGATTGCAGCCCTGA-3'	5'-GGCTGGTACCGCATGCTTTC-3'
<i>β-Actin</i>	5'-TCCAGGCTGTGCTGTCCCTGT-3'	5'-ACGCAGGATGGCGTGAGGGA-3'



الشكل 1 برنامج تشغيل جهاز RT-qPCR

الدراسة الإحصائية: دُرِس التغير النسبي في التعبير المورثي للمورثات الهدف بالنسبة للمورثة المرجعية β -actin في المجموعات الأربعة، من خلال التفاعل التسلسلي للبوليميراز الكمي في الزمن الحقيقي RT-qPCR. وتم تحليل منحنيات الانصهار بواسطة برمجية خاصة بالجهاز. كما يبين الشكل 2 نواتج التضخيم في هذا التفاعل، حيث وزعت حيوانات التجربة على 4 مجموعات، تضمنت كل مجموعة 10 فئران وتم اختبار التعبير المورثي للمورثات الهدف لجميع الفئران في المجموعات الأربعة، إذ أنجزت 3 مكررات لكل فأر وحسب المتوسط الحسابي لقيم Cycle threshold (Ct) للمكررات الثلاثة وللحيوانات العشرة، وحُسب التغير النسبي في التعبير الكمي (RQ) Relative Quantification للعينات المعاملة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ من TCDD والعينات الشاهدة كلٌّ على حدة وذلك من خلال العلاقة التالية: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

تم تحليل العينات باستخدام البرنامج الإحصائي GraphPad prism9، وحساب القيمة الاحتمالية (p-value) بإتباع النمط One-way ANOVA-Ordinary، تُبين جميع النتائج أن ($p < 0.05$)، وبالتالي يكون الفرق معنوي كما يوضح الجدول 2.



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

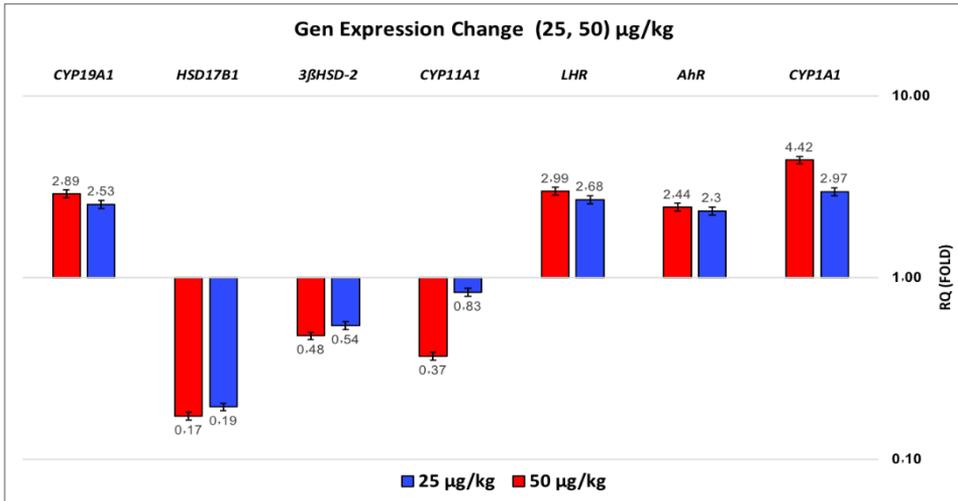
الجدول 2: يوضح قيم p-value في المجموعات المدروسة من تعبير مورثي للمورثات المدروسة، ومعايرة هرمون E2.

E2	CYP19A1	HSD17B1	3βHSD 2	CYP11A1	LHR	CYP11A1	AhR	p-value
ELISA	RT-PCR							
<0.0001	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	25 مكغ/كغ
<0.0001	0.0009	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	50 مكغ/كغ

النتائج:

. نتائج تغير التعبير المورثي للمورثات (*AhR*, *CYP1A1*, *LHR*, *CYP11A1*, *3βHSD 2*, *HSD17B1*, *CYP19A1*) في مبيض الاناث المجرعة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ من TCDD:

