جـامعة القادسية
كلية التربيـــة
قسم علوم الحياة

دور الثايموكوينون في مستوى التعبير الجيني وإنتاج بعض مضادات الأكسدة ومستوى بروتين (HSP70) في أنسجة كبد ذكور الجرذان المجهدة حراريا

اطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية/جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات درجة

دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ علم الحيوان

من قبل

نجلاء عبيس هلول الجبوري

بكلوريوس علوم حياة 2001

ماجستير علوم حياة/فسلجة حيوان 2008

إشراف

أ.د. جبار عباس أحمد الساعدي أ.م.د. حسين خضير عبيس الميالي

محرم 1438 هـ تشرين الاول 2016 م

إقرار المشرف

نؤيد بان الاطروحة الموسومة بـ (دور الثايموكوينون في مستوى التعبير الجيني وإنتاج بعض مضادات الأكسدة ومستوى بروتين (HSP70) في أنسجة كبد ذكور الجرذان المجهدة حراريا) ، قد أعدتها الطالبة (نجلاء عبيس هلول الجبوري) تحت إشرافنا في كلية التربية/جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ فسلجة الحيوان.

التوقيع

الاسم:د. جبار عباس أحمد ألساعدي

اللقب العلمي: أستاذ

العنوان: كلية الطب البيطري /جامعة القادسية

التوقيع

الاسم:د.حسين خضير عبيس الميالي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية /جامعة القادسية

إقرار رئيس قسم علوم الحياة

ء على التوصيات المقدمة من قبل المشرفين والمقوم اللغوي والعلمي، أرشح هذه الأطروحة للمناقشة.

التوقيع

أ.م.د. رائد كاظم عبد الاسدي

رئيس قسم علوم الحياة

اقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة أننا قد اطلعنا على الأطروحة الموسومة(دور الثايموكوينون في مستوى التعبير الجيني وإنتاج بعض مضادات الأكسدة ومستوى بروتين (HSP70) في أنسجة كبد ذكور الجرذان المجهدة حراريا) وناقشنا الطالبة (نجلاء عبيس هلول الجبوري) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 5 / 10 /2016 وأنها جديرة لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/علم الحيوان، وبتقدير امتياز.

رئيس اللجنة

أ.د. فارس ناجي عبود

التاريخ : / /2016

مكان العمل: جامعة بابل/ كلية العلوم

عضو اللجنة

أ. د. سامي رحيم الكاتب

التاريخ : ١٥ / ١٠ /2016

مكان العمل: جامعة الكوفة/ كلية الطب

عضو اللجنة

أ. د. براء نجم عبدالله

التاريخ : ١٨ / ١٠ /2016

مكان العمل: جامعة بغداد/ كلية الطب البيطري

عضو اللجنة

أ. د. جاسم محمد احمد

التاريخ : ٦ / ١١ /2016

مكان العمل: جامعة البصرة/ كلية الطب البيطري

عضو اللجنة

أ. م.د. وجدان ثامر مهدي

التاريخ : ٢٧ / ١٠ /2016

مكان العمل: جامعة القادسية/ كلية العلوم

عضو اللجنة(المشرف)

أ.د.جبار عباس الساعدي

التاريخ : ١ / ١١ /2016

مكان العمل: جامعة القادسية/كلية الطب البيطري

عضو اللجنة(المشرف):

أ. م. د. حسين خضير الميالي

التاريخ : ١ / ١١ /2016

مكان العمل: جامعة القادسية/ كلية التربية

مصادقة عمادة كلية التربية

عميد كلية التربية

أ. د. خالد جواد كاظم العادلي

التاريخ: 3/ 1 /2017

الخـــلاصـــــة

أجريت الدراسة الحالية بهدف التحري عن فعالية عقار الثايموكوينون، بوصفه المادة الفعالة لبذور الحبة السوداء، في تقليل تأثيرات الاجهاد الحراري المزمن عن طريق دراسة مضادات الاكسدة الانزيمية وغير الانزيمية في مصل دم وأكباد ذكور الجرذان البيض الناضجة، بوصفها انموذجا للحيوانات اللبونة، المعرضة لدرجات الحرارة المرتفعة فضلا عن دراسة تعبير جينات كل من SOD و CAT و GSH و HSP70.

تضمنت الدراسة اجراء تجربة استغرقت ستة اسابيع باستخدام 192 جرذاً ذكراً بالغاً بعمر 10-12 اسبوع، وزعت عشوائياً إلى أربع مجموعات متساوية العدد، ضمت كل منها 48 جرذا. عرضت الأولى (C) لدرجة حرارة اعتيادية (22-24) مْ، وعرضت الثانية (مجموعة الاجهاد الحراري HS) لدرجة (35-40) مْ لمدة ست ساعات يوميا، وعرضت الثالثة (HSTQ) لدرجة حرارة (35-40) مْ لمدة ستة ساعات يوميا مع التجريع اليومي لمعلق الثايموكوينون (50ملغم/كغم من وزن الجسم)، وعرضت الرابعة (TQ) لدرجة حرارة اعتيادية (22-24) مْ مع التجريع اليومي لمعلق الثايموكوينون (50ملغم/كغم من وزن الجسم). في نهاية كل اسبوع من التجربة، تمت التضحية بثمانية ذكور من كل مجموعة وأخذت منها نماذج دم و عينات من الأكباد لاختبار انزيمات وظائف الكبد (ALT و AST و ALP) ومستويات MDA و SOD و CAT و GSH و GSH-px و GSH-r و GSH-t كما أخذت عينات من الأكباد لدراسة مستوى التغير التضاعفي لجينات SOD و CAT و GSH و HSP70 فيها باستخدام تقانة قياس الوقت الحقيقي للاستنساخ الراجع لتفاعل سلسلة البلمرة الكمية RT-qPCR.

أدى التعرض للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون إلى تغيرات تباينت معنوياتها بحسب نوع المعيار المدروس، فقد حصل ارتفاعا معنويا في تركيز MDA و ALT و AST و ALP في مصل دم ذكور مجموعة HS قابله انخفاض تراكيزها في انسجة الكبد مقارنة مع المجموعات الاخرى. وأدت المعاملة بالثايموكوينون الى تحسن معدلاتها في المصل وأنسجة الأكباد عند اعطائه بالتزامن مع الاجهاد الحراري، إلا انها لازالت متباينة بالمقارنة مع السيطرة، إبتداءً من الاسبوع الرابع وحتى نهاية التجربة. كما إرتفع تركيز انزيمي SOD و CAT في مصل وأكباد مجموعة HS مقارنة مع السيطرة طوال مدة التجربة، وكانت معدلات انزيم SOD في الاسابيع الاخيرة اعلى مما كانت عليه في الأسابيع الاولى والعكس بالنسبة لانزيم CAT،أما في مجموعة HSTQ فقد ارتفع معدل انزيمي SOD و CAT في مصولها وأكبادها معنوياً في الأسابيع الأولى مقارنة مع السيطرة، ثم إنخفض في الأسابيع الاخيرة، إلا أنها لازالت أعلى من السيطرة و TQ.

أظهرت النتائج إنخفاضا معنويا في فعالية انزيم GSH-px في مصل دم مجموعتي HS و HSTQ مقارنة مع السيطرة خلال الأسابيع الأولى من التجربة، إلا أنها عادت مقاربة للسيطرة في الأسبوع السادس. أما في انسجة الكبد، فقد اظهرت فعالية الأنزيم لمجموعة HS تقاربا مع المجموعات الأخرى خلال الأسبوعين الأولين ثم ارتفعت معنويا عنها في الأسابيع الأربعة الأخيرة وأظهر معدل فعالية انزيم GSH-r ارتفاعاً معنوياً في مصل دم وأكباد مجموعات المعاملة الثلاث خلال الاسابيع الخمسة الأولى من التجربة مقارنة مع السيطرة، إلا أن الأسبوع السادس شهد تقارب معدلي السيطرة و HS في حين بقي معدلا المجموعتين HSTQ و TQ أعلى منهما.وشهدت فعالية انزيم GSH-t في مصل دم ذكور مجموعتي HS و HSTQ إرتفاعا معنويا طيلة أسابيع الدراسة بالمقارنة مع مجموعتي السيطرة و TQ، في حين كانت فعالية الأنزيم في أنسجة الأكباد متقاربة بين المجموعات طيلة مدة التجربة. كما شهد تركيز GSH في المصل ارتفاعاً معنويا في مجموعات المعاملة الثلاث خلال الاسابيع الثلاثة الاولى بالمقارنة مع السيطرة، أما مجموعة TQ فقد بقيت أعلى من المجموعات الأخرى خلال الأسابيع الثلاثة الأخيرة.

أظهرت الدراسة الجزيئية زيادة معنوية في مستوى تعبير جين SOD لمجموعات المعاملة الثلاث خلال الأسابيع الأربعة الأولى بالمقارنة مع السيطرة مع الاشارة الى أن الارتفاع في الاسبوع الرابع في مجموعة HS هو الأعلى من بينهم تلته مجموعة HSTQ. أما الاسبوعين الأخيرين، فقد شهدا تقارب معدلا مجموعتا HSTQ و TQ مع السيطرة مع بقاء معدل مجموعة HS الأعلى من بين المجموعات. كما شهد مستوى تعبير جين CAT في مجموعة HS ارتفاعا معنويا عن السيطرة خلال الاسبوعين الأولين وتقاربا في الاسبوعين الثالث والرابع وانخفاضا في الاسبوعين الأخيرين. أما مجموعة HSTQ، فقد سجلت إرتفاعا معنويا طيلة أسابيع الدراسة بالمقارنة مع السيطرة، في حين كانت مجموعة TQ أعلى معنويا من السيطرة خلال الأسابيع الخمسة الأخيرة، مع الاشاره هنا الى أن مجموعة HSTQ هي الأعلى من بين المجموعات خلال ألاسابيع الأربعة الأخيرة.

سجلت الدراسة ارتفاعا معنويا في مستوى تعبير جين GSH في مجموعات المعاملة الثلاث بالمقارنة مع السيطرة طيلة أسابيع الدراسة، مع الاشارة الى أن مجموعتي HS و HSTQ هما الأعلى من بين المجموعات في الاسبوع الأول بينما كان الارتفاع كبيرا في مجموعة HSTQ خلال الأسابيع الأربعة الأخيرة. سجل مستوى تعبير جين HSP 70 في أكباد مجموعة HS زيادة معنوية بالمقارنة مع السيطرة ابتداءً من الاسبوع الثاني وحتى الاسبوع الخامس لتعود الى عدم المعنوية في الأسبوع السادس. أما مجموعة HSTQ فقد شهدت زيادة معنوية تدريجية في مستوى تعبير الجين مقارنة بالسيطرة في كل الاسابيع وكانت هذه الزيادة اكثر وضوحا خلال الأسابيع الاربعة لاخيرة، وتجدر الأشارة الى أن مستوى تعبير الجين في هذه المجموعة كان مقاربا لمستواه في مجموعة

HS خلال الاسابيع الثلاث الاولى ثم بدأ التفوق عليه خلال الأسابيع الثلاثة الأخيرة ليصل الفرق بينهما الى اقصاه خلال الاسبوع السادس.

يستنتج من هذه الدراسة أن التعرض للإجهاد الحراري يتسبب بتأثيرات سلبية واضحة ويحدث خللاً في العديد من وظائف الكبد ومستوى وفعالية مضادات الاكسدة الانزيمية وغير الانزيمية في مصل الدم وأنسجة الكبد فضلا عن التأثير على التعبير الجيني لكل من SOD و CAT و GSH وبروتين الصدمة الحرارية HSP70، كذلك بينت الدراسة ان عقار الثايموكوينون له فعالية واضحة ليس لأنه مادة مضادة للأكسدة فحسب بل أيضاً لكونه قادرا على التأثير في إنتاج مضادات الأكسدة الداخلية في أنسجة الكبد بنوعيها الأنزيمية وغير الأنزيمية وبروتين الصدمة الحرارية 70.

المقدمة Introduction

على مدار التاريخ عرفت الأرض العديد من التغيرات المناخية التي منها الزيادة المثيرة في درجة حرارة سطح الأرض على مدار القرنين الماضيين أو ما يُسمى بظاهرة الاحتباس الحراري Global Warming وأن آثار موجات الحرارة الشديدة ربما أصبحت الان أمرا لا فكاك منه، وإذا استمرت الحرارة في الارتفاع إلى 4 م زيادة على مستويات ما قبل التصنيع، فإن الاوضاع المناخية وموجات الحرارة وغير ذلك من الاحداث المناخية الشديدة التطرف التي تعتبر اليوم غير عادية للغاية وغير مسبوقة ستصبح هي الواقع المناخي الجديد، وهو عالم تزداد فيه المخاطر والاضطرابات (Kunz-Plapp *et al*., 2016).

كما هو معلوم ان المستوى الفسيولوجي والبايوكيميائي للكائن الحي يرتبط ارتباطاً وثيقاً بطبيعة البيئة التي يعيش فيها، لذا قد تقترب الاضطرابات التي يسببها التغير في درجات الحرارة الى التأثير على قدرة البشر على العمل في العراء وبالتالي تتسبب بحدوث أمراض متصلة بالحر كالإجهاد الحراري والإنهاك الحراري وضربات الحر وخاصة للمسنين ومن يعانون أمراضا مزمنة أو السمنة المفرطة والحوامل ومن يعملون في الأماكن المفتوحة(Myers and Bernstein, 2011)، فضلا عن تأثيراتها الاقتصادية بسبب تأثر المشاريع الاقتصادية لتربية الحيوانات المختلفة (Das *et al*., 2016;Cui *et al*., 2016; Kumar *et al*., 2011).

ونظرا لصعوبة تجنب مساويء التغيرات المناخية عموما والتغير في درجة الحرارة على وجه الخصوص لكونه سيتطلب تغييرات ضخمة تكنولوجية واقتصادية ومؤسسية وسلوكية وسيتطلب كذلك قيادة على جميع مستويات المجتمع (NIOSH, 2016) ، ونظرا لكون الشواهد العلمية الحالية غير قابلة للتفنيد، لذا فقد شرع العلماء في مختلف انحاء العالم بإجراء الدراسات والبحوث حوله في محاولة تقليل الاضرار الناتجة عن التعرض للحرارة العالية على المستوى المهني والتجريبي، ومن هذا المنطلق اتجهت البحوث نحو المركبات الطبيعية التي لها القدرة على اصلاح الضرر المتسبب عن الاجهاد الحراري على مختلف المستويات الخلوية والجزيئية والبايوكيميائية، فكانت مضادات الاكسدة كالفيتامينات والعناصر المعدنية والمركبات الفعالة المعزولة من النباتات الطبيعية لها السبق في هذا المجال (Kim *et al*.,2012 ; Kim *et al*., 2010).

تعد الحبة السوداء *Nigella sativa* من النباتات الطبية الواعدة والمصحوبة بخلفية غنية تاريخياً وعلمياً والمعروف تقليديا منذ وقت طويل فوائدها إلا انه تنامى في الوقت الحاضر المعرفة العلمية الرصينة لأهمية الحبة السوداء العلاجية والطبية فضلاً عن أهميتها الغذائية العالية (Rahmani and Aly, 2015; Sharma *et al*., 2005) ، الجزء الطبي الاساسي من النبات هو

البذور Seeds نظرا لاحتواءها على المركبات الفعالة، ومن اشهر هذه المركبات الفعالة للحبة السوداء وأوسعها تأثيرا هو الثايموكوينون Thymoquinone، اذ أثبتت كثير من الدراسات أن استعمال الحبة السوداء عموما والثايموكوينون خاصة لها تأثيرات إيجابية على صحة الكائن الحي، إذ يتميز الثايموكوينون بتأثيرات حيوية مختلفة كان ابرزها دوره المضاد للأكسدة Antioxidant (Mabrouk & Ben Cheikh, 2016; Firdaus *et al*., 2016) والمضاد للالتهاب Anti-inflammatory (El-Sheikh *et al*., 2015; Woo *et al*., 2012) والمضاد للسرطان Anti-carcinogen (Khan *et al*., 2015; Attoub *et al*., 2013) وغيرها من الافعال الحيوية المهمة.

