Arabic Summary Dissertation

تأثيرالإجهاد التأكسدي ومسببات السرطان والاستنساخ على مثيلة النووي محددا بجهاز الفصل الكهربى الشعري الحمض

الملخص

ان مثيلة methylation الحمض النووي هو التعديل اللاجيني الذي ينشأ خلال مرحلة تطور الجنين ويعاد خلال مرحلة النمو، وهو عملية أساسية لتمييز الخلايا والتحكم في التعبير الجيني، وتنظيم وظائف الخلية الحيوية والنمو الناجح في الثدييات. ان الانماط الشاذة للمثيلة للحمض النووي كثيرا ما ترتبط بالتسرطن، مع خسارة عامة من عامل (5 - methylcytosine) الجينومي وارتفاع لمستوى المثيلة hypermethylation لجينات معينة. ولذلك، فإن تحليل مستوى المثيلة الجينومي توفر أداة شاملة لفهم العلاقة بين عامل (5 - methylcytosine) بوساطة الاختلافات البيولوجية وبين تطور مرض السرطان وكذلك تشوهات أخرى للخلية . Adductsالحمض النووي (هو تعديل كيميائي أخر للحمض النووي عن طريق الهجوم من عوامل كيميائية نشطة خارجية أو داخلية) وكثيرا ما يتضح انه هو المسبب في الخطوات الأولي لتطور الخلية السرطانية، والإسهام كمسببات مرضية للورم .ولذلك فان تحليل تعديلات الحمض النووي موضوع ذو أهمية كبيرة، حيث أنه يمثل المؤشرات الحيوية للتعرض للملوثات والمواد المسرطنة ، وكذلك عاكسات للمخاطر المسببة للسرطان أو أمراض الشيخوخة الأخرى.

المقطع الأول في هذه الدراسة التي تركز على التصنيع المعملى للعامل (8- أوكسو - 2 - النوكليوتيدات)، و توصيفه بقياس الطيف الكتلي وكشفه بالفصل الكهربى مستخدما الانانبيب الشعرية مقرونا بكاشف الليزرالومضان و ذلك لاستخدامه كمعيار مرجعي للكشف عن العلامات

البيولوجية المميزة للإجهاد التأكسدي. وتحديد تأثير هذا المركب الخاص بالإجهاد التأكسدي على مستوى مثيلة الحمض النووي

في هذا الجزء تم التحليل بالطريقة التي وضعها أ.د/ شميتز التى تخص تحديد النيوكليوتيدات المعدلة أو غير المعدلة في شكل ('2 – ديوكسيريبوز في الحمض النووي– '3 – الفوسفات). لذلك، تم تصنيعه بنجاح على شكل هيدروكسي النوكليوتيدات من nucleobase جوانين لتمكين الكشف عنها بجهاز الفصل الكهربى مستخدما الانانبيب الشعرية مقرونا بكاشف الليزرالومضان عن طريق تفاعله مع المركب الفلورسنتى BODIPY. وبعد تصنيعه من المركب الأصلي 3–dGMP ثم فصل عنه على العمود الكروماتوجرامى C18 ثم تنقيته منه بالميثانول بنسبة 15 ٪ : 85 ٪ من المياه.

وقد كشف التحليل المتسلسل بالفصل الكهربى مستخدما الانانبيب الشعرية أن (dGMP– أوكسو – 8) موجود إما في أشكال tautomeric او منتج آخر للأكسدة يتكون مع الوقت.

وأجريت دراسة مزدوجة التعمية double blind study على الكريات البيضاء التي أخذت من الغواصين الذين تعرضوا للإجهاد التأكسدي خلال خمسة أشهر من التدريب على الغوص من قبل تعرضهم لأوكسجين الضغط الزائد. وتم الكشف عن (dGMP – أوكسو – 8) في عينات من الغواصين بعد التدريب مبديا انخفاض واضح بمثيلة الحمض النووي عن معدله قبل التدريب. وكانت هذه الدراسة ناجحة في ايجاد صلة بين مستوى المثيلة المتغير في الحمض النووي، الإجهاد التأكسدي ممثلا ب (dGMP– أوكسو – 8) وتسرطن الخلايا ، ولكن المزيد من الدراسات لازمة للتحقق من هذه النتائج.