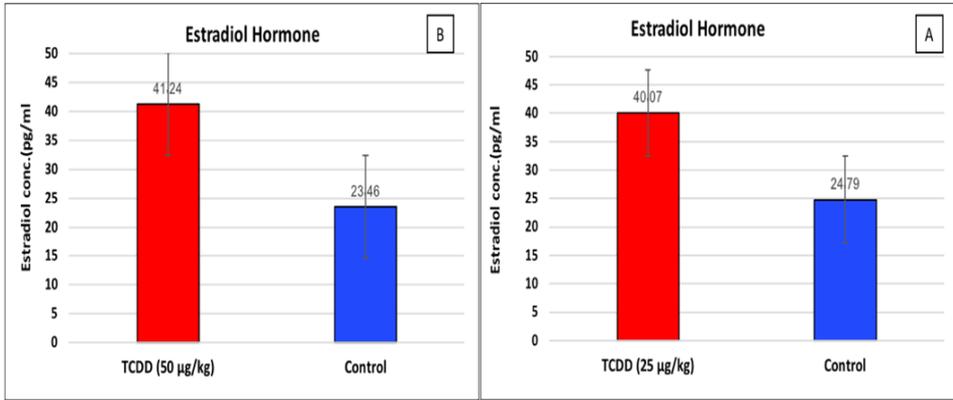
بيّنت النتائج ارتفاعاً معنوياً في التعبير عن المورثات (*AhR*, *CYP1A1*, *LHR*, *CYP11A1*) وذلك عند اناث المجموعات المجرعة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ من TCDD (p<0.05) حيث لوحظ الإرتفاع عند مجموعة التركيز المرتفع 50 مكغ/كغ بشكل أكبر من مجموعة التركيز المنخفض 25 مكغ/كغ. بينما أظهرت نتائجنا انخفاضاً معنوياً في التعبير عن المورثات (*CYP11A1*, *3βHSD 2*, *HSD17B1*) لدى المجموعات المجرعة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ من TCDD (p<0.05). حيث لوحظ الإنخفاض عند مجموعة التركيز المرتفع 50 مكغ/كغ بشكل أكبر من مجموعة التركيز المنخفض 25 مكغ/كغ كما هو موضح في الشكل 3.



الشكل 3. مخطط يوضح الفروقات النسبية RQ في تغير التعبير عن المورثات (*AhR*, *CYP1A1*, *LHR*, *CYP11A1*, *3βHSD 2*, *HSD17B1*, *CYP19A1*) للمورثات المدروسة بحسب اختلاف التراكيز المعطاة، يمثل المحور Y لوغاريتم قيم RQ للمورثات الهدف في عينات المبيض عند التركيزين 25 و 50 مكغ/كغ، والذي يُظهر ارتفاعاً في التعبير عن المورثات (*AhR*, *CYP1A1*, *LHR*, *CYP19A1*) وذلك عند اناث المجموعات المجرعة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ من TCDD (p≤0.05) وانخفاضاً في التعبير عن المورثات (*CYP11A1*, *3βHSD 2*, *HSD17B1*) لدى المجموعات المجرعة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ (p<0.05).

. نتائج اختبار هرمون الإستراديول.

بينت النتائج بعد اجراء اختبار الإليزا الخاص بهرمون الإستراديول في عينات مصل دم الفئران للمجموعات التجريبية والشاهدة، ارتفاعاً معنوياً في هرمون الإستراديول في المجموعات التجريبية لدى الاناث المجرعة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ مقارنةً مع المجموعات الشاهدة ($p < 0.05$). كما هو موضح في الشكل 4.



الشكل 4. مخطط بياني يوضح الفروقات النسبية في عينات مصل دم الفئران للمجموعات التجريبية والشاهدة، A يظهر ارتفاعاً في هرمون الإستراديول في المجموعة التجريبية لدى الاناث المجرعة بالتركيز 25 مكغ/كغ مقارنةً مع المجموعة الشاهدة. B يظهر ارتفاعاً في هرمون الإستراديول لدى الاناث المجرعة بالتركيز 50 مكغ/كغ مقارنةً مع المجموعة الشاهدة.