الهدف من الدراسة

في ضوء ما تقدم، تم تصميم هذه الدراسة للوقوف على التأثيرات الكيموحيوية والجزيئية التي يسببها التعرض لدرجات الحرارة العالية في ذكور الجرذان، فضلا عن التعرف على الدور الذي قد يؤديه استخدام الجرعة المؤثرة من الثايموكوينون والذي على الرغم من النتائج المشجعة المسجلة في العديد من الدراسات، تبقى إمكانية كفاءته في التخلص من الاجهاد الناتج عن الحرارة العالية و تحسين بعض الأضرار الناتجة عنه والوقاية منه في الظروف الفسيولوجية الحيوية موضوع نسبي يستدعي الدراسة والتجريب لمحاولة فهم مدى ممارسة هذا المركب نشاطه المضاد للأكسدة بنفس الكفاءة تحت كل الظروف وعليه تم اعتماد المعايير الآتية لتحقيق أهداف الدراسة:

أولاً: تقييم وظائف الكبد Liver functions evaluation من خلال تقدير تركيز الانزيمات الناقلة للامين Aspartate aminotransferase (AST) و Alanine aminotransferase (ALT) فضلا عن Alkaline phosphatase (ALP) في مصل الدم و انسجة الكبد.

ثانياً: تقدير تركيز Malondialdehyde (MDA) ومضادات الاكسدة في مصل الدم و انسجة الكبد المتمثلة بـ Superoxide dismutase (SOD) و Catalase (CAT) و Glutathione (GSH).

ثالثاً: تقدير فعالية Glutathione peroxidase (GSH-px) و Glutathione reductase (GSH-r) و Glutathione transferase (GSH-t) في مصل الدم وأنسجة الكبد.

رابعاً: استخدام تقانة الوقت الحقيقي الكمي لتفاعل سلسلة البلمرة qRT-PCR لدراسة التعبير الكمي في انتاج مضادات الاكسدة Superxide dismutase و Catalase و Glutathione و بروتين الصدمة الحرارية Heat shock protein 70 (HSP_{70}) .

(2):استعراض المراجـــع Review of Literature

(1.2): المكونات الفعالة في النباتات Active constitutes in plants

تعد ظاهرة استخدام الأعشاب والنباتات في التداوي من الظواهر الهامة وذات صدى كبير في نفوس أفراد مجتمعنا لما لها من عادات متوارثة عبر الأجيال ، وعلى الرغم من التطور العلمي و التقني الذي نلمسه في العلوم الطبية بمختلف تخصصاتها فإن فكرة الإقبال على استعمال الأعشاب و النباتات الطبية وتفضيلها على المستحضرات الكيميائية تتزايد وتتعاظم في كل المجتمعات (Hassan, 2012; Maciel *et al*., 2002).

والنباتات الطبية هي تلك النباتات التي تستخدم في علاج الأمراض والآلام او الوقاية منها وتحسين الصحة العامة والتي قد تستخدم بكاملها او جزء معين منها والذي يحتوي مواد ذات فعالية وتأثير فسيولوجي و علاجي للإنسان وغيره، كما تشمل النباتات الطبية أيضًا النباتات التي نحصل منها على المواد أو المركبات المستخدمة في الصناعة الصيدلانية لتحضير الأدوية بأشكالها المختلفة وعلاوة على تأثيراتها الطبية، فهي ذات فائدة اقتصادية سواء في مجال صناعة أدوات التجميل أو الصناعات الغذائية وصناعة الجلود أو صناعات أخرى (Rasool-Hassan, 2012). وتتكون هذه المواد كنواتج ثانوية من عمليات الايض داخل النباتات وتسمى بالنواتج الطبيعية Natural product او العرضية By-Products او تكون من المكونات الرئيسة في تركيبالنباتات، وتبعا لفعاليتها العلاجية لكثير من الامراض وقابليتها على إزالة اعراضها وحدوث الشفاء السريع اطلق على هذه المنتجات بالمركبات الفعالة Active compounds او المكونات الفعالة Active constitutes (Dewick, 2002).

وتقسم منتجات الأيض الثانوي في حد ذاتها إلى أصناف مختلفة لتسهيل دراستها، إلا أن الطريقة المتبعة في تقسيمها تختلف من مصدر لآخر ، اذ يمكن تقسيم هذه المواد على أساس تأثيرها في الكائنات الحية إلى ما هو سام وقاتل وإلى ما هو مفيد ومغذي وقد تصنف أحيانا وفقا للمصادر الطبيعية التي تنتج منها، وتصنف أحيانا أخرى لتأثيراتها الفسيولوجية إذ يستخدم بعضها كمضادات حيوية، وبعضها مضادات جرثومية و البعض الآخر مسكن للآلام، والأكثر شيوعا هو تصنيفها تبعا لتركيبها البنائي، اذ تصنف إلى التربينات و مشتقاتها والمركبات الفينولية و القلويدات وأشباهها و المضادات الحيوية والفيتامينات (Rates, 2001).

إن فعل هذه المنتوجات الطبيعية يختلف حسب تركيزها ومحتواها ونوعها في النبات وعلى هذا الأساس أجريت بعض التسميات على أنها نباتات قلويدية او تربينية اوكومارينية وهكذا، و بالرغم مما تقدمه العديد من المركبات المستخلصة من مصادرها الطبيعية من فوائد عظيمة

للإنسان او الحيوان، إلا أن دورها في النبات لم يكن محددا على وجه الدقة، غير أنه في السنوات الأخيرة تبين أن من ضمن وظائفها تأمين العيش للنبات الذي يحويها في ظروف حياتية قاسية (Halberstein, 2005)، وحاليا تتسارع الخطواتالعملية لدى العاملين في حقل المنتجات الطبيعية في سبيل التعرف على كيفية الحصول على هذه المنتجات واستخلاصها من مصادرها الطبيعية وكيفية فصل بعضها عن البعض بغية الحصول على مركبات نقية فضلا عن كيفية التعرف على التركيب البنائي للمركبات النقية باستخدام الطرق الفيزيائية والكيميائية في تحديد هوية المجموعات الفعالة التي يحتويها المركب الطبيعي وكذا طرق التحليل الطبيعي(Mamedov, 2012) .

(2.2): المكونات الفعالة في الحبة السوداء Active constitutes in Black seed

تعد الحبة السوداء *Nigella sativa* من النباتات الطبية الواعدة والمصحوبة بخلفية غنية تاريخياً وعلميا و المعروف منذ وقت طويل تقليديا فوائدها إلا انه تنامى في الوقت الحاضر المعرفة العلمية الرصينة لأهمية الحبة السوداء العلاجية والطبية فضلاً عن أهميتها الغذائية (Rahmani &Aly, 2015; Ahmad *et al*., 2013).

الجزء الطبي الاساسي من النبات هو البذور Seeds نظرا لاحتوائها على المركبات الفعالة، اذ تشكل الزيوت الثابتة Fixed oils حوالي 36-38% من تركيبها، فضلا عن البروتينات و الصابونيات والقلويدات و الفلافونيدات وحوالي 0.4-2.5% من الزيوت الطيارة Volatile oils و التي تحتوي على احماض دهنية غير مشبعة Unsaturated fatty acids مثل Arachidic acid و Eicosadienoic acid (Gali-Muhtasib & Schneider-Stock, 2004)، فضلا عن cymene بتركيز 7.1-15.5% و caryacrol بتركيز 5.8-11.6% و t-anethole بتركيز 0.25-2.3% و 4-terpineol بتركيز 2-6.6% والثايموكوينون ومشتقاته (TQ) Thymoquinone بتركيز لا يقل عن 24% وقد يصل الى 50% من محتوى الزيوت الطيارة لبذور الحبة السوداء في بعض الاصناف (Butt & Sultan ,2010;Benavente *et al*., 2004).

وتتميز بذور الحبة السوداء بمحتواها العالي من الاحاض الامينية وخصوصا الأساسية essential amino acids مثل ثريونين threonine و فالين valine و ميثيونين methionine و إيزوليوسين isoleucine و ليوسين leucine و فينيل آلانين phenylalanine و ليسين lysine و آرجنين arginine و هيستدين histidine (Ahmad *et al*., 2013).

يتم حاليا استخدام تقنية الزراعة النسيجية لغرض زيادة انتاج المكونات الفعالة من الحبة السوداء وبنقاوة عالية من اجزاء اخرى غير البذور مثل الكالسCallus، والذي هو عبارة عن خلايا برنكيمية غير متمايزة تنشأ من الخلايا المريستيمية (الخلايا المولدة) للنباتات ويلاحظ عادة

على السطوح المقطوعة للجذور والسيقان (Ikeuchi *et al*., 2013)، لذا وجد بعض الباحثين ان كمية المركبات الطبية المنتجة من كالس الحبة السوداء خارج الجسم الحي تقترب من كميتها المنتجة من النباتات الحقلية وقد تتساوى معها او تفوقها في احيان كثيرة اذ تمكن El-Said و جماعته(2002) من استحثاث الكالس على انتاج p-cymene و Thymol و Thymoquinone من اوراق الحبة السوداء المزروعة على وسط زرعي معلوم المكونات الغذائية وظروف ثابتة من حرارة ورطوبة و اضاءة، وكذلك تمكنت التميمي (2012) من فصل وتقدير الزيوت الطيارة والمكونات الفعالة مثل Thymol وThymoquinone وThymohydroquinone من كالس الحبة السوداء النامي على وسط MS (Murashige- Skoog) ، وفي ذات الموضوع تمكن جدوع وابراهيم (2014) من زيادة المكونات الفعالة في كالس سيقان بادارت الحبة السوداء النامي على وسط MS مدعم بتراكيز من مستخلص خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* الذي يحوي على كثير من ألأحماض الامينية و العناصر المعدنية والهرمونات النباتية والفيتامينات التي توفر وحدات بنائية مهمة لبناء منتجات الأيض الثانوي.

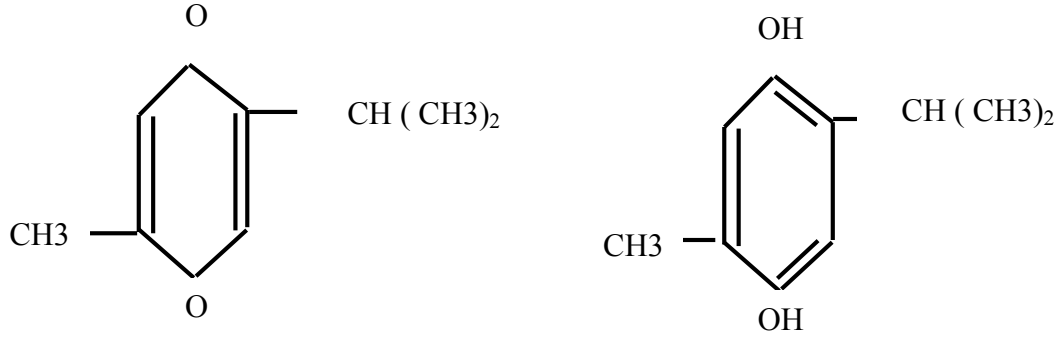
(2-3): الثايموكوينون Thymoquinone

(2-3-1): الشكل الكيميائي والخواص Chemical Structure & Properties

اكتشف الثايموكوينون في العام 1959 من قبل الباحثين محفوظ Mahfouz والدخاخني El-Dakhakhny في جامعة القاهرة إذ اشارا في بحثهما المنشور في العام 1960 الى عزل بوليمر يمثل المادة الاساس في الزيت الطيار للحبة السوداء اطلقوا عليه نايجلون Nigllone مأخوذا من الاسم العلمي للحبة السوداء *Nigella sativa* وبعد ثلاث سنوات اي في العام 1963 قام الدخاخني بعزل مركب بلوري Crystalline substance من الزيت الطيار لبذور الحبة السوداء اطلق عليه الثايموكوينون Thymoquinone(TQ) و اوضح ان النايجلون المعزول سابقا هو في الحقيقة جزيئتين متحدتين Dimer للثايموكوينون لذا اطلق عليه Dithymoquinone (TQ_2).

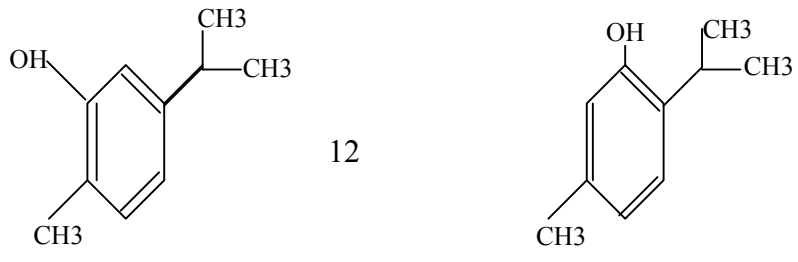
ويتواجد هذا المركب في الزيوت الثابتة للحبة السوداء الا انه الاكثر وفره في الزيوت الطيارة (Butt & Sultan, 2010)، وتختلف تركيزه فيها تبعا لاختلاف مصدر حبوب الحبة السوداء الماخوذ منها فضلا عن اختلاف طرق استخلاصه (Salmani *et al*., 2014)، وينتمي هذا المركب الى صنف من المركبات الفعالة المستخلصة من الزيوت الطيارة تسمى الكوينونات Quinones التي تحتوي في تركيبها على الأوكسجين بجانب الكربون والهيدروجين وتتميز بطبيعتها الاروماتية وببساطة كيميائها الفراغية رغم ما يبدو من تعقد تركيبها، اذ تكون بشكل حلقات غير

متجانسة والأوكسجين فيها هو الذرة المغايرة(Ghosheh *et al*., 1999)، وتحتوي على مجموعتي كيتون و تكون متباينة في الوانها اذ تتدرج بين الاصفر الفاتح الى الاسود، و الثايموكوينون هو من كوينونات البنزين Benzoquinones التي تختلف في المجاميع المرتبطة بذرات الكاربون 2 و5، ومن مركبات هذه المجموعة ايضا مركب Ubiquinone الذي يمثل المرافق الانزيمي Coenzyme Q المشارك في نظام نقل الالكترونات electron transport systems (Dewick, 2002). ويتميز الثايموكوينون بتركيبه البلوري Crystalline لونه الاصفر الغامق Dark yellow كما انه حساس للضوء Light sensitive وقليل الذوبان في الوسط المائي (Darakhshan *et al*.,2015)والتركيب الكيميائي للثايموكوينون هو ($C_{10}H_{12}O_2$) 2-isopropyl-5-methylbenzoquinone و الذي يوضحه التركيب الجزيئي في الشكل ادناه.



شكل (1.2): التركيب الجزيئي للثايموكوينون و Thymohydroquinone

وبعد عزله اجريت العديد من الدراسات للتحري عن وجود هذا المركب في نباتات اخرى غير الحبة السوداء، وقد اشارت بعض الدراسات الى من الممكن ان بعض النباتات مثل *Callitrus quadrivalvis* و *Nepta leucophylla* و *Mondara fistulosa* و *Juniperus cedrus* و *Tetraclinis articulate* يمكن ان تمتلك تركيز قليل جدا من مركب الثايموكوينون الا انها لم تكن مدعمة بدراسات كيمائية تثبت ذلك (Raschi *et al*., 2010 ; Pagola *et al*., 2004)، واغلب الظن انها تشير الى قابلية اشتقاق الثايموكوينون من اكسدة بعض المركبات الفينولية Phenolic compounds oxidation المتواجدة في هذه النباتات، اذ يتم حاليا وبالاستفادة من التقنية الحديثة، انتاج الثايموكوينون صناعيا عن طريق تحفيز اكسدة الثايمول Thymol و الكارفكرول Carvacrol، و هما نظيران Isomers لمركب فينولي واحد صيغته الجزيئية $C_{10}H_{14}O$ ويتواجدان بتراكيز عالية في الزيت الطيار لبذور الحبة السوداء نفسها وفي نباتات اخرى عديدة، بتقنية جديدة صديقة للبيئة يطلق عليها Zeolite catalyst (Gunes, 2005).