المقطع الثاني من هذا العمل يختص بدراسة تغيير مستوى مثيلة الحمض النووي تحت تأثير المواد المسببة للسرطان سواء كانت منتجات طبيعية أو ملوثات بيئية. فقد تم دراسة تأثير حمض الِAristolochic على مستوى مثيلة للحمض النووي للجرذان والفئران كالتالي:

إعطاء جرعة واحدة عن طريق الفم من 30 ألف ملغ / كغ من وزن الجسم لذكور الجرذان، فصيلة سبراغ داولي، والتي تم قطع رأسها بعد 24 ساعة بعد العلاج. كما أعطيت لإناث الفئران يوميا جرعة عن طريق الفم من 5 ألف ملغ / كغ من وزن الجسم فصيلة Hupki (الفئران حاملة جين p53 البشري)، قُتلت مجموعة واحدة من الفئران بعد ثلاثة اسابيع بموجب 24 ساعة بعد العلاج الاخير، و قُتلت مجموعة اخرى بعد 52 أسبوعا بعد العلاج الأول.

تم استخراج عينات من الحمض النووي التي جمعت من عدة أنسجة فى كلا الدراساتين وتحليلها عن طريق الفصل الكهربى باستخدام الانانبيب الشعرية مقرونا بكاشف الليزر الومضان. وأظهرت النتائج أنماط مختلفة في مستوى المثيلة وفقا للعضو المختبر، مؤكدا خصوصية مستوى المثيلة الذي يُمكن من التمييز بين الأنسجة المختلفة.

وبالتعاون مع مجموعة البحث في هونغ كونغ، تم الكشف بواسطة جهاز كروماتوجرافى السائل عالي الأداء علي أعلى تركيزمن adduct الحمض النووي اي المركب الناتج من التعديل الكيميائي للحمض النووي في عضو كلية الجرذان التي أعطيت جرعات حمض الِAristolochic.

وبالمثل، كشف فريق البحث في انجلترا عن أعلى تركيزمن adduct الحمض النووي في الكليتين من الفئران hupki من بين عدة أنسجة تم تحليلها بواسطة أسلوب وضع العلامات الفوسفورية للفوسفات^{32}P-postlabeling وقد لوحظ ارتفاع واضح لمستوى المثيلة

(hypermethylation) في الكليتين في كل من الفئران المعالجة (24 ساعة معالجة) و الفئران التي عولجت (52 أسبوعا معاجة).

تم الكشف أيضا عن ارتفاع مستوى مثيلة الحمض النووي باستخدام أسلوب الفصل الكهربى الشعري مقرونا بكاشف الليزر الومضان في المعدة والقولون في الدراسة الاولى، وكذلك في الكبد في الدراسة الأخيرة (بالمقارنة مع عناصر تحكم لكل منهما).

وقد افادت الدراسة بان استخدام المستوى المتغير لمثيلة الحمض النووي كعلامة بيولوجية مفيدة لتعزيز السرطان نتيجة التعرض لحمض الـ Aristolochic وبالإضافة إلى ذلك أكدت أن الكلى هي الأكثر استهدافا من الأنسجة لهذا النوع من التسمم.

وتمت دراسة مواد كيميائية خارجية أخرى لمعرفة أثرها المسبب للسرطان على مستوى مثيلة الحمض النووي في كل من الدراسات المجراة في الجسم الحي و في المختبر. في الدراسة الاولى ، تم استخراج عينات من الحمض النووي التي جمعت من مختلف أعضاء الجرذان، فصيلة سبراغ داولي مداوي عن طريق القصبة الهوائية ب 0.2 و2.0 ملغم / كغم من وزن الجسم من النيتروبنزاثرون (3- nitrobenzanthrone)، وقُتلت بعد 48 ساعة من العلاج. واوضحت طريقة وضع العلامات الفوسفورية للفوسفات ^{32}P-postlabeling كشف تركيزات مختلفة من adduct الحمض النووي بذلك المركب في أنسجة محددة. وقد تم تحليل نفس العينات بطريقة الفصل الكهربى بواسطة الانانبيب الشعرية مقرونا بكاشف الليزرالومضان وكشفت عن انخفاض مستوى المثيلة hypomethylation في الأمعاء الدقيقة والرئتين في دراسة الجرعة العالية.