المناقشة:

يُعد تفعيل مسار AhR الخطوة الأولى في السُمية الناجمة عن الديوكسين اذ يتميز مركب TCDD بألفته الكبيرة للمستقبل AhR، والتي ينتج عنها العديد من الاستجابات الكيميائية الحيوية، فعند ارتباط مركب TCDD بالمعقد AhR-ARnt يرتبط الكل إلى انتساح المورثة *CYP1A1*، مما يؤدي إلى زيادة انتساح أو التعبير عن هذه المورثة [6]، حيث يقوم الإنزيم *CYP1A1* بأكسدة الديوكسينات بهدف إزالة سُميتها وجعلها أكثر قطبية وتسهيل تفككها بالإضافة إلى طرحها في المنظومة الحية [14]، حيث أظهرت الدراسات السابقة أن الاستجابة للديوكسينات تتمثل في زيادة التعبير المورثي عن المورثة *CYP1A1* [15]، وبالفعل توافقت نتائج دراستنا مع هذه الدراسات، إذ تُبين وجود زيادة في التعبير عن المورثات المسؤولة عن نزع السُمية (*AhR, CYP1A1*) وذلك عند المجموعات المجرعة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ. حيث لوحظ الإرتفاع عند مجموعة التركيز المرتفع 50 مكغ/كغ بشكل أكبر من مجموعة التركيز المنخفض 25 مكغ/كغ، الأمر الذي قد يعود إلى الأثر السمي الكبير عند التركيز المرتفع.

كما ركزت دراستنا على تتبع الأثر السمي لمركب TCDD في تغير التعبير المورثي لمورثات (*CYP11A1, 3βHSD2, HSD17B1*)، وذلك نظراً لأهمية تلك المورثات المرمة للأنزيمات المفتاحية في مسار الاصطناع الحيوي للهرمونات الستيروئيدية في خلايا المبيض. حيث تعمل الأنزيمات المصنعة للستيروئيدات، كما هي حال عائلة السيتوكروم P450CYP، على تحفيز عملية التمثيل الغذائي للكولسترول لتشكيل هرمونات الستيروئيد [16] إذ أن الخطوة الأولى المحددة لمعدل تحفيز تكوين الستيروئيد تتم من خلال أنزيم P450scc المُرْمَز بواسطة المورثة *CYP11A1*. يتم التعبير عن هذه المورثة بمستوى عالي في الخلايا الغمدية مما يحفز من تطور الجريبات النامية في المبيض، كما أنها ضرورية في تحويل الكولسترول إلى هرمون البريغنينولون [12]، فقد

أثبتت الدراسات في خلايا حبيبية بشرية المزروعة *invitro* خلال عدة نقاط الزمنية، تناقص في مستوى التعبير عن *CYP11A1* في المبيض بفعل سمية مركب TCDD [4].

تُرمز المورثة *3βHSD 2* أنزيم *3βHSD* المشارك في إنتاج العديد من الهرمونات، حيث يتوسط عملية تحويل هرمون البريغنينولون إلى هرمون البروجستيرون في كلا النمطين من الخلايا الغمدية والحبيبية في المبيض، كما يتوسط عملية تحوّل هرمون De Hydro Epi Androsterone (DHEA) 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* [9]، 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 [17] كما تسبب متلازمة تضخم الغدة الكظرية الخلقي التي تضعف إنتاج الهرمونات وتعطل النمو والنضج الجنسي [9].

بالنسبة للمورثة *HSD17B1* فهي تُرمز الأنزيم *HSD17B1*، الذي يعمل على تحويل هرمون الأندروستيديون A4 إلى هرمون التستوستيرون T وتحويل هرمون الإسترون E1 إلى الإستراديول E2 17-بيتا (17β-Estradiol) ضمن الخلايا الحبيبية للجريب. وانخفاض هذا الأنزيم يعني انخفاض القدرة على افراز تلك الهرمونات الستيروئيدية وتغيير مسار الموت الخلوي المبرمج في الجريبات المبيضية [1]. فقد أظهرت نتائجنا انخفاضاً في التعبير عن المورثات (*CYP11A1, 3βHSD 2, HSD17B1*) وبشكل معتمد على

عن المسؤولة للمورثات TCDD الناتج عن التعرض لمركب المورثي والهرموني التعبير دراسة تغير
BALB/c مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في خلايا مبيض إناث فئران

الجرعة في المجموعات التجريبية المُعاملة بالتركيزين (25, 50) مكغ/كغ من TCDD وبالتالي انخفاض في قدرة تحويل الكولسترول إلى البريغنينولون نتيجة انخفاض التعبير عن *CYP11A1* والذي ترافق مع انخفاض التعبير عن *HSD17B1* و *3βHSD 2* مما يؤدي إلى اضطراب هرمونات الستيروئيد الجنسية.