شكل (2-2): التركيب الجزيئي للثايمول والكارفكرول

ما عرف عن حركة Pharmacokinetic الثايموكوينون داخل جسم الكائن الحي جدا قليل، فكل ما تم التوصل اليه انه يتايض داخل الجسم بواسطة انزيمات معينة الى Hydrothymoquinone او Dihydrothymoquinone ، واوضحت دراسة اجراها Alkharfy وجماعته (2015) على الارانب للمقارنة بين مصدرين لتجريع الثايموكوينون حيث اعطيت 5 mg/kg عن طريق الوريد و 20 mg/kg عن طريق الفم ومن خلال متابعة حركة المركب داخل الجسم تبين ان هذا المركب يتميز ببطء امتصاصه وبالتالي تأخر ظهوره في مجري الدم بعكس الحالة اذا اعطي عن طريق الوريد الا ان اعطاءه عن طريق الفم يسمح بوقت اطول لبقاءه في مجرى الدم مما يسمح بالاستفادة من تركيز اعلى من المركب من قبل الجسم، وبينت دراسة Pathan وجماعته (2011) انه من الممكن ان يتواجد الثايموكوينون او مشتقاته بعد اعطاءه عن طريق الفم لمدة تصل الى 12 ساعة في بلازما الجرذان.

كما بينت دراسات اخرى ارتباط الثايموكوينون مع البومين مصل الدم Serum Albumin الذي يعد ناقلا جيدا لهذا المركب، مما يسمح بزيادة تركيزه في مجرى الدم وبالتالي زيادة فائدته (Lupidi *et al*., 2010; Al-Talla, 2013).

أتضح من خلال نتائج التجارب على الحيوانات ان للثايموكوينون مدى واسعاً من الأمن عند تناوله، فلم تظهر أية علامات للتسمم عند استخدامه يوميا وبجرع منخفضة وعلى الرغم من المدى الواسع للأمن عند استخدام الثايموكوينون بجرع عالية ، إلا أنه من الضروري أن يؤخذ في نظر الاعتبار أن استخدامه بكميات كبيرة ولمدد طويلة له بعض الآثار السلبية، ففي دراسة اجراها Al-Ali وجماعته (2008) في الفئران والجرذان ظهر اعلى تركيز غير ضار 57.5 ملغم/كغم من وزن الجسم عند اعطاءه عن طريق الخلب و 794.3 ملغم/كغم من وزن الجسم عند اعطاءه عن طريق الفم يوميا.

و في دراسة اخرى قام بها AbuKhader (2012)على ذكور واناث الجرذان تبين ان اعلى تركيز غير ضار هو 22.5 ملغم/كغم من وزن الجسم و 15ملغم/كغم من وزن الجسم عند اعطاءه عن طريق الوريد في الذكور و الاناث على التوالي و 250 ملغم/كغم من وزن الجسم عند اعطاءه عن طريق الفم لكلا الجنسين ولم تلاحظ اية تأثيرات سلبية، كما جرب الباحث نفسه جرعة 40 ملغم/كغم من وزن الجسم عن طريق الوريد و 500 ملغم/كغم من وزن الجسم عن طريق الفم فظهرت تأثيرات سلبية تمثلت بالتهاب البنكرياس الحاد acute pancreatitis وتقلص عضلات

البطن abdominal muscle contractions و توسع او تمدد في الامعاء intestinal dilatation خصوصا في بداية التجربة إلا انها زالت تدريجيا مع استمرار الدراسة.

(2-3-2): الأهمية الفسيولوجية للثايموكوينون

Thymoquinone's Physiological Importance

أثبتت كثير من الدراسات أن استعمال الحبة السوداء عموما والثايموكوينون خصوصا لها تأثيرات إيجابية على صحة الكائن الحي، إذ تميز الثايموكوينون بتأثيرات حيوية مختلفة وواسعة كان ابرزها دوره كمضاد للأكسدة Antioxidant، فلقد أثبتت عدة دراسات فضل الثايموكوينون في حماية التراكيب الغشائية من الأكسدة خاصة الفوسفولبيدات وبالتالي الحفاظ علي حيوية الغشاء الخلوي (Firdaus *et al*., 2016)، وهو ما يفسر دوره في مساعدة أنسجة الكبد وبعض الأنسجة الأخرى المتضررة بفعل الاجهاد التأكسدي الناتج الجذور الحرة اما بتدخله المباشر ككاسح للجذور الحرة (Nagi & ALmakki, 2009; Nagi &Mansour, 2000) او دعمه لمضادات الاكسدة الموجودة في الخلية وزيادة كفائتها (Gore *et al*., 2016; Desai *et al*., 2015).

وأوضح Al-Naqeep وجماعته (2009) ان الثايموكوينون يؤثر على تعبير الجينات المسؤولة عن تنظيم الكوليسترول في الجسم من خلال زيادة التعبير الجيني لمستقبلات البروتين الدهني واطيء الكثافة Low density lipoprotein receptor و تثبيط التعبير الجيني لانزيم 3-hydroxy-3-methyglutaryl coenzyme A reductase وبالتالي تثبيط بناء الكوليسترول.

وبين Ashour (2014) ان الثايموكيوينون كان لها اثرا بالغا في تحسين المعايير الدمية في الفئران المصابة بحالة Acute Hemorrhagic Anemia من خلال زيادة نسبة كريات الدم الحمر المتكونة وتركيز الهيموغلوبين وانخفاض هشاشة غشائها ، كذلك فانه يخفض من نسبة تحلل كريات الدم الحمر بنسبة 86.22% و 71.04% في الاشخاص الاصحاء والمصابين بالسكري على التوالي حسب ما اشار اليه Aman و Moin (2013).

وفي دراسة قام بها Badary وجماعته (2000) لمعرفة تاثير الثايموكوينون على مادة الدوكسوروبسين Duxorubicin التي تسبب القصور الكلوي حيث عمل الثايموكوينون على تقليل نسبة البروتينات والدهون المطروحة مع الادرار لدى الجرذان المعاملة بهذه المادة. كما يعمل الثايموكوينون على التقليل من معدل الوفياتmortality في الفئران المصابة بالقصور الكبدي الحاد Acute hepatic failure (Yang *et al*., 2015).

أوضحت البيانات المتوافرة في الدراسات العلمية التي أجريت على الإنسان والحيوانات المختبرية ان الثايموكوينون يمتلك تأثيرا واضحا على الجهاز المناعي وعلى اكثر من صعيد ، اذ

بينت دراسة Guida وجماعته (2016) ان هذا المركب يحمي الخلايا اللمفاوية التائية T-lymphocyte والغدة الزعترية Thymus gland من الضرر المستحدث بأشعة غاما γ-rays ، كما انه يزيد من قابلية الجهاز المناعي على مقاومة الإصابات الفايروسية وذلك بحسب ما اشار اليه Umar وجماعته (2016) في دراستهم على الديك الرومي Turkeys المصاب بفايروس H9N2 المسبب لأنفلونزا الطيور. كما يملك دورا مهما في تقليل أنتاج البروستاكلاندينات ذات التأثير المثبط على المناعة وكذلك انزيم COX-2 و 5-lipooxygenase والذي يعد تكوينهما كرد فعل او استجابة للالتهاب مما يسبب سلسلة من العمليات الحيوية التي تنتهي بموت الخلية المبرمج Apoptosis (El-Sheikh *et al*., 2015; Ragheb *et al*., 2009)، كما اورد Sethi وجماعته (2008) ان للثايموكوينون القدرة على تثبيط تكوين عامل TNF-α على المستوى الجزيئي بأكثر من الية.

والثايموكوينون له مدى واسع من التاثيرات على مجموعة من الحالات المرضية التي تصيب الجهاز الهضمي (Shakeri *et al*., 2016)، اذ يعمل على معالجة حالة التهاب البنكرياس المزمن Chronic pancretitis الناتج عن التسمم بالكحول المترافق مع غذاء عالي الدهون (Suguna *et al*., 2013) ، كذلك يحمي البطانة المعدية Gastric mucosal من خلال زيادة افراز المخاط Mucin secretion وتقليل الافراز الحامضي Acid secretion وتقليل انتاج اوكسيد النتريك Nitric oxide(NO) production (Magdy *et al*., 2012)لذا فانه يعد واحدا من افضل المركبات التي تستعمل في علاج القرحة Anti-ulcer (Oliveira *et al*., 2014).

يمتلك الثايموكوينون دور تثبيطي انتقائي في نمو الخطوط الخلوية السرطانية من خلال عمله في تنظيم التكاثر الخلوي (Shoieb *et al*., 2003) وتثبيط تطور السرطان نتيجة لتثبيطه طرق التنبيه داخل الخلية و كبح تكوين الاوعية الدموية الجديدة Angiogensis المساعدة على انتشار metastasis وتطور السرطان (Khan *et al*., 2015) ، علاوة على دوره في تحريض الموت المبرمج للخلايا السرطانية(Ahmad *et al*., 2013; Woo *et al*., 2013) ، وفي دراسات ذات صلة بينت ان الثايموكوينون يساعد في تقليل الاثار السالبة الناتجة عن المعالجة الكيميائية لأمراض السرطان ، منها دراسة Suddek (2014) التي اوضحت ان المعالجة اعطاء الثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/كغم الى اناث الجرذان قبل المعاملة بعقار Tamoxifen والذي يستخدم في علاج سرطان الثدي، قد ادى الى تقليل نشاط الانزيمات الكبدية وعودتها الى مستواها الطبيعي، فضلا عن تقليل علامات السمية الكبدية الناتجة من العقار.

اما عن تأثيره على الخصوبة، فقد بينت دراسة Kanter (2011) ان الثايموكوينون كان له اثار ايجابية على عملية تكوين النطف Spermatogenesis في الجرذان التي تعرضت بشكل

مزمن لمركب Toluene والذي سبب ضررا بالغا في انسجة الخصى، كذلك بين Al-Zahrani وجماعته (2012) ان تزويد الفئران المجهدة حراريا بالثايموكوينون بتركيز 5 ملغم/كغم لمدة 75 يوما قد اسهم في تجديد الظهارة المولدة Germinal epithelium للنطف في النبيبات المنوية Seminiferous tubules. هذا فضلا عن دراسة Fouad وجماعته(2014) التي اشارت الى دور المركب في رفع تركيز هرمون التستوستيرون Testosterone في الجرذان المعرضة للزرنيخ Arsenic والذي احدث ضررا بالغا في انسجة الخصى Testicular toxicity مؤثرا على تركيز الهرمون فيها.

بينت دراسات عدة ان الثايموكوينون يمتلك اثر تثبيطي فعال ضد الاحياء المجهرية، منها دراسة Ahmad وجماعته (2015) والتي اوضحت ان هذا المركب يثبط نمو بكتريا *E. coli* من خلال تثبيط انزيم ATP synthase الضروري في توفير الطاقة، وكذلك دراسة Abdel-Azeiz وجماعته (2013) التي اشارت الى ان الثايموكوينون يعمل كمضاد للفطريات لذا يحضر منه كريم لمعالجة داء المبيضات Candidiasis في النساء. كذلك يساعد الثايموكوينون على تقليل الاثر السمي الناتج عن السموم الفطرية مثل الافلاتوكسين B_1 Aflatoxin الذي ينتجه الفطر *Aspergillus flavus* (Ahmadabadi *et al*., 2011) .

(4-2) مفهوم الاجهاد Concept of Stress

ان ثمة تأثيرات ظاهرة متعلقة بالظروف الطبيعية على أداء وظائف الكائن الحي و أخرى كامنة تطلقها الظروف الاستثنائية والطارئة و التي تمثل عبئاً يفوق قدرات ما يسببه الظرف الطبيعي، لذا فإن الاستجابة الاستثنائية التي تستنفر القدرات الكامنة للكائن الحي بواحد او اكثر من العوامل الداخلية لإعادة التوازن، هي ما يطلق عليها الإجهاد Stress (Kumar *et al*., 2011 ;Craig, 1985).

وعموما فان جميع العوامل التي تغير من الحالة الطبيعية للكائن الحي تسمى العوامل المجهدة Stress factors او المجهدات Stressors و تشمل عوامل عدة منها فيزيائية وبيئية و كيميائية وفسلجية وخمجية (Armario *et al*., 2004)، كما لا يمكن أن يكون تناول مفهوم الإجهاد متكاملا دون الاشارة الى ان الاجهاد يتضمن زوايا نفسية ومهنية سلط عليها الضوء خلال العقود الاخيرة بشكل مركز وتم تناوله في العديد من الدراسات التي هدفت إلى إبراز تأثيراته وعلاقته ببعض المتغيرات الفسيولوجية (Le Blanc *et al*., 2000) .

ان مواجهة الاجهاد يكون على وفق مراحل عدة تدعى بمجموعها متلازمة التكيف العام General Adaptation Syndrome والتي تشمل في البداية مرحلة الانذار او التنبه Alarm

phase وهي استجابة آنية وتسمى بالية الكر والفر وتكون عن طريق افراز الامينات العصبية الابنفرين والنورابنفرين من لب الغدة الكظرية وتحصل نتيجة لذلك عملية تحلل الكلايكوجين Glycogenolysis والتي ترافقها زيادة سكر الدم ومعدل التنفس وضغط الدم، ثم تليها المرحلة الثانية وتسمى مرحلة المقاومة Resistance التي تتمثل في تحفيز محور تحت المهاد–النخامية–الكظرية Hypothalamus Pituitary Adrenal (HPA) من اجل تكوين الكلوكوز من مصادر غير كربوهيدراتية Gluconeogenesis (Tsigos & Chrouso, 2002)، اما الاخيرة التي تدعى مرحلة الاعياء او الاستنزافExhausted فهي تتصف بنفاذ خزين الجسم من الطاقة الضرورية لمقاومة الاجهاد والتي قد تنتهي بموت الحيوان (Chen *et al*., 2015).

(2-5)الاجهاد الحراري Heat stress

يتمثل الإجهاد الحراري بالتعرض الى درجات الحرارة المرتفعة لمدة قصيرة ومفاجئة وعالية أو لمدة طويلة مزمنة او إلى تمديد أوقات درجات الحرارة المرتفعة(Emery, 2004). كما أن الإجهاد الحراري يشير إلى الجمع بين كل العوامل التي تؤدي إلى اكتساب الحرارة وفقدانها في الجسم (Kumar *et al*., 2011)، وان من العوامل التي تؤدي إلى الإجهاد الحراري هي ارتفاع درجة الحرارة والرطوبة، والتعرض المباشر للشمس أو الحرارة، والمجهود البدني، وبعض ألأدوية والتعرض للأماكن الساخنة والتي تؤثر على الجسم على المستوى الخلوي (Radakovic *et al*., 2007). ويشمل مصطلح الإجهاد الحراري ايضا كل من الارهاق او الانهاك الحراري Heat exhausting والصدمة الحرارية Heat shock الناتجة من ارتفاع الحرارة ومخاطر صحية تحدث نتيجة الإجهاد الحراري التي تسبب توتراً مستمراً غير مريح، إذ تحدث فيه زيادة في درجة حرارة الجسم بمقدار درجتين عن درجة حرارة الجسم الاعتيادية (Riddell & Perkins 2009).