اما في دراسة المختبر، جرى تحليل لمستوى المثيلة الخاص بعينات من الحمض النووي المستخرجة من خلايا الأمعاء السراطنية Caco–2 المحتضنة مع العديد من المواد المسببة للسرطان (النيتروبنزاثرون–3، بنزو [أ] بيرين و 4 – أمين – ثنائي الفينيل) في تركيزين 2.5 و

5 ميكروغرام / كغ لمدة 24 و 48 و 72 ساعة. وتم اثبات عدم وجود فرق كبير في مستوى مثيلة الحمض النووي في حالة تعامل الخلايا Caco –2.

هذه المقارنة تشير إلى أهمية الدراسة في الجسم الحي لتأثير المواد المسببة للسرطان على مستوى مثيلة الحمض النووي للحصول على نتيجة موثوق بها. وعلاوة على ذلك ، فإن التغيرات الطارئة على مستوى مثيلة الحمض النووي بين الأنسجة المختلفة التى تم تحليلها ،تعطى رؤية ثاقبة لدور العوامل ذات الصلة بمعدل تكاثر الخلاية أو بكفاءة نظام إصلاح الحمض النووي في تشكيل السرطان عن طريق التعديل اللا جينية.

وأخيرا تمت دراسة مثيلة الحمض النووي بوصفه علامة جينية في هذا العمل لتأثيره في عملية الاستنساخ عن طريق نقل نواة الخلية الجسدية (SCNT). ومن المعروف أن كثيرا من الاضطرابات الجينية مسؤلة عن التشوهات الجنينية ومابعدها. وفي المقابل، يعتبر عموما الحالة اللاجينية الخاصة بالبقر المستنسخ البالغين الأصحاء تكون طبيعية، على الرغم من أنه لم يتحقق منها أبدا.

تم إجراء تحليل العينات بطريقة الفصل الكهربى بواسطة الانانبيب الشعرية مقرونا بكاشف الليزرالومضان لتحديد مستوى مثيلة الحمض النووي من الجينوم الكامل من الحيوانات الفردية لكل نمط وراثي. و من أجل تقييم الآثار الطويلة الأمد لإعادة برمجة SCNT، قد تم تعيين مستوى المثيلة الجينومي على نطاق واسع في عينات دم من 38 بقرة من الإناث المستنسخات البالغات وفي حالة صحية جيدة تم استنساخهن من تسعة بقرات من السلالات هولشتاين Holstein وسيمنتال Simmental. وتراوحت مستويات مثيلة الحمض النووي الفردية من 4.4 ٪ الى 6.9

٪ مع وجود اختلافات كبيرة بين مستويات مثيلة الحمض النووي في سلالات هولشتاين و سيمنتال (6.50٪ ± 0.01 ٪ و 5.09 ٪ ± 0.02 ٪).

ووجد أيضا أن مستوى مثيلة الحمض النووي متغير في حالة عينات الكبد في دراسة موازية اجريت على 10 بقرات كبار مستنسخات من سلالة هولشتاين. وبالإضافة إلى ذلك، من أجل الحكم على مساهمة SCNT إلى تباين المستويات الفردية لمثيلة الحمض النووي، نُفذت مزيد من التحليل لمقارنة الحيوانات المستنسخة من سيمنتال مع حيوانات في نفس العمر تتكون من مجموعات من 12 توئم من إناث سيمنتال أحادية الاقحة التي خلقت معمليا من الأجنة المخصبة بطريقة نصف شطر. واثبتت هذه الدراسة إلى أن مستويات مثيلة الحمض النووي العامة لخلايا الدم البيضاء في البقر المستنسخ البالغ ذو الصحة الجيدة هي في الواقع تُظهر اختلافا كبيرا بين الأبقار من نفس النمط الوراثي. أيضا، فإن مستوى مثيلة الحمض النووي في الحيوانات المستنسخة أكبر منه في الحيوانات المانحة النووية أو في التوائم أحادية الاقحة. وكانت الانحرافات المطلقة لقيم مستوى مثيلة الحمض النووي في الحيوانات المستنسخة SCNT الفردية من متوسط قيم النمط الجيني هى خمسة أضعاف ما كانت عليه في التوائم.

وأخيرا، قد كشفت هذه الدراسة اختلافات غير متوقعة بين قيم مستوى مثيلة الحمض النووي بين البالغين الأصحاء من الأبقار المستنسخة من نفس النمط الوراثي وبين الأنماط الوراثية للسلالات المتختلفة وذلك يدعو لإجراء تحليل متعمق للمخاطر الوراثية واللاجينية المرتبطة بعملية الاستنساخ SCNT ومبادئ توجيهية واضحة لاستخدام المستنسخات الاجينية.