طبيعياً يتم التعبير عن المورثة *LHR* وبشكل أساسي في أنسجة الغدد التناسلية وعلى نطاق واسع في خلايا المبيض [11]. إذ يلعب الهرمون الملوتن دور هام في العملية التناسلية عند الإناث، حيث يرتبط بالمستقبل الخاص به من نمط المقترن ببروتين *G* ليشكل مستقبل *LHR* وبالتالي يتم تفعيل مسار إشاري بواسطة المرسل الثانوي ينتهي بتحفيز انتساح الجينات المرمزة للأنزيمات الهامة في الاصطناع الهرموني [10]

ففي دراسة تم فيها التعرض المزمن في جردان Sprague Dawley بمركب ال TCDD لجرع متزايدة (1, 5, 50, 200) نانوغرام/كغ/أسبوع، إلى أن تم التضحية بها في عمر 11 شهر، فقد تبين انخفاض التعبير المورثي ل *17 α-hydroxylase* وانخفاض التعبير عن *LHR* والذي أدى إلى انخفاض الاصطناع الحيوي لهرمون الإستراديول. [18].

لكن على العكس أظهرت نتائجنا ارتفاعاً في التعبير المورثي عن (*LHR, CYP19A1*) والذي ترافق مع ارتفاع هرمون الإستراديول في كلا المجموعتين التجريبية لكن لوحظ الإرتفاع عند مجموعة التركيز 50 مكغ/كغ بشكل أكبر من مجموعة التركيز 25 مكغ/كغ.

حيث أشارت دراسة بأن ارتفاع التعبير عن *LHR* مرتبط بحدوث سرطان المبيض Ovarian Cancer (OC) حيث تم تحديد كمية تركيز *LHRmRNA* في الأنسجة المأخوذة من عدد كبير من المرضى الذين يعانون من سرطان المبيض، وتوصلت

الدراسة إلى أنه لا يتم التعبير عن LHR (LHR-I, LHR-P) بدرجة عالية فحسب بل أيضاً يرتبط بدرجة الورم والمراحل المرضية المتقدمة، كما يؤدي التحفيز المفرط ل hCG/LH إلى تعزيز قابلية الإصابة بسرطان المبيض [19].

أما المورثة *CYP19A1* فهي مُرمزة لإنزيم الأروماتاز *aromatase* الموجود في الشبكة الإندوبلازمية، يقوم هذا الإنزيم بتحويل هرمون الأندروجين إلى الإستروجين وبالتحديد هرمون الإستراديول 17 بيتا E2 (الذي قمنا بالكشف عنه ومعايرته في المجموعات التجريبية والشاهدة). يختلف نشاط الأروماتاز باختلاف أنواع الخلايا وذلك اعتماداً على حاجة الخلايا للإستروجين، لذا يكون أكثر نشاطاً في المبيض لدى الإناث، حيث يوجه التطور الجنسي في كل من الذكور والإناث [20]. لكن في بعض الحالات تؤدي زيادة تحويل هرمون الأندروجين إلى الإستروجين إلى حدوث متلازمة فرط الأروماتاز [21]، أي زيادة إنتاج هرمون الإستروجين [22]، وحدثت أمراض كسرطان المبيض والثدي [23, 24]، [23]. فقد أظهرت دراسة سابقة على خطوط خلوية معزولة من خلايا سرطان المبيض، إلى ارتفاع التعبير المورثي لـ *CYP19A1* في الخطوط (HOSE, PEO14, PEO4, BG1) الخلوية الظهارية لسرطان المبيض والذي ترافق مع ارتفاع التعبير عن هرمون الإستراديول [24]. وهذا ما أظهرته نتائجنا أيضاً بارتفاع التعبير عن *CYP19A1* والذي ترافق مع ارتفاع هرمون الإستراديول لدى كلا المجموعتين التجريبية الأمر الذي قد يعتبر مؤشر خطورة كبير في حدوث سرطان المبيض.