(1-5-2)التنظيم الحراري Thermal regulation

تعتمد استجابة الكائنات المعقدة في التأقلم للظروف البيئية على التكامل الوظيفي للجهازين العصبي والصمي، اذ يتلخص عمل الجهاز العصبي في الاستجابات عالية السرعة وقصيرة الامد التي تؤدي بصورة عامة الى بدء عمل الاليات التنظيمية، في حين تكون الاستجابات الصمية، التي تعتمد على زيادة تركيز اسلاف الهرمونات في الدم، بطيئة ولكن لمدة طويلة (العبدالله، 2007). من جانب اخر تصنف الحيوانات الى نوعين اعتمادا على تاثرها بحرارة البيئة من عدمه، ضمنها ما يوصف على انها متجانسة الحرارة Homoeothermic والتي تحافظ على

ثبات نسبي لدرجة الحرارة ضمن مدى واسع لحرارة البيئة وذلك لكونها قادرة على انتاج الحرارة داخل اجسامها Endothermic ولا تستمدها من المحيط الخارجي، والنوع الاخر يمثل الحيوانات التي تتغير درجة حرارة أجسامها مع تغير درجة حرارة المحيط الذي توجد فيه ويطلق عليها الحيوانات المتغيرة الحرارة والتي تميل الى تنظيم درجة حرارة اجسامها باستخدام وسائل سلوكية أو الانتقال إلى طور السبات أو قد يحدث تعويض أيضوي أو عصبي (Ganong, 2003).

ان درجة حرارة الجسم تتحدد بواسطة التوازن بين كمية الحرارة الناتجة في الجسم وكمية الحرارة المفقودة منه الى المحيط الخارجي، فقد اشار Collier و Gebremedhin (2015) ان تنظيم حرارة الجسم يتم بثلاث اساليب Pathwaysهي الفيزيائي Physical و الكيميائي Chemical والتنظيم السلوكي Behavioral، اذ يشمل الاسلوب الفيزيائي الفقد الحراري المحسوس Sensible heat loss المتضمن بدوره فقد الحرارة من الجسم واكتسابها من خلال التوصيل Conduction والإشعاع Radiation ، والحمل Convection ، اما الفقد الحراري غير المحسوس Insensible heat loss فيتم من خلال زيادة نسبة التبخر عن طريق الجهاز التنفسي بعملية اللهاث Panting او بعملية التعرق نتيجة زيادة ضربات القلب ومرور الدم الى الجلد والأطراف وتوسيع قطر الاوعية الدموية الطرفية (Terrien *et al*., 2011).

اما الاسلوب الكيميائي فيتم خلاله انتاج الحرارة داخل الجسم من خلال الارتعاش Shivering وغير الارتعاش Non shivering وذلك من خلال زيادة معدل الايض الاساس و الحرارة الناتجة عن تناول الغذاء وتمثيله، وفيما يخص الاسلوب او التنظيم السلوكي فيتضمن سلوكيات تتباين تبعا لنوع الكائن الحي مثل غمر الجسم وخصوصا الرأس بالماء عند ارتفاع درجة الحرارة او على العكس من ذلك في حالة انخفاضها مثل التجمع مع بعضها البعض او الحركة الموضعية كذلك نفش الريش وانحناء الجسم وغيرها في الطيور (Terrien *et al*., 2011).

إن درجةَ حرارة الجسمِ هي بالأساس منظمة من خلال اِلتوازنِ بين إنتاجِ وفقدانِ الحرارة فمراكز التنظيم الحراري الواقعة في المنطقة قبلَ البصرية Preoptic region في القسمِ الأمامي منِ تحت المهاد Hypothalamus (Boulant, 2000) تستقبل إشارات عصبية من المستقبلات الحرارية Thermoreceptors الموجودة في تحت المهاد وعلى سِطحِ الجلد إما لزيادة أو خفضِ درجة حرارة الجسمِ عند انخفاضها أو ارتفاعها عن المدى الطبيعي(Schepers & Ringkamp, 2010) فتحت المهاد ينظّم نشاطَ الجهازِ العصبي الذاتي Autonomic nervous system والذي يحافظُ على بقاء درجة حرارة الجسمِ بعدة وسائل ضمن المدى الطبيعي (Morrison &Nakamura, 2011).

يحتوى تحت المهاد على مركز تنسيقي خاص بمختلف عمليات تنظيم الحرارة، فهذه المجموعة من الوحدات العصبية الخاصة في قاع الدماغ تقوم بعمل منظم الحرارة، ويلعب مركز

ضبط الحرارة الرئيس دوراً هاماً في الحفاظ على التوازن الحراري من خلال استقبال الاشارات المرسلة من قبل المستقبلات الحرارية في الجلد، والتي هي عبارة عن نهايات عصبية (مستقبلات محيطية) تستجيب إلى المؤثرات الحرارية التي تبلغ شدة عالية، والتي تزود مركز التحكم الحراري بالحالة الحرارية الراهنة ومراقبة حرارة الدم بصورة رئيسة، وتستطيع الخلايا الموجودة في تحت المهاد من اكتشاف التغيرات في درجة حرارة الدم المتدفق الى هذه المناطق، وبالتالي تنشط الأجزاء الأخرى بالمُهاد لإصدار الاستجابات اللازمة لحفظ الحرارة و المسؤول عنها هو المهاد الخلفي او فقدان الحرارة والتي تقع تحت مسؤولية المهاد الامامي (Morrison &Nakamura, 2011).

تعد حرارة الجلد ذات اهمية بالغة في عملية التنظيم الحراري اذ أن معظم الحرارة المتبادلة بين جسم الكائن الحي والمحيط الخارجي تتم عن طريق الجلد (Romanovsky, 2014)، اذ ان حرارة الجلد تمد جهاز التنظيم الحراري بمعلومات مهمة عن الحاجة لاكتساب أو فقدان حرارة الجسم من خلال النهايات العصبية المنتشرة بكثرة تحت الجلد والتي تكون عالية الحساسية إلى الحرارة وتنقسم هذه النهايات العصبية إلى مستقبلات البرد و الحرارة (Wenger, 2001).وهنالك تباين واسع بين حرارة الجلد وحرارة الاحشاء الداخلية، ويتأثر تنظيم درجة الحرارة الداخلية Core temperature (Tc) بوجود الماء وعدمه وبكمية التدفق الدموي ونشاط الغدد العرقية فضلا عن تأثرها بعوامل بيئية مثل حرارة وحركة الهواء و الأشعة والرطوبة وغيرها (Zine & Shaw, 2004). ان تبادلَ الحرارة يعتمد على كمية سريانِ الدمِ في الأوعية الجلدية و اعتماده على الفرق في درجة الحرارة بين الدمِ والمحيط الخارجي ولما كان معدلُ إنتاجِ الحرارة يعتمد على معدلِ الأيض و الذي يزداد عند ارتفاعِ درجة حرارة الجسمِ، فإن الجو الحار يزيد من كليهما فعندما تكون درجةُ حرارة الجو أعلى من الجلد، فإن الجسم سيكتسب حرارةً (Schepers & Ringkamp, 2010).

تبقى حرارة جسم الحيوانات ثابتة درجة الحرارة مستقرة رغم ما يحصل من تباين في درجة حرارة المحيط ضمن حدود ضيقة، اذ لكل صنف من الحيوانات درجة حرارة تسمى درجة الحرارة المثلى Optimal temperature، وهي الدرجة التي عندها يعمل الجسم بالصورة المثلى وعندما تنخفض او ترتفع درجة حرارة الجسم عن هذه الدرجة يعاني جسم الحيوان كثيراً، وتنخفض درجة حرارة الجسم كثيرا عند النوم وترتفع عند الاستيقاظ كما تتأثر بمدى النشاط الذي يؤديه الكائن الحي وتعود الى مستوياتها الطبيعية بعد التوقف، وترتفع درجة حرارة الجسم طبيعيا عند النساء خلال فترة الحيض Menstrual cycle وخصوصا خلال مرحلة الاباضة Ovulation (Ganong, 2003).

وحرارةُ الجسمِ هي نتاج العمليات الأيضية (Collier & Gebremedhin, 2015)، وأغلب إنتاجِ الحرارة تكون مولدةً في الأعضاء العميقة وبوجه الخصوصِ في الكبد، الدماغِ وفي القلبِ إضافة إلى العضلات الهيكلية أثناء المجهود البدني(Guyton & Hall, 2006) . اذ أن القيام

بمجهود او نشاط عضلي زائد عن المعتاد في الجو الحار و خاصة اذا كان مصحوبا برطوبة عالية سوف يلقي عبئاً إضافياً على نظام التحكم الحراري في الجسم، مما قد يؤدي في بعض الأحيان إلى عجز الجسم عن تنظيم درجة حرارته الداخلية، وبالتالي إلى ارتفاعها كثيراً، الأمر الذي يؤدي إلى حدوث الإصابات الحرارية، وفي حالة عدم تمكن كل من جهاز الدوران ومراكز التنظيم الحراري على مجابهة ارتفاع درجة حرارة الجسم فمن الممكن الوصول الى حالة الاعياء الحراري Heat exhausting (Sawka & Pandolf, 2001)، و يتزامن ذلك مع حدوث نقص في السوائل الجسمية Dehydration من جراء التعرق الغزير و انخفاض حجم بلازما الدم وتوسع الأوعية الدموية الطرفية، وخاصة السفلى، وبالتالي تجمع كمية كبيرة من الدم في الأوردة السفلى من الجسم، ومن ثم انخفاض العائد الوريدي الى القلب، الذي بدوره يقود إلى انخفاض نتاج القلب مما يحدث نقصاً في كمية الدم المتجه إلى الدماغ، خاصة إذا كان ذلك مصاحباً لانخفاض ضغط الدم، والنتيجة هي حالة الإغماء الحراري Heat syncope (Cheung *et al*., 2000).

(2-5-2) تأثيرات الاجهاد الحراري Heat stress effects

ان واحدة من ابرز عوامل البيئة ضرراً على البناء الخلوي للكائن الحي هو ذلك الاجهاد المتمثل بالحرارة العالية التي تؤثر سلباً في التوازن الحراري الخلوي الداخلي Intracellular thermal homeostasis وعند عجز الآليات المحسوسة وغير المحسوسة من التخلص من الحرارة المفرطة Hyperthermia فان هذا الامر يؤدي إلى رفع درجة حرارة الجسم الداخلية Core body CBT Temperature إلى مستويات حرجة تسبب اضرار مباشرة على البناء الخلوي ونتيجتها تؤول إلى الهلاك بالحرارة Heat Stress Mortality (Kumar *et al.*, 2011) .

إن لجهاز الغدد الصم Endocrine و الهرمونات التي ينتجها الأثر الكبير في تنظيم نشاط خلايا وأنسجة الجسم المختلفة فضلا عن تنظيم التمثيل الغذائي (العبدالله، 2007)، وبهذا الصدد فان تأثير الاجهاد الحراري على الغدد الصماء وما ينجم عنه تغيرات واضحة في تراكيز الهرمونات سوف يؤثر على الوظائف التي تؤديها والتي لا ينحصر تأثيرها على هذه الغدد وانما كل انحاء الجسم (Khodaei-Motlagh *et al*., 2011).

تُعد الغدة الدرقية من الغدد المهمة والرئيسة في تنظيم درجة حرارة الجسم وللتغيير في درجة حرارة المحيط الخارجي من خلال تغيير معدل الأيض الأساس الذي من شأنه يؤدي الى تغيير في درجة حرارة الجسم (Rasool *et al.,* 2004). وأشار عدد من الباحثين في دراساتهم الى تأثير فصول السنة من حيث التغير في درجة الحرارة في هرمونات الدرقية في العديد من الحيوانات

كالجاموس والماعز والأغنام (Nazifi *et al.*, 2003)، وان الارتفاع في درجة الحرارة يترافق عادة مع انخفاض فعالية الغدة الدرقية ومن ثمّ انخفاض في فعالية هرموني T3 وT4 (Al-Haidary, 2005)، و وجد Theau-Clement (2000) ان كمية العلف المستهلك تقل في الأرانب عند ارتفاع درجات حرارة البيئة وذلك لتنظيم الحرارة الناتجة ذاتيا من الأيض، اذ يحفز ارتفاع درجةالحرارة المستقبلات الخارجية لإرسال سيالات عصبية إلى تحت المهاد الذى يسبب في إفراز المحفزات لتخفيض إفرازات بعض الغدد منها انخفاض إفراز TSH المحفز لإفراز الغدة الدرقية الذي بدوره يسبب في انخفاض إفراز هرموني T3 وT4. ويرافق ذلك قلة في إفراز هرمون النمو Growth hormone و Prolactin و Catecholamine (Bernabucci, *et al.*, 2010 ;Horowitz, 2002).

وفي دراسة تمت من قبل Sinha (2007) على الجرذان لمعرفة التأثير المزمن Chronic والحاد Acute لدرجات الحرارة، إذ استخدمت درجة حرارة 38م° لمدة أربع ساعات ليوم واحد ولساعة واحدة لكل يوم لمدة 21 ساعة، فأظهرت النتائج إن مستوى كورتيزول البلازما قد ازداد في جميع الفئات العمرية بعد الإجهاد الحراري الحاد ولكن لم يحدث فيها أي تغيير بعد الإجهاد الحراري المزمن.

اشار الكثير من الدراسات إلى ان الإجهاد بكافة أنواعه له تأثيرات عديدة في صفات الدم و مكوناته الخلوية والكيميائية ، لذا فأن للإجهاد الحراري تأثيراً واضحاً فيها، فقد بينت نتائج دراسات عدة تناولت تأثير درجات الحرارة العالية على طبيعة التركيب الكيميائي لأغشية كريات الدم الحمر، كنموذج لدراسة التغيرات التي تطرأ على اغشية للخلايا في الكائنات المعرضة للحرارة العالية، حدوث مسخ للبروتينات فيها وتحللها نتيجة زيادة نشاط الانزيمات المحللة للبروتين proteases يرافقها حدوث تبدل او تحول transition في دهون الاغشية وخصوصا الدهون المحيطية Boundary lipids (Torok *et al.*, 2014; Panin *et al.*, 2010). فضلا عن تأثيره على محتوى الكريات من الهيموغلوبين، اذ تبين أن ارتفاع درجة الحرارة تؤدي الى حصول انخفاض في تركيز الهيموغلوبين Hb في ماشية الحليب (Das *et al.*, 2016).

إن الإجهاد عموما يؤثر على الكائن الحي باليات متعددة وإحداها تتضمن تحورات في الوظيفية المناعية (Hyde, 2000)، اذ لاحظ كل Lazarevic وجماعته (2000) في الدواجن و Vleck و جماعته (2000) لدى البطاريق Penguins ان الإجهاد الناجم من الإجهاد الحراري يتسبب في انخفاض الاستجابة للنظام المناعي ويحدث تغييرات كبيرة في الأعداد والنسب المئوية للخلايا البيض في الدم والتي تؤدي الى اختلال في نسبة الخلايا المتغايرة الى الخلايا اللمفية Heterophil /Lymphocyte ratio (H/L)، وكذلك اوضح Hosseini وجماعته (2015) في دراستهم على الدجاج المعرض لدرجة حرارة 33 م لمدة 10 ساعات يوميا طوال 22 يوم تبين أن الإجهاد ينجم عنه تغيرات واضحة في توزيع الخلايا البيض في الدم اذ ارتفعت النسبة المئوية

للخلايا المتغايرة معنويا في حين انخفضت النسبة المئوية للخلايا اللمفية وبالتالي ارتفاع نسبة H/L، اذ ينخفض معدل تكاثر الخلايا اللمفية Cell proliferative (Amaral *et al*., 2010) كما اظهرت نتائج دراسة كل من Amaral وجماعته (2011) و Gomes وجماعته (2013) في ابقار الحليب Dairy cows ان الاجهاد الحراري قد خفض من انتاج الاجسام المضادة IgG مقارنة مع الابقار التي يتم تربيتها في اجواء باردة. ويؤدي تعرض الفروج للحرارة العالية إلى فقدان الالتهام الخلوي Phagocytosis للخلايا البلعمية الكبيرة وانخفاض أوزان الأعضاء اللمفاوية المسئولة عن تحفيز المناعة (Deng *et al*., 2012; Bartlett & Smith.,2003) .