كما توصلت دراسة حديثة حول التأثير على تنظيم التعبير المورثي عن *CYP19A1* من خلال (زيادة التعبير عنه أو إسكاته) في الخلايا الحبيبية عند الماعز (GCs) Granulosa Cells. حيث أدت عملية إسكات التعبير عن *CYP19A1* لانخفاض

عن المسؤولة للمورثات TCDD الناتج عن التعرض لمركب المورثي والهرموني التعبير دراسة تغير
BALB/c مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين في خلايا مبيض إناث فئران

مستوى mRNA ل *CYP19A1* ولكنه زاد من مستويات mRNA لكل من *StAR* و *CYP11A1* و *3βSHD*، لكن أدى التعبير الزائد عن *CYP19A1* إلى زيادة مستويات mRNA ل *CYP19A1*، بينما أدى إلى تثبيط مستويات mRNA لكل من *StAR* و *CYP11A1* و *3βSHD* [25]. وهذا ما يتفق مع نتائجنا فقد أدى ازدياد التعبير عن *CYP19A1* لانخفاض التعبير عن *CYP11A1* و *3βSHD* و *HSD17B1*، حيث يعزى السبب إلى أن *CYP19A1* يمنع التعبير عن *STAR* و *CYP11A1* و *3βSHD*، بعد الإفراط في إفراز هرمون الاستروجين والبروجسترون في الجسم من خلال تنظيم التقييم الراجع السلبي، وبالتالي استقرار تخليق الهرمونات في الجسم. وبالمثل، يتم تحسين مستويات mRNA لمورثات *STAR* و *CYP11A1* و *3βSHD* من خلال تنظيم التقييم الراجع السلبي عندما يكون هناك إفراز غير كافٍ للإستروجين والبروجسترون في الجسم، مما يزيد من استقرار إفراز الهرمون [25].

أخيراً نتوصل إلى أن التعبير غير الطبيعي عن *CYP19A1*، من المحتمل أن يكون له تأثير على إفراز هرمون الاستراديول والتعبير عن المورثات المرتبطة مثل (*CYP11A1*, *HSD17B1*, *3βSHD*) مما قد يؤثر على تكاثر الخلايا الحبيبية. كما أن هذه الدراسات والنتائج ستساعدنا على دعم فكرة الأثر السمي المختلف لمركب TCDD على التعبير المورثي في أنسجة المبيض ولكن بطريقة معتمدة على الجرعة من خلال تأثير المورثات كال *CYP19A1* وغيرها من المورثات الأخرى في المسار المهم والضروري في الاصطناع الهرموني ضمن الخلايا الحبيبية والغمدية للمبيض. كما أن الآليات الكامنة وراء قدرة تأثير هذه المواد السامة على أحداث تأثيرات متباينة على مستوى التعبير المورثي والهرموني يُمكن أن تعود إلى اختلاف آليات استقلاب TCDD، وعليه يختلف الأثر السمي لمركب TCDD باختلاف تراكيز الجرعة المُعطاة، واختلاف الأساليب التجريبية *invitro* أو *invivo*، والنموذج الحيواني المستخدم.

الاستنتاجات:

تقدم نتائج دراستنا دليلاً على أهمية التركيز على سميّة مركب TCDD على المبيض من خلال تحديد الآلية الجزيئية التي يعمل من خلالها ال TCDD على منع تكوين الستيروئيد عن طريق تعديل منظومة التعبير المورثي والتي يمكن أن تؤدي في النهاية إلى اضطرابات في الخصوبة. إذ بيّنت النتائج ما يلي:

- 1 - تغيّر التعبير المورثي عن أهم المورثات المسؤولة عن نزع السمية والمورثات الأساسية ضمن مسار الاصطناع الحيوي للإستروجين.
- 2 - اضطراباً هرمونياً لهرمون الإستراديول في خلايا المبيض لدى اناث فئران BALB/c، وبشكل معتمد على تركيز الجرعة.

التوصيات:

- 1 - التحري عن تأثيرات سميّة مركب TCDD في تغيّر التعبير المورثي على فترات زمنية مختلفة من عمر الإناث.
 - 2 - التحري عن التغيرات الهرمونية لهرمون البروجسترون، لكونه يعمل سوية مع هرمون الإستروجين لحدوث عملية الإباضة ونجاحها.
- مما يزيد من معرفتنا بشكل أكبر للآثار الناجمة عن السموم البيئية على الصحة الإنجابية وخصوبة الإناث.