إن تعريض الكائن الحي الى أنواع مختلفة من الإجهاد يؤدي الى اضطراب في المعايير الكيموحيوية والتي تعد من المؤشرات المهمة الدالة على الحالة الصحية للكائن من النواحي الإنزيمية و الايضية التي تتأثر بشكل أو بآخر بما يتعرض له الحيوان من حالات الإجهاد المختلفة، اذ أشار Gudev وجماعته (2007) في دراستهم على الجاموس الى أن مستويات البروتين الكلي بالبلازما انخفضت معنوياً أثناء التعرض للإجهاد الحراري، وهذا مشابه لما جاءت به دراسة Ondruska وجماعته (2011) في الارانب والذي رده الى انخفاض معدل اتصنيع وزيادة التحطم او الى تخفيف الدم بسبب زيادة معدل شرب الماء، كما وجدت Ismail (2013) ان تركيز الالبومين والذي يعد الاعلى تركيزا بين بروتينات البلازما قد انخفض معنويا بتأثير الاجهاد الحراري لدى نوع من الكباش يدعى الاوسيمي Ossimi، وهذا مشابه لما اورده Urwat وجماعته (2015) من ان تركيز الالبومين كان اقل معنويا في الصيف عنه في بقية الفصول في الماعز.

وفي دراسة قام بها Lin وجماعته (2000) على فروج اللحم المعرض للإجهاد الحراري وجد حصول تدهور في البروتين الكلي وارتفاع تركيز سكر الكلوكوز في البلازما ، وفي الماعز أظهرت النتائج التي حصل عليها Abdelatif وجماعته (2009) أن تركيز البروتين الكلي والالبومين و الكلوكوز كان اقل معنوياً في الصيف عما هو في الشتاء وهذا مشابه لما جاء في دراسة Kataria وجماعته (2008) حول تأثير فصول السنة على نوع من أنواع الماعز يعرف Marwaria.

وفي دراسة تضمنت تحديد تأثير التعرض مهنيًا للحرارة العالية مددًا طويلة في بعض المتغيرات الكيموحيوية لحوالي 170 عامل في افران معامل الاسمنت وسباكة المعادن والحديد والصلب فضلا عن العاملين في افران الخبز اذ اظهر المتعرضون للحرارة إنخفاضًا معنويًا في تركيز البروتين والكوليسترول الكلي، وإرتفاعًا معنويًا في فعالية الانزيمات ALT و AST وتركيز اليوريا مع زيادة مدة التعرض مقارنة بمجموعة السيطرة (جانكير والجبوري، 2007).

كما إن التعرض الطويل والقصير الأمد لدرجات الحرارة من شأنه أن يؤدي الى حدوث تغيرات في ايض الدهون عموما وتركيز الكولستيرول والكلسيريدات الثلاثية مع ارتفاع درجة الحرارة وهذا ما أشار أليه

العديد من الباحثين اذ اشار Ondruska وجماعته (2011) و Ayyat وجماعته (2002) في دراستهم على الارانب النيوزيلندية Newzealand rabbit الى ارتفاع التركيز الكلي للدهون في البلازما اثر التعرض للحرارة العالية مقارنة مع الارانب التي ربيت في ظروف اعتيادية.

وذكر Altan وجماعته (2003) أن الإجهاد الحراري يزيد أكسدة الدهون التي تتزامن مع توليد الجذور الحرة والتي تكون قادرة على بداية أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة وان مضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية لها أهمية كبيرة للجسم للدفاع ضد الجذور الحرة الناتجة من الإجهاد التاكسدي المتولد بسبب التعرض للحرارة (Agarwal & Prabhakaran, 2005)، اذ أوضح Sivakumar و جماعته (2010) في دراسة أجريت على الماعز لمعرفة تأثير الحرارة في بعض المعايير ومنها مضادات الأكسدة وجود انخفاض في مستويات فيتاميني E و C في المجاميع المعرضة للإجهاد الحراري مقارنة مع السيطرة.

واشارت دراسة قام بها Sandercook وجماعته (2001) الى ان تعريض الدجاج البياض Broiler chickens لدرجة حرارة 32 مْ لمدة ساعتين سبب ارتفاع فعالية انزيم Creatine kinase في البلازما والذي يعد مؤشرا على ضرر العضلات الهيكيلية Skeletal muscle damage.

الحرارة تعد من العوامل المؤثرة على انتاجية الحيوانات والتي تفوق في تأثيرها العوامل البيئية الاخرى كالرطوبة وشدة الضوء والتهوية مجتمعة بالرغم من ان لهذه العوامل تأثيراً غير مباشر على الاستجابة او المقاومة لتأثير ارتفاع درجة الحرارة (Charles، 2002)، اذ أشار Tao وجماعته (2006) الى ان تعرض الدواجن الى درجات حرارة عالية يسبب سلسلة من التغيرات الفسيولوجية من ضمنها ارتفاع درجة حرارة جسم الطير وتسارع معدل التنفس واللهثان Panting والقلوية التنفسية Respiratory alkalosis، و اوضح Lu *et al.,* (2007) ان تربية الدواجن التي بعمر 8 اسابيع ضمن معدلات حرارة تقترب من 34 مْ يسبب انخفاض جودة اللحوم Meat quality و تباطؤ معدلات النمو والزيادة الوزنية والدهون المترسبة Fat deposition. و اشارت العديد من الدراسات بان صفة انتاج البيض تتأثر بدرجة حرارة تربية المسكن والتي تؤدي عند ارتفاعها إلى تدهور في القابلية الانتاجية للبيض و معدلات كفاءة تحويل واستهلاك العلف وانخفاض جاهزية العناصر الغذائية أثناء تعريض الدجاج للإجهاد (Quinteiro-Filho *et al*., 2010)، فضلا عن تراجع نوعية قشرة البيض (Lin *et al*., 2004).

تشير عدد من الدراسات التي تتناول التدريب البدني المستمر او المتقطع لفترات طويلة في الجو الحار أن إرتفاع حرارة العضلات النشطة الناتجة من الإنقباض العضلي الهيكلي الإضافة إلى الحرارة الناتجة من التفاعلات الكميوحيوية والأيضية (Robergs & Roberts, 2000)، ينتج عنه

تنافس في كمية الدمِ بين الجلد وبين العضلات النشطة والتعرقَ لتبديد الحرارة الزائدة وينجم عن تلك الظروف نقص في حجمِ الدمِ Hypovolemia بالتالي الجفاف مما يؤدي الى انخفاض النتاج القلبي والضغط الشرياني فتتجمع كمية كبيرة من الدمِ في الأطراف السفلية والحوضِ ما يؤدي إلى انخفاضِ أداء اللاعب والتوقف نهائيا (Girard, *et al*.,2015).

وبينت دراسات عدة تاثير التعرض للحرارة العالية على الجهاز العصبي في الانسان فضلا عن الحيوانات المختبرية، منها حصول تغيرات تركيبية في الدماغ وزيادة نشاط الخلايا الدبقية Glial cells activation وزيادة انتاج الجزيئات المسببة للالتهاب Inflammatory molecules induction مما يسبب فقدان للذاكرة Memory loss و موت للخلايا العصبية Neuronal death (Lee *et al*., 2015;Kim *et al*., 2013;Gaoua, 2010).

بينت دراسات أخرى أن للحرارة تأثيرات متفاوتة على الأجهزة التكاثرية في كل من الذكور والإناث في الإنسان والحيوانات المختبرية، إذ أشار كل من Marai وجماعته (2002) و Obidi و جماعته (2008) أن ارتفاع درجة حرارة الخصى يسبب انخفاضا في جودة النطف sperm quality وكثافتها quantity فضلا عن اضطرابات هرمونية متعددة مما يسبب تراجعاً واضحاً في الخصوبة (Setchell, 2006) ، وبين الدوري (2002) ان تأثير الاجهاد الحراري كان سلبيا في خصوبة الابقار اذ تراوحت نسبة الحمل ادناها لدى الابقار التي تلقح خلال الاشهر الحارة (حزيران – ايلول) وكان الارتباط بين انتاج الحليب اليومي ومعدل الحرارة الجوية سالباً.

(2-5-3): الاستجابة الحرارية Thermal response

ان قدرة الكائن الحي على الاستجابة للحث الحاصل بالاجهاد الحراري تهدف الى إعادة الاتزان الخلوي وانتظام فعاليات الحياة وحماية الخلية من التأثيرات الضارة للمجهدات Stressors ومن امثلتها الحرارة من اجل ديمومة التفاعلات الكيموحيوية من تفاعلات انزيمية وعمليات انتاج بروتين وانتظام الايض الحيوي للطاقة وعمليات النقل ومسارات الايض ومسارات الاشارة Signal pathways (Cui *et al*., 2016) .

وبهذا الصدد فقد أجريت العديد من الدراسات المختلفة على نماذج حيوانية متنوعة و ذلك لفهم و تفسير الآليات المسئولة عن الاستجابة الحرارية، لذا اقتراح الباحثين العديد من الفرضيات أهمها الاجهاد التأكسدي و ذلك من خلال التأثير على النظام المضاد للأكسدة Antioxidant system في الجسم فضلا عن كل انواع البروتينات التي تستحث بواسطة العوامل المجهدة والمتمثلة ببروتينات الصدمة الحرارية (Pei *et al*., 2011).

(2-5-3-1) بروتينات الصدمة الحرارية Heat shock proteins

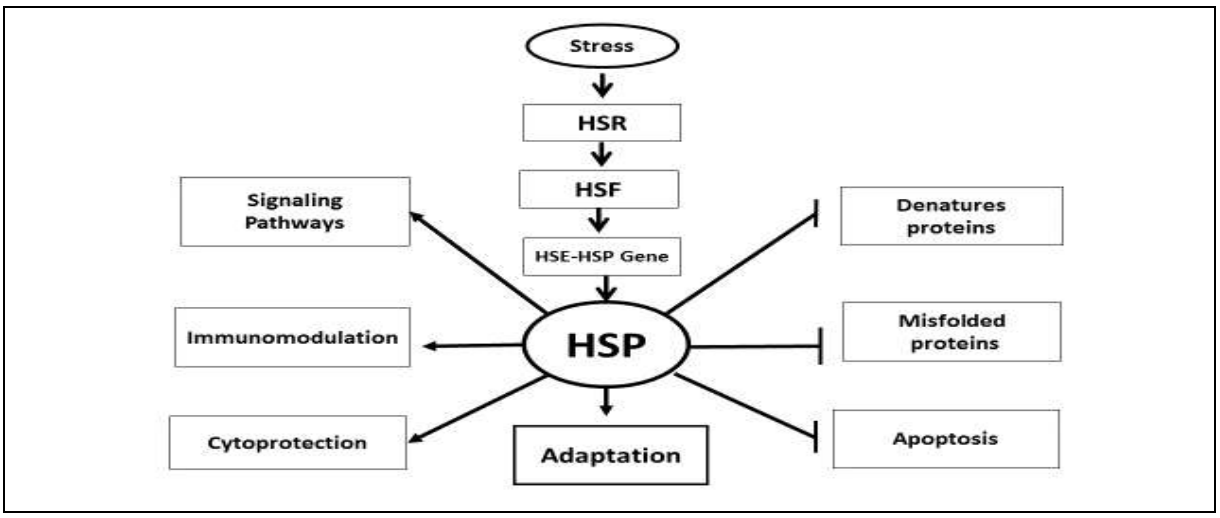
ان استجابة الكائنات الحية لارتفاع درجة الحرارة قد لوحظت في اغلب الكائنات ابتداء من الاحياء الدقيقة Microorganisms فالنباتات والحيوانات وكذلك لوحظت عند الانسان Human (Kregel, 2002) ، ان هذه الاستجابة للإجهاد الحراري تؤدي إلى حث الآليات الحيوية لإنتاج صنف من عديد الببتايد Polypeptides سميت ببروتينات الاجهاد Stress proteins وهي عبارة عن مرافقات جزيئية Molecular chaperones تحمي البروتينات من المسخ وتسهل إعادة طي البروتينات التي بالإمكان إعادة طيها اما البروتينات غير القابلة للإعادة تتم ازالتها بعملية التحلل البروتيني Protolysis (Tutar &Tutar, 2010).

ان الاسم الغالب على بروتينات الاجهاد هو اسم بروتينات الصدمة الحرارية Heat shock proteins ويرمز لها (HSPS) وذلك لان اول ملاحظة لها تمت بوساطة عامل الاجهاد الحراري ومن قبل Ferruccio Ritossa في العام 1962 في حشرة ذبابة الفاكهة ولم يعرف أي شيء عنها لغاية عام 1974 عندما تم اول تحديد لجينات بروتين الصدمة الحرارية Heat shock protein genes والتي عرفت بعد ذلك ببروتينات الاجهاد الحراري وبقي هذا الاسم يطلق على كل انواع البروتينات التي تستحث بواسطة العوامل البايولوجية Biological والفيزياكيميائية Physicochemical المجهدة (Tkacova & Angelovicova, 2012) .

ان بروتينات الاجهاد تتبع عوائل متعددة الجينات وذات معدلات اوزان جزيئية متباينة و قد قسمت إلى ثلاثة عوائل رئيسية كبيرة Major Protein families هي HSP90 و HSP70 و HSP60 والى عائلة صغيرة Small HSP family والتي تحتوي بروتينات ذات اوزان جزيئية من 15 KDa الى 30 KDa (Rajoriya *et al.*, 2014) . وبين Gosslau وجماعته (2001) ان معدلات افراز بروتينات الصدمة الحرارية يزداد مع زيادة شدة التعرض للعامل المجهد الحراري مع زمن التعرض، في حين اوضح كل من Guerreiro وجماعته (2004) و Zulkifli وجماعته (2014) ان عوامل هرمونية كثيرة تشترك في تنظيم افراز بروتينات الصدمة الحرارية HSPs مثل الهرمونات الستيرويدية و الكورتيكوستيرون التي تفرز من قشرة الغدة الادرنيالية للحيوانات المجهدة ربما بصورة مباشرة شاركت في تخليق HSPs، وقد اكد Deane وجماعته (2000) ان هرمون البرولاكتين يمثل هرمون اجهاد مؤثر في استنساخ mRNA لبروتين HSP70.

وقد اكدت نتائج دراسات عديدة ان تخليق بروتينات الصدمة الحرارية وخصوصا بعمر مبكر يحسن قابلية البقاء ومقاومة درجات الحرارة العالية في الاعمار اللاحقة عند التعرض لتحدي حراري

وهذا ما اشار اليه Zulkifli وجماعته (2000) في دراسة اجروها على فروج اللحم التي بعمر 35–41 يوماً والتي عندما عرضت لحرارة 1±38°م لمدة 2 ساعة باليوم ولمدة اسبوع اكتسبت مقاومة حرارية عندما قورنت بالطيور التي لم تعرض لإجهاد حراري وكان متوسط الهلاك 5% بالمقارنة مع المعاملة غير المجهدة التي سجلت متوسط هلاك بلغ 17% .



شكل(2–3): تأثير الاجهاد على انتاج بروتين الصدمة الحرارية ووظائفه (Khalil *et al*., 2011)

(2-3-5-2) مضادات الاكسدة Antioxidants

يطلق مصلح مضادات الأكسدة على كل مادة أو مركب له فعالية ضد الأضرار التأكسدية و يعمل على تأخير أو الوقاية من فعل الجذور الحرة Free radicals والانواع الاوكسجينية النشطة Reactive oxygen species (ROS) (Miquel,2002)، والخطر الرئيس الناتج من هذه المركبات تكمن في التلف الناتج عن تفاعلها مع مكونات الخلية خاصة الدهون، بما في ذلك الدهون الغشائية و الأحماض الدهنية الحرة والغشائية (Sachdev & Davies, 2008) والبروتينات (Negre *et al*., 2008) و DNA (Rahman, 2007) وهنالك ادلة على انها متضمنة في الكثير من الاليات الاساسية للعديد من الامراض (Devasagayam *et al*., 2004).

وتنتج الجذور الحرة و الأنواع النشطة بتراكيز ضعيفة طبيعا من مصادر داخلية متمثلة بالعمليات الأيضية، ويكون هذا الإنتاج مراقبا بدقة بواسطة الجهاز الدفاعي المضاد للأكسدة (Valko *et al*.,2007)، كما ان هناك عوامل خارجية التي يمكن أن تؤدي إلى تكوين الجذور الحرة مثل الاشعة فوق البنفسجية (Pavlou *et al*., 2009) واكسدة الادوية والكحول والمبيدات و التبغ (Mari *et al*., 2010) و المعادن السامة كالنيكل والنحاس (Koivula *et al*., 2011) و المخدرات (Portugal-Cohen *et al*., 2010) فضلا عن تأثير العوامل البيئية المختلفة ومن ضمنها درجة الحرارة (Arnaud *et al*.,2002).

وتعمل مضادات الأكسدة على الحماية بعدة طرق إما بالتثبيط المباشر او اعاقة إنتاج الجذور الحرة ، أو ازالة الجذور الحرة من خلال وهب الكترون وتحويل جذور الاكسجين الفعال الى بيروكسيد الهيدروجين الذي هو اقل فعالية من الأول او ربطها بمركبات خلوي للتقليل من ضررها (McDowell *et al*. 2007).

تستعمل الخلية العديد من الآليات المضادة للأكسدة وتختلف طبيعة هذه الأنظمة المضادة للأكسدة حسب الأنسجة والنوع الخلوي وحسب تواجدها في الوسط داخل وخارج الخلوي، وتقسم الأنظمة المضادة للأكسدة حسب اسس مختلفة الى مجاميع عدة من مضادات الاكسدة،اذ قسمت من قبل Halliwell و Gutteridge (1989) الى ثلاث اصناف تضمنت مضادات الاكسدة الاولية Primary antioxidants والتي تمنع تكون المؤكسدات، والثانوية Secondary والتي تعمل على كسح Scavenger الجذور الحرة، والثالثية Tertiary والتي تعمل على اصلاح الجزيئات المتأثرة بفعل الجذور الحرة. كما تقسم حسب ذوبانيتها Solubility الى مضادات اكسدة محبة للماء Hydrophilic antioxidants والتي تنشط في السايتوبلازم وبلازما الدم في حين ان مضادات الاكسدة الكارهة للماء Hydrophobic فتحمي دهون غشاء الخلية Cell membrane من الاكسدة (Kibanova *et al*., 2009).

كما تصنف مضادات الاكسدة حسب مصدرها الى مضادات اكسدة داخلية Endogenous التي يصنعها جسم الكائن الحي بنفسه، ومضادات اكسدة خارجية Exogenous والتي تأتي من الأغذية او اي مصادر نباتية اخرى (Noori, 2012).

وهنالك نوع من مضادات الأكسدة المصنعة والتي تعد عنصر أساسي يتم إضافته للأطعمة المعلبة للتقليل من فسادها إلى أقصى حد وذلك لتأكسدها قبل غيرها، منها Butylhdroxyanisole (BHA) و Butylhydroxytoluene (BHT) و tetre-butylhydroquinone (TBHQ) وهذه المركبات واسعة الإستعمال في الصناعة الغذائية، لأنها فعالة وقليلة التكلفة بالمقارنة مع مضادات للأكسدة الطبيعية وغير سامة ولكن لها اضرار جانبية على المدى البعيد لذلك تم التخلي عنها في دول الإتحاد الأوروبي مؤخرا (Wojcik *et al*., 2010). كما تتضمن مضادات الاكسدة عدد من البروتينات الماسكة Chelating proteins للايونات المعدنية وتعمل هذه البروتينات على نقل الايونات مثل الحديد والنحاس وبذلك فهي تمنع هذه الايونات من تشكيل الجذور الحرة مثل كل من الالبومين Albumin والميتالوثيونين Metallothionein والترانسفرين Transferrin واللاكتوفيرين Lactoferrin والسيرلوبلازمين Cereoplasmin (Sanocka & Kurpisz, 2004) .

والتقسيم الشائع لمضادات الاكسدة يميل الى تقسيمها الى مضادات اكسدة انزيمية Enzymatic a ومضادات الاكسدة غير الانزيمية Non Enzymatic ، اذ تنتج مضادات الاكسدة الانزيمية من قبل جسم الكائن الحي في حين غير الانزيمية لا تنتج من قبل الجسم وتتميز بأوزان جزيئية منخفضة (Yin & Chan, 2007) . ومما تجدر الاشاره اليه ان مضادات الأكسدة بصفة عامة تعمل كمجموعة واحدة متكاملة ضد أنواع مختلفة من الجذور الحرة في أجزاء مختلفة من الخلايا وفي مواضع مختلفة من الجسم وبطرق مختلفة أيضاً أي أن تأثيراتها مجتمعة تكون أفضل من تأثير كل مضاد أكسدة بمفرده، كما تستعيد بعض مضادات الأكسدة فاعليتها بواسطة مضادات الأكسدة ألأخرى وهذه إحدى الأسباب الهامة لتأثيرها التآزري (Wang *et al*., 2011).

(2-5-3-2-1) مضادات الاكسدة الانزيمية Enzymatic antioxidants

يمتلك الجسم العديد من الإنزيمات المضادة للأكسدة أهمها Superoxide Dismutase و Catalase و Glutathion reductase و Glutathion peroxidase (Desai *et al*., 2010)،

صنف انزيم Superoxide Dismutase ضمن البروتينات المعدنية، إذ عُزل لأول مرة 1959 ووصف انه من البروتينات الحاوية على النحاس و يعد من الإنزيمات المشاركة في تحليل النواتج السامة للايض في الخلية فهو يقوم بإزالة الجذر O وذلك بتسريع معدل تحوله إلى H_2O بمساعدة بعض المعادن مثل السيلينيوم والنحاس والزنك (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). و يوجد ثلاث نظائر إنزيمية لSOD في الثدييات والتي تختلف حسب توزعها الخلوي والمعدان المرتبطة بها، منها Cu/Zn-SOD الذي يتواجد أساسا في السايتوبلازم و النواة، و Mn-SOD الذي يتواجد في الميتوكندريا أما الشكل Ec-SOD فيتواجد خارج الخلية (Yen *et al*., 2009).

اما إنزيم Catalase (CAT) فيتكون من أربع تحت وحدات، تحتوي كل تحت وحدة على مجموعة هيم مرتبطة بالموقع النشط و يعمل على التخلص من H_2O_2 وذلك بتحويله إلى H_2O و O_2 (Odajima *et al*., 2010). يتواجد الانزيم هذا في أغلب الكائنات الحية وفي كل أعضاء الجسم ويتركز خاصة في الكبد و كريات الدم الحمراء و الكلى وبكميات قليلة في المخ والقلب و العضلات الهيكلية، كما يتواجد في الميتكوندريا و السايتوبلازم و البيروكسيزومات (Day, 2009).

ويتواجد كل من Glutathione reductase (GR) و Glutathione peroxidase (GPx) فيالمايتكوندريا و السايتوبلازم، و يعتبران من أهم الأنظمة الإنزيمية المضادة للأكسدة، وذلك لقدرتهما على إزاحة عدد من الجذور و الهيدروبيروكسيدات الناتجة عن أكسدة الكولسترول و الأحماض الدهنية(Herbette *et al*.,2007). ويكون GPX حساس لتراكم الجزيئات الأوكسجينية

و النتروجينية النشطة ROS/RNS وقد تتسبب الاضطرابات في السلسلة التأكسدية في إصابة ذرة السيلينيوم المتوضعة في الموقع النشط له مسببة عجزه عن أداء وظائفه وبالتالي الانخفاض في نشاطه (Mariana *et al*., 2009).

(2-2-3-5-2) مضادات الاكسدة غير الانزيمية Non-Enzymatic antioxidants

على عكس مضادات الأكسدة الإنزيمية، معظم مضادات الاكسدة غير الانزيمية لا تنتج من قبل الجسم وتتميز بأوزان جزيئية منخفضة مثل الفيتامينات C و E و ubiquinone و Glutathione و Carotenoid (Karthikeyan & Rani, 2003) كما يمكنها أن تكون داخلية المنشأ مثل الميلاتونين Melatoninوالمرافق الانزيمي coenzyme Q وحامض اليوريا Uric acid (Noori, 2012). وكما تشمل مضادات الاكسدة غير الانزيمية مركبات مثل N-acetyl-L-cysteine (NAC) وCarnitines (Yin & Chan, 2007)، فضلا عن مركبات نباتية مختلفة حضت حديثا باهتمام كبير لنشاطاتها الحيوية الكبيرة وتساهم في الدفاع الخلوي المضاد للأكسدة اهمها الفلافونويدات حيث تسهم في تحريض تعبير الإنزيمات المضادة للأكسدة، وتجديد الأنظمة المضادة للأكسدة (He *et al*., 2010).

و الجلوتاثيون Glutathione عبارة عن ببتيد قصير مكون من ثلاثة أحماض أمينية هي glutamic وcysteine وglycine يشكل اكبر مركبات الثايول الخلوية وفرة في مختلف الكائنات الحية كالانسان والحيوان والنبات والاحياء ويعمل كمساعد لعدد من الانزيمات المضادة للاكسدة ويساهم ايضاً في فعالية بعض الانزيمات من خلال وجوده كمادة اساسية Substrate او مرافق انزيمي Coenzyme لبعض العمليات الانزيمية في الخلية (Rybka *et al*., 2011) . ويقوم كل من فيتاميني E وC بمساعدة النظام الدفاعي للجسم على إزالة سمية بعض المواد الكيميائية وذلك عن طريق عملية الأكسدة والاختزال في الجسم (Abba *et al*., 2015)، ويعد فيتامينE والمعروف ايضا باسم من المركبات الذائبة في الدهون ويتواجد على مستوى الأغشية ويثبط سلسلة تفاعلات فوق أكسدة الدهون (Anwar *et al*., 2007) ، اذ يتفاعل مع الجذور الليبيدية و يمنع انتشارها و يعمل على إستخلاب Chelating هذه الجذور ويتحول بدوره إلى جذر حر لكنه أقل نشاطا مقارنة بجذر البيروكسيلLOO• (Naziroglu *et al*., 2010).

ويمكن لفيتامين C أن يقوم بإزاحة الجذور الحرة الناتجة عن الايض الخلوي كما يمكنه إستخلاب المعادن و منع أكسدة LDL كما يعمل على رفع فعالية فيتامين E وذلك بإرجاع الجذر α-tocopheryl (α-TO•) (Ryan *et al*., 2010) .

(3): المــواد وطرائق العمل Materials & Methods

(3-1): الأجهزة والأدوات Equipments & Instruments

تضمنت الدراسة الحالية استعمال مجموعة من الاجهزة والأدوات يوضحها الجدول (3-1).

جدول (3-1): الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة الحالية.

اسم الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
مجانس زجاجي Glass homogenizer	ChangZhou	China
جهاز Elisa reader	Biochrom	England
مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-spectrophotometer	Cecil Instrument Ltd.	England
فرن كهربائي Oven	Gallen Kamp	England
محرك مغناطيسي Magnetic Stirrer	Gallen Kamp	England
حاضنة كهربائية Incubator	Gallenkamp	England
جهاز الطرد المركزي الدقيقCentrifuge	Hawksley	England
جهاز مزج المحاليل Auto Vortex	Stuart Scientific	England
عدة تشريح Dissection Set	Elphor	Germany
جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Elpher	Germany
جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Heraeus-Christ	Germany
حمام مائي Water Bath	Karl-kob	Germany
جهاز التقطير البخاري Steam Distillation Apparatus	Karl-kob	Germany
جهاز الطرد المركزي المبرد Cooled Centrifuge	Hermle	Germany
مؤصدة Autoclave	TOMYR®	Germany
ميزان حساس Melter AE 200	Sartouis	Germany
جهاز الدورات الحرارية PCR thermocycler	Bioneer	Korea
جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge	Bioneer	Korea
أنابيب ابندورف Eppendorf tube	Firatmed	Turkey
جهاز Miniopticon Real-Time PCR	BioRer	USA
جهاز Nanodrop spectrophotometer	Thermo	USA
حاوية النتروجين السائل	Rockefeller	USA

(3-2):المواد الكيميائية والعدد التشخيصية Chemicals & Kits

يوضح الجدول (3–2)المواد الكيميائية والعدد التشخيصية المستخدمة في الدراسة الحالية.

جدول(3-2): المواد الكيمائية والعدد التشخيصية المستعملة في الدراسة الحالية

المادة الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشأ
كلوروفورم Chloroform	BDH	England
صبغة الترحيل Loading dye	Bio-Labs	England
كحول مثيلي مطلق Absolute methanol	BDH	England
كحول اثيلي مطلق Absolute ethanol	BDH	England
الثايموكوينون Thymoquinone	Sigma Aldrich	England
اكاروز Agarose	Sigma Aldrich	England
زايلازين Xylazine	Alfasan	Holand
كحول الايزوبروبانول Isopropanol	Labort,	India
الماء الخالي من انزيمات تحليل الاحماض النووية	Bioneer	Korea
الحامض النووي القياسي DNA Ladder	Bioneer	Korea
AccuZol™ Total RNA Extraction Kit	Bioneer	Korea
AccuPower® Greenstar™ qPCR PreMix	Bioneer	Korea
AccuPower® RocktScript RT PreMix	Bioneer	Korea
داريء Tris-Borate EDTA TBE buffer	Bioneer	Korea
عدة تقدير تركيز انزيم ALP	ABO	Switzerland
عدة تقدير تركيز GSH	ABO	Switzerland
عدة تقدير تركيز انزيم SOD	ABO	Switzerland
عدة تقدير تركيز انزيم CAT	ABO	Switzerland
عدة تقدير تركيز MDA	ABO	Switzerland
عدة تقدير تركيز انزيم ALT	ABO	Switzerland
عدة تقدير تركيز انزيم AST	ABO	Switzerland
عدة تقدير فعالية GSH-px	ABO	Switzerland
عدة تقدير فعالية GSH-r	ABO	Switzerland
عدة تقدير فعالية GSH-t	ABO	Switzerland
كيتامين Ketamine	Elsaad pharma	Syria
صبغة بروميد الاثيديوم Ethedium bromide	Promega	USA
Genomic DNA Minikit (Tissues)	Geneaid	USA
داي اثيل بايكربونات DEPC	Invitrogen	USA
Trizol® reagent	Invitrogen	USA

(3-3): حيوانات الدراسة Study Animals

تم استخدام ذكور الجرذان البيض Albino Rats في الدراسة الحالية، اذ تم تربيتها في البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري بجامعة القادسية. بلغ معدل اوزان ذكور الجرذان المستخدمة 135±15غم وبعمر 9–10 اسابيع ، ربيت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية ذات أبعاد (50×35×15) سنتمتراً ذات أغطية معدنية مشبكه فُرشت بنشارة الخشب وكان يتم العناية بنظافة الأقفاص وتعقيمها مرتين في الاسبوع باستخدام المطهرات. وأخضعت الحيوانات في جميع مراحل التجربة إلى ظروف مختبريه متشابهة من حيث التهوية ودرجة الحرارة (22±2 م) و الإضاءة (12 ساعة ضوء إلى 12 ساعة ظلام). وتم تقديم الماء والغذاء لها بشكل مفتوح *ad libitium* إذ تم تصنيع العليقة بشكل أصابع حسب التركيبة المبينة في (ملحق-1) (Ward, 1970).

(4-3): تصميم الدراسة Study Design

تضمنت استخدام ذكور بالغة، وزعت عشوائياً إلى أربع مجاميع متساوية العدد، تضم كل منها 48 جرذ، عوملت لمدة 42 يوم على النحو الآتي :

1. مجموعة السيطرة Negative control (NC): زودت بالعليقة وماء الشرب الاعتيادي وربيت تحت درجة حرارة اعتيادية (22–24) مْ طيلة مدة التجربة.
2. مجموعةHeat stress (HS): زودت بالعليقة وماء الشرب الاعتيادي وعرضت لدرجة حرارة (35–40) مْ لمدة ستة ساعات يوميا طيلة مدة التجربة.
3. مجموعةHeat stress+thymoquinone(HSTQ): زودت بالعليقة وماء الشرب الاعتيادي وعرضت لدرجة حرارة (35-40) مْ لمدة 6 ساعات يوميا، واعطيت عقار الثايموكوينون يوميا بجرعة 50 ملغم/كغم من وزن الجسم طيلة مدة التجربة.
4. مجموعة Thymoquinone(TQ) : زودت بالعليقة وماء الشرب الاعتيادي وعرضت لدرجة حرارة اعتيادية (22–24) مْ واعطيت عقار الثايموكوينون يوميا بجرعة 50 ملغم/كغم من وزن الجسم طيلة مدة التجربة.

(5-3): التضحية بالحيوانات وسحب الدم

تم تخدير الجرذان بعد انتهاء مدة التجربة بحقن مزيج من 0.3 مل كيتامين و 0.1 مل زايلازين لكل كغم من وزن الجسم تحت غشاء الخلب I.P، بعدها تم سحب نماذج دم من الوريد البطني Abdominal vein باستعمال محقنه طبية سعة 5 مل ووضع الدم في أنابيب اختبار

زجاجية نظيفة خالية من مانع التخثر EDTA، وبعد حصول عملية التخثر تم تدويرها بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة لغرض الحصول على مصل الدم، الذي وضع في أنابيب بلاستك سعة الواحدة منها 1مل وحفظت بدرجة−20 مْ إلى حين إجراء الفحوصات عليها .

(3-6): تحضير مجانس الكبد Liver homogenization

بعد تشريح الجرذان تم استئصال الكبد وحفظه في انابيب حاوية على المحلول الملحي الفسيولوجي المتعادل، ثم تم تقطيع النماذج الى قطع صغيرة ومن ثم مجانستها باستخدام المجانس الزجاجي Glass homogenizer .أجريت هذه العملية والعمليات التالية بدرجة 4 مْ وباستخدام محلول السكروز (0.88 M) واستمرت العملية الى ان اصبح مزيجا متجانسا، ثم بعدئذ نقل المجانس النسيجي الى جهاز الطرد المركزي ونبذ بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 3 دقائق وكررت هذه العملية لثلاث مرات وفي كل مرة اخذ الراشح supernatant واهمل الراسب .ثم تم تدوير الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد عالي السرعة Cooled ultra-centrifuge بسرعة 7000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق بعدها نقل الراشح الى انابيب سعة 1 مل وحفظ بدرجة −20 مْ إلى حين إجراء الفحوص عليها .

(3−7): المعايير المدروسة

(3-7-1): تقدير انزيم AST في المصل وأنسجة الكبد Serum & liver AST estimation

(3-1-7-1) المبدأ الأساسي Basic principle

تم التحري عن انزيم AST في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق−2) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بانزيم AST المثبتة في حفر wells لاطباق او صفائح من مادة البولستيرين Polystyrene حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بالانزيم وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول

ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئيSpectrophotometer عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد تركيز الانزيم في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(2-1-7-3): طريقة العمل **Procedure**

1. تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز :16 ng/ml، 8ng/ml، 4ng/ml، 2ng/ml ، 1 ng/ml (ملحق-3).

2. تم إضافة 40 مايكروليتر من محلول تخفيف العينة و10 مايكروليتر من العينة الى حُفرة عينة الاختبار وبالنهاية خففت العينة خمس مرات (تبقى الحفرة الفارغة blank على حدة ولا يضاف اليها العينة وHRP-Conjugate reagent وتجري عليها بقية الخطوات كما في بقية الحُفر).

3. غطيت لوحة الحُفر وذلك بغلق غطاء اللوحة ومن ثم حُضنتلمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مْ .

5. بعد كشف الغطاء عن اللوحة، نُبذ السائل الجاف بواسطة الرج وتم إضافة محلول الغسل Washing لكل الحفر ولمدة 30 ثانية في كل مرة وكررت خمس مرات ثم تركت لتجف.

6. تم إضافة 50 مايكروليتر من إنزيم الكشف HRP-conjugate reagent لكل الحُفر عدا البلانك.

7. حضنت العينات لمدة مرة ثانية لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مْ.

8. تم الغسل مرة ثانية لمدة 30 ثانية في كل مرة وكررت خمس مرات ثم تركت لتجف.

9.تم إضافة 50 مايكروليتر من محلوليChromogen solution A وChromogen solution B الىكل حُفرةمع الابتعاد عن الضوء مدة 15دقيقة وفي37 مْ اذ أصبحت الحفر متلونة باللونالأزرق.

10. تم إيقاف التفاعل بأضافة 50 مايكروليتر من محلول التوقف Stop solution لكل حُفرة، إذ أنَّ توقف التفاعل يحصل عند تحول اللون الأزرق الى اللون الأصفر.

11. بعدها تم الفحص بجهاز الأليزا بعد التصفير مقابل البلانك، وقرأت الامتصاصية على طول موجي 450 نانوميتر بعد إضافة محلول التوقف بـ15 دقيقة.

(3-1-7-3): الحسابات **Calculation**

تم أولا رسم المنحنى القياسي وذلك بوضع التراكيز التصاعدية للمحاليل القياسية على المحور الأفقي وقيم الامتصاصية لتلك التراكيز على المحور العمودي، بعدئذ تم وضع قيم الامتصاصية للعينات المدروسة على المحور العمودي ورسم خط أفقي للالتقاء مع المنحنى القياسي ثم رسمعمود نازل من نقطة الالتقاء تلك الى المحور الافقي لتحديد تركيز تلك العينات في نقطة الالتقاء على المحور الأفقي. كررت العملية لقيم امتصاصية جميع العينات لمعرفة جميع تراكيز لتلك العينات.

(3-7-2): تقدير انزيم ALT في المصل وأنسجة الكبد Serum & liver ALT estimation

(3-7-2-1) المبدأ الأساسي Basic principle

تم التحري عن انزيم ALT في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA و حسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق-4) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بانزيم ALT المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بالانزيم وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد تركيز الانزيم في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(3-7-2-2): طريقة العمل Procedure

1.تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 20 ng/ml، 10ng/ml، 5ng/ml، 2.5ng/ml ، 1.25 ng/ml (ملحق-5).

2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-7-3-1): الحسابات Calculation

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(3-7-3): تقدير انزيم ALP في المصل وأنسجة الكبد Serum & liver ALT estimation

(3-7-3-1) المبدأ الأساسي Basic principle

تم التحري عن انزيم ALP في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق-6) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بإنزيم ALP المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بالانزيم وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة

وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد تركيز الانزيم في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(2-3-7-3): طريقة العمل **Procedure**

1. تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 120mU/L، 60mU/L ، 30mU/L ، 15mU/L ، 7.5mU/L (ملحق-7).
2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-3-7-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(3-7-4): تقدير مستوى MDA في المصل وأنسجة الكبد

Serum & liver MDA estimation

(1-4-7-3) المبـدأ الأساسي **Basic principle**

تم التحري عنMDA في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق-8) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بـMDA المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بـMDA بعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد التركيز في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(2-4-7-3): طريقة العمل **Procedure**

1. تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 6nmol/L، 3 nmol/L ، 1.5 nmol/L ، 0.75nmol/L ، 0.375 nmol/L (ملحق-9).
2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-4-7-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(3-7-5): تقدير انزيم SOD في المصل وأنسجة الكبد

Serum & liver SOD estimation

(3-5-7-1) المبدأ الأساسي **Basic principle**

تم التحري عن انزيم SOD في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق-10) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بإنزيم SOD المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بالإنزيم وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد تركيز الانزيم في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(3-5-7-2): طريقة العمل **Procedure**

1. تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 80U/mL، 40U/mL ، 20U/mL ، 10U/mL ، 5U/mL (ملحق-11).
2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-5-7-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(3-7-6): تقدير انزيم CAT في المصل وأنسجة الكبد

Serum & liver CAT estimation

(3-6-7-1) المبدأ الأساسي **Basic principle**

تم التحري عن انزيم CAT في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق-12) و يعتمد مبدأ

الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بإنزيم CAT المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للأضداد بالارتباط بالانزيم وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد تركيز الانزيم في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(3-7-6-2): طريقة العمل **Procedure**

1. تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 48pg/ml، 24pg/ml ، 12pg/ml ، 6pg/ml، 3pg/ml (ملحق-13).
2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-7-6-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(3-7-7): تقدير GSH-px في المصل وأنسجة الكبد

Serum & liver GSH-px estimation

(3-7-7-1) المبدأ الأساسي **Basic principle**

تم التحري عن GSH-px في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق-14) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بـ GSH-px المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بـGSH-px وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد التركيز في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(3-7-7-2): طريقة العمل **Procedure**

1.تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 160pg/ml، 80 pg/ml، 40 pg/ml، 20 pg/ml ، 10 pg/ml(ملحق-15).

2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-7-7-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(3-7-8): تقدير GSH-r في المصل وأنسجة الكبد

Serum & liver GSH-r estimation

(3-7-8-1) المبدأ الأساسي **Basic principle**

تم التحري عن GSH-r في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق-16) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بـ GSH-r المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بـGSH-r وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد التركيز في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(3-7-8-2): طريقة العمل **Procedure**

1.تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 120ng/L، 60ng/L، 30ng/L ، 15ng/L ، 7.5 ng/L (ملحق-17).

2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-7-8-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(3-7-9): تقدير GSH-t في المصل وأنسجة الكبد

Serum & liver GSH-t estimation

(3-7-9-1) المبـدأ الأساسي **Basic principle**

تم التحري عن GSH-t في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق–18) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بـ GSH-t المثبتة في حفر لأطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بـGSH-t وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد التركيز في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(3-7-9-2): طريقة العمل **Procedure**

1. تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 200ng/ml، 100ng/ml ، 50ng/ml، 25ng/ml ، 12.5ng/ml (ملحق–19).
2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3–7–1–2) .

(3-7-9-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3–7–1–3).

(3-7-10): تقدير GSH في المصل وأنسجة الكبد

Serum & liver GSH estimation

(3-7-10-1) المبـدأ الأساسي **Basic principle**

تم التحري عن GSH في هذه الدراسة وقياس معدلاتها في مصل دم وأنسجة الكبد بطريقة ELISA وحسب العدة المجهزة من قبل شركة ABO السويسرية (ملحق–20) و يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل بين الاضداد المناعية الخاصة بـ GSH المثبتة في حفر wells لاطباق او صفائح من مادة البولسترين حيث تضاف العينة او المحاليل القياسية الى الحفر ويحضن بعدها مدة زمنية محددة للسماح للاضداد بالارتباط بـGSH وبعد الحضن تغسل الحفر بمحلول الغسل لإزالة المواد

غير المرتبطة ثم يضاف الانزيم المقترن لكي ترتبط بالمعقدات المناعية المتكونة وتحضن وتغسل مرة اخرى لإزالة الانزيمات غير المرتبطة، ثم تضاف بعدها المادة الاساس (المادة الملونة) اذ يتحول عندها الى اللون الازرق في حالة وجود المعقدات الانزيمية ثم يحضن ويضاف لها محلول ايقاف التفاعل بعدها تقرا بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 450 نانوميتر، ويحدد التركيز في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

(2-10-7-3): طريقة العمل **Procedure**

1. تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز: 640ng/L، 320ng/L ، 160ng/L، 80ng/L ، 40ng/L (ملحق-21).
2. تم اجراء الخطوات اللاحقة كما ورد في (3-7-1-2) .

(3-10-7-3): الحسابات **Calculation**

تم اجراء الحسابات كما ورد في (3-7-1-3).

(11-3) الدراسة الجزيئية

(1-11-3) البادئات **Primers**

تم اختيار ثلاثة مضادات اكسدة وهي SOD و CAT و GSH وبروتين الصدمة الحرارية ذي الوزن الجزيئي 70 كيلو دالتون HSP70 وقد صممت هذه البادئات باستخدام قاعدة بيانات بنك الجينات NCBI وقد استعملت هذه البادئات كما مبين في الجدول (3.3).

جدول (3.3): البادئات المستعملة في الدراسة

Primer	Sequence		PCR Product Size
SOD	F	AGATGACTTGGGCAAAGGTG	79bp
	R	AATCACACCACAAGCCAAGC	
CAT	F	TGCCGTCCGATTCTCCACAG	115 bp
	R	TCCCACGAGGTCCCAGTTAC	
GSH	F	ATTTGACCAGCGTGCCATAG	114bp
	R	AACAGCCTTCGGTTTTGGTC	
HSP70	F	ATCTCCTGGCTGGACTCTAACA	241 bp
	R	CACCCATCTGTCTCCTAGATCA	
GAPDH	F	ATGCCCCCATGTTTGTGATG	136bp
	R	TCCACGATGCCAAAGTTGTC	

(3-11-2) فحص تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي
Quantitative Real-Time Reverse Transcription (qRT-PCR)

تم اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي وذلك لقياس المستويات الكمية للحامض النووي الرايبوزي المراسل mRNA الذي يستنسخ من الكبد للدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجينات مضادات الاكسدة و HSP70 كذلك تم استخدام جين الـ GAPDH gene كجين محافظ قياسي Housekeeping gene لحساب التعبير الجيني. وتم اجراء هذا الفحص حسب الخطوات الآتية:

(3-11-2-1) استخلاص الاحماض النووية الكلي Total RNA extraction

تم استخلاص الحامض النووي الرايبوزي الكلي Total RNA باستخدام عدة الترايزول Trizol kit المجهز من قبل شركة بايونير الكورية (ملحق–22) ولقد تم العمل بهذا العدة حسب تعليمات الشركة المصنعة مع بعض التحويرات :–

1.صعقت الأعضاء مباشرة بعد استئصالها بالنتروجين السائل ثم وضعت في أنابيب ابندورف Eppendorf tube حاوي على 0.5 مل من DEPC water .

2. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقتين .

3. تم سحب الدبك ويبقى فقط النسيج، ثم أضيف 0.5 مل من الترايزول، وسُحق النسيج بالمدقات الصغيرة Micropistils حتى هرس وتجانس جيداً.

4. تم اكمال الأنابيب الحاوية على الأنسجة المسحوقة إلى 1 مل من الترايزول، وثم تم أضافة 200 مايكروليتر من الكلوروفورم.

5. رجت الأنابيب بجهاز vortex، ثم حفظت في الثلاجة freezing لمدة 5 دقائق.

6. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة .

7. نقل الرائق في أبندورف جديد، واضيف اليه 500مايكروليتر من الآيزوبروبانول isopropanol.

8. رُجت الأنابيب بجهاز vortex ثم حفظت في تجميد الثلاجة لمدة 10 دقائق .

9. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة وبسرعة 15000 دورة/دقيقة.

10. تم التخلص من الطافي ليبقى فقط المترسب pellet، ثم اضيف 1مل من الايثانول ethanol alcohol إلى المترسب بتركيز 80% ورج بشكل مستمر بجهاز vortex ثم وضع الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعه 12000 دوره/دقيقه مدة5 دقائق وتم التخلص من الطافي وأُخذ المترسب .

11. جُفف المترسب جيدا بقلب الأنابيب على ورق نشاف وتركه بدرجه حرارة الغرفة لمدة 10دقائق.

12 .أضافة 50 مايكروليتر من الدبك، ووضع في حمام مائي بدرجة 70 مْ لمدة 10 دقائق .

(3-11-2-2) قياس نقاوة الحامض النووي الرايبوزي Assessy RNA yield and quality

تم الكشف عن الحامض النووي RNA المستخلص من العينات من خلال ثلاثة جوانب الأول لتحديد التركيز (نانوغرام/ ميكرولتر) باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer و الثاني لقياس النقاوة من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة 260 و 280 نانومتر أما الجانب الثالث فهو لتوثيق وجود RNA باستخدام الترحيل الكهربائي وتم القياس على النحو الآتي :

1.بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع RNA .

2. تُصفر ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر منddH2O باستخدام ماصة صغيرة micropipette معقمة على سطح ركيزة المقياس وأجراء التصفير وبعدها تُنظف الركيزة لقياس العينات.

2.الضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـRNA وذلك باستخدام 1مايكرولتر من كل عينة من الـ RNA المستخلص ومن ثم تُنظف ركيزة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

4. كذلك تم تحديد نقاوة عينات الـRNA المستخلص بقراءة الامتصاصية في جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين 260 و280 نانومتر حيث ان الحمض النووي RNA المستخلص هو يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية تقريباً (2.0~).

5. بعدها أستخدمت طريقة الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel electrophorsis لترحيل الحامض النووي RNA لتحديد سلامة Integrity الـ RNA من التحلل بفعل الإنزيمات المحللة. وتم اجراء هذه الطريقة كالآتي:

أ. تم إذابة 1 غم من هلام الكاروز بـ 10 مل من محلول (0.5X)TBE buffer وغليه باستخدام الهزاز المغناطيسي الحراري hot magnetic stirrer لمدة 15 دقيقه لحين ظهور البلورات في محلول الاكاروز.

ب.بعد تبريده أُضيف 3 مايكروليتر من بروماید الأثيديوم للمحلول ووضع الهلام في قالب صب الهلام tray مع تثبيت مشط تكوين الحُفر comb قرب احد النهايتين على بُعد 1 سم من طرف القالب وتُرك ليتصلب لمدة 30 دقيقة .

ج. بعدها نقل إلى جهاز الترحيل الكهربائي الحاوي على محلول دارئ (0.5X)TBE .

د. حُضرت عينات الـRNA لاجراء عملية الترحيل Loading وذلك بمزج 25 مايكرولتر من عينه الحمض النووي مع 5 مايكرولتر من صبغة الترحيل Loading dye ونقلت العينات الى حفر الهلام.

هـ. تم ترحيل العينات بإمرار فرق جهد قدره 100 فولت لمدة ساعة.

و. تم فحص مواقع حزم bands الحامض النووي RNA المستخلص بواسطة جهاز UV عند طول موجي 260 نانومتر ثم صور الهلام لغرض توثيق النتائج .

(3-2-11-3) المعاملة بأنزيم (DNase1) DNase inactivation Treatment

تم معاملة المستخلص من الحامض النووي RNA باستخدام DNase I treatment وذلك لتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الاستخلاص بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم (ملحق-23) طبقاً للطريقة التي وصفتها تعليمات شركة Promega الأمريكية USA. بعدها تم حضن المزيج بدرجة حرارة 37مْ لمدة 30 دقيقة، وبعدها تم أضافة 1 مايكروليتر من مادة EDTA ووضعت بالحمام المائي بدرجة حرارة 65 مْ لمدة 10 دقائق لتثبيط فعل الانزيم.

(3-2-11-4) تصنيع الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين المكمل cDNA Complementary synthesis cDNA

تم استخدام طريقة تصنيع الحامض النووي المكمل complementary للـDNA من عينات الحامض النووي RNA وذلك لاستخدامه في تضخيم جينات التعبير الجيني للجينات المستهدفة والجين المحافظ بفحص Real-Time PCR، اذ تم اجراء هذا العملية طبقا لعدة Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزَة من شركة بايونير الكورية(ملحق-22) وكما يلي:

1. تم توحيد تراكيز جميع عينات RNA المعاملة بـ DNase لنفس التركيز المقاس بـ nanodrop بواسطة DEPC.
2. تم تحويل RNA الى cDNA بواسطة تحضير تفاعل PreMix reaction للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي (ملحق-24).
3. بعد ذلك تم أضافة 20 مايكروليتر من مكونات مزيج RT master mix إلى أنابيب عدة cDNA synthesis (Accupower Rockscript RT Premix kit) (ملحق-22)والحاوية على إنزيم الأستنساخ العكسي Reverse transcription .
4. وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 3 دقائق.

5. بعد ذلك تم نقل الأنابيب الى جهاز الدوار الحراري Thermocycler وتم تطبيق الظروف الحرارية لعملية تصنيع الـ cDNA حسب طريقة عمل العدة (ملحق–25)

6.بعد ذلك نقلت العينات الحفظ بدرجة– 20 م° لحين استخدامها في فحص Real-time PCR.

(3-2-11-5) فحص (qRT- PCR) Quantitative Real-Time PCR

تم إجراء فحص الـ qPCR لعينات الـ cDNA باستخدام عدة Accupower Green Star Real-Time PCR kit (ملحق–22) و جهاز Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block المجهزيّن من شركة بايونير الكورية حسب طريقة Cheon وآخرون (1999)، و يعتمد هذا الفحص على صبغة سايبر الخضراء Syber Green في عّدة الكشف qRT-PCR PreMix والذي صمم لتضخيم الـ PCR للـ cDNA الجينات المستهدفة باستخدام البادئات و جين GapdH كجين محافظ (قياسي) Housekeeping gene لتقدير كمية عدد النسخ الناتجة من الـPCR مقارنة بعدد النسخ للمنحني القياسي للجينوم الناتج من qPCR ترتبط الصبغة الموجودة في العدة مع النسخ الجديدة للقطع المتضخمة للجينات المستهدفة target والجين المحافظ بعدها تُسجل الأشارات الومضية fluorescent signals في جهاز الدوار الحراري الـ Real Time PCR Thermocycler. تم رسم ينشأ المنحني القياسي الجينومي من جينGapdH للجرذ *Rattus norvegicus* (27.9Mbp) والذي تم الحصول عليه من بنك الجينات NCBI-Gene Bank بما يقارب (1×10^7~) نسخة أُستخدمت كمنحني قياسي لـ Genomic DNA .

(3-2-11-6) تصميم تجربة الـ qRT- PCR

لتقدير كمية التعبير الجيني للعينات المدروسة عند التضاعف أستخدم جين GapdH كجين محافظ وسيطرة إذ أُستخدم لتصحيح مستوى التعبير الجيني، وحضر مزيج تفاعل qRT-PCR master mixes للمنحني القياسي لـgenomic DNA والجينات المستهدفة والجين المحافظ (ملحق26 و27)، و تم أضافة مزيج تفاعل qPCR PreMix الى أنابيب Accupower Green Star Real-Time PCR kit بعدها تم تغطية فوهة الأنابيب بفيلم لاصق adhesive film ثم مزجت بواسطة vigorous vortexing لإعادة عالق الراسب PreMix pellet ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين . ثم وضعت انابيب مزيج تفاعل الـ qPCR لكل من المنحنى القياسي والجينات المستهدفة والجين المحافظ في صفيحة وبعدها نُقلت الصفيحة الى جهاز Exicycler 96 Real-Time PCR وتم تطبيق الظروف الحرارية لكل الجينات حسب البرنامج (ملحق– 28).

(3-11-2-7) طريقة تحليل البيانات data anlysis of Real-Time PCR

تم تحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة $2^{-\Delta\Delta Ct}$ التي وضعت من قبلLivak وschmittgen (2001)، تعتمد هذه الطريقة على استخراج الكمية النسبية Relative Quantity حيث أن الكميات النسبية يجب أن تصحح بطريقة بحيث تصبح ذات معنى بايولوجي . يمثل الجين المحافظ *GapdH* جين تصحيح ممكن أن يستخدم لحساب التعبير الجيني النسبي أو التغيير ألتضاعفي fold change في الجينات المستهدفة لذلك تم تصحيح قيم عدد دورات العتبة (Ct) threshold cycle number للجين المستهدف مع قيم Ct للجين المحافظ بواسطة مستويات التعبير الجيني الكمي النسبي (التغير التضاعفي)، وفي هذه الطريقة تُعد أحد العينات التجريبية مقياساًcalibrator مثل عينات السيطرة Control samples وكل القيم المصححة للجين المستهدف Ct values تُقسم على قيم الجين المستهدف المصححة مع العينة القياسية لأستخراج مستويات التعبير النسبي relative expression levels، بعدها أستخدمت طريقة دلتا دورات العتبة ΔCT Method مع لجين التصحيح Reference Gene كالآتي:-

1. تصحيح قيمة Ct للجين المحافظ reference gen(ref) من كل من الجين المستهدف لعينة القياس والجين المستهدف لعينة الأختبار كما في المعادلتين الآتيتين:

$$\Delta Ct\ (test) = Ct\ (target, test) - Ct\ (ref, test)$$
$$\Delta Ct\ (calibrator) = Ct\ (target, calibrator) - Ct\ (ref, test)$$

2. تصحيح قيمة ΔCt للجين المستهدف لعينة الأختبار من قيمة ΔCt للجين المستهدف لعينة القياس كما في المعادلة الآتية:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (test) - \Delta Ct\ (calibrator)$$

3. يحسب التغيير التضاعفي للتعبير الجيني النسبي حسب المعادلة الآتية:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

(3-12) التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي بهدف معرفة الفروق المعنوية بين معدلات المعايير المدروسة وأجريت المقارنات باستخدام تحليل التباين في اتجاه واحد (ANOVA1). وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى احتمال(5%). واستخرجت جميع التحليلات الإحصائية باستخدام برنامج Genstat discovery edition (VSN international) كما تم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى احتمالية 0.05.

(4): **النتـــائج** Results

(1.4): **تركيز إنزيم** AST **في المصل وأنسجة الكبد**

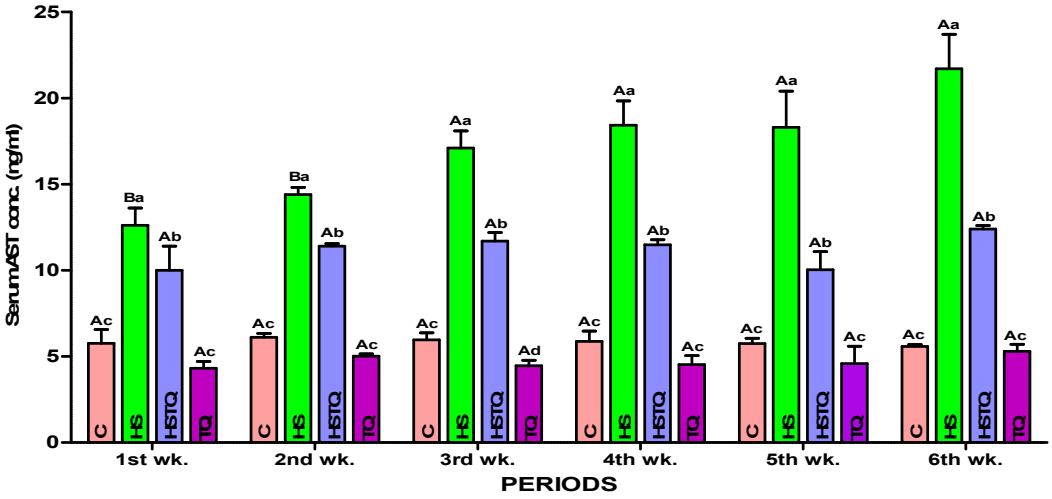
Serum &Liver AST concentration

اظهر معدل تركيز انزيم AST في مصل الدم ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في الحيوانات التي عرضت للحرارة HS في التجربة، وهذا ما نلاحظه من النتائج المبينة في الشكل (4-1أ)، مقارنة بمعدل مجاميع السيطرة وباقي المجاميع طوال اسابيع التجربة بمعدل تدريجي كان اشده في الاسبوع الأخير.

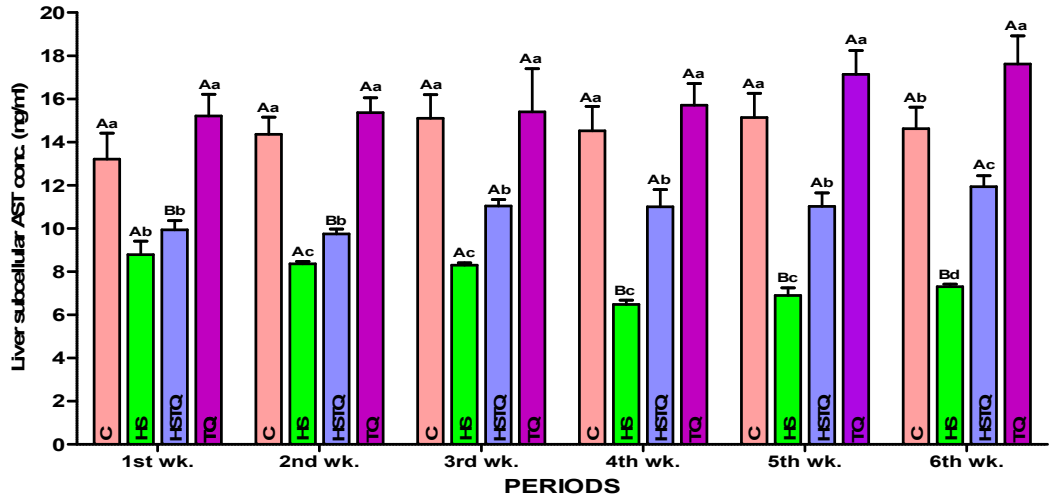
من جانب اخر تبين ان المعاملة بالثايموكوينون TQ قد ادت الى تحسن ملموس في معدل تركيز الإنزيم عندما اعطى بالتزامن مع الاجهاد الحراري، اذ انخفض معنوياً بالمقارنة بالحيوانات المجهدة حرارياً، إلا انه في الوقت ذاته بقى اعلى معنويا ($P<0.05$) بالمقارنة بمجاميع السيطرة والمجاميع المعاملة بـTQ فقط، وهذه المجاميع الاخيرة لم يشهد معدل تركيز انزيم AST في مصل الدم لحيواناتها فروق معنوية ($P>0.05$) مع معدلات السيطرة ما عدا في الاسبوع الرابع اذ كانت اقل معنويا بالمقارنة مع سيطرة الاسبوع المذكور (الشكل 4-1أ).

اما في انسجة الكبد، فقد اثر التعرض للحرارة العالية على معدل تركيز انزيم AST، اذ حصل انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل تركيز الانزيم في مجاميع HS بالمقارنة بمجاميع السيطرة فضلا عن باقي المجاميع طوال اسابيع التجربة الستة (شكل 4-1ب).

ويتضح من الشكل نفسه ان المجاميع المعاملة بـTQ فقط