- 1.KARMAN B.N., MALLIKARJUNA S., BASAVARAJAPP A., PATRICK H., and JODI A., FLAW S., 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): p. 1-12.
- 2.VILUKSELA M., and POHJANVIRTA R., 2019. Multigenerational and transgenerational effects of dioxins, International journal of molecular sciences, 20(12): p. 2947.
- 3.KARMAN B.N., MALLIKARJUNA S., BASAVARAJAPP A., ZELIEANN R., CRAI G., JODI A., FLAW S., 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): p. 88-96.
- 4.BALADRIGE M., MARKS GT., RAWLINS RG., HUTZ RJ., 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: p. 57-61.
- 5.HANKINSON O., 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor, Archives of biochemistry and biophysics, 433(2): p. 379-386.
- 6.TIJET N., PAUL C., BOUTROS D., MOFFA T., ALLAN B., OKEY J T., and POHJANVIRTA R., 2006. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries, Molecular pharmacology, 69(1): p. 140-153.
- 7.RIDDICK D.S., LEE C., BHATHENA A., YOAV E., TIMSI T., CHENG P-Y., EDWARD T M., RUSSELL A P., SHARON L., KRISTY K R., MILLER M., JAHAN A., AND JOHN Y L C., 2004. Transcriptional suppression of cytochrome P450 genes by endogenous and exogenous chemicals, Drug Metabolism and Disposition, 32(4): p. 367-375.
- 8.BENEDICT J C., TIEN-MIN L., LOEFFLER I K., RICHARD E., PETERSON R., JODI A. FLAWS., 2000. Physiological role of the

- aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development, Toxicological Sciences, 56(2): p. 382-388.
- 9.LAVOIE H A., and KING S R., 2009. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B, Experimental biology and medicine, 234(8): p. 880-907.
- 10.DUFAU M L., TSAI-MORRIS C H., ZHI HU Z., AND BUCZKO E., 1995. Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene, The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 53(1-6): p. 283-291.
- 11.DUFAU M L., 1998. The luteinizing hormone receptor, Annual review of physiology, 60(1): p. 461-496.
12. GUO C., SHIH M., LAN H., HSU N., HU M., 2007. Transcriptional regulation of human CYP11A1 in gonads and adrenals, Journal of biomedical science, 14(4): p. 509-515.
- 13.SINCHAK K., and. WAGNER E., 2012. Estradiol signaling in the regulation of reproduction and energy balance, Frontiers in neuroendocrinology, 33(4): p. 342-363.
- 14.POELLINGER L., 2000. Mechanistic aspects the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor, Food Additives & Contaminants, 17(4): p. 261-266.
- 15.NEBERT D W., AMY L R., MATTHEW Z., WILLY A., YI Y., TIMOTHY P., DALTON P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis, Biochemical pharmacology, 59(1): p. 65-85.
- 16.LAN H C., LIN I., YANG Z., LIN J., 2015. Low-dose bisphenol A activates Cyp11a1 gene expression and corticosterone secretion in adrenal gland via the JNK signaling pathway, Toxicological Sciences, 148(1): p. 26-34.
- 17.PAN Y., ZHONG S., HU R., 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): p. 1305-1308.

18. VALDEZ K E., SHI Z., ALISON Y., TING T., BRIAN K., PETROF F., 2009. Effect of chronic exposure to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female rats on ovarian gene expression, Reproductive Toxicology, 28(1): p. 32-37.
19. XIONG S., MHAWECH-FAUCEGLIA P., TSAO-WEI D., ROMAN L., 2019. Expression of the luteinizing hormone receptor (LHR) in ovarian cancer, BMC cancer, 19(1): p. 1-8.
20. MENDELSON C R., 2009. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor, Molecular Endocrinology, 23(7): p. 947-954.
21. CZAJKA-ORANIEC I., and SIMPSON E R., 2010. Aromatase research and its clinical significance, Endokrynologia Polska, 61(1): p. 126-134.
22. FUKAMI M., TSUCHIYA T., VOLLBACH H., KRISTY A., SHUJI B A., OHTSU S., WABITSCH M., BURGER H., EVAN R., SIMPSON A., 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): p. E2013-E2021.
23. BARROS-OLIVEIRA M., COSTA-SILVA D., SANTOS A., 2021. Influence of CYP19A1 gene expression levels in women with breast cancer: a systematic review of the literature, Clinics, 76.
24. CUNAT S., RABENOELINA F., DAURÈS J P., KATSAROS D., SASANO H., MILLER W R., MAUDELONDE T., PUJOL P., 2005. Aromatase expression in ovarian epithelial cancers. The Journal of steroid, biochemistry and molecular biology, 93(1): p. 15-24.
25. ZHANG Y., CHEN X, ZHOU Z., TIAN X., YANG P., FU K., 2022. CYP19A1 May Influence Lambing Traits in Goats by Regulating the Biological Function of Granulosa Cells, Animals, 12(15): p. 1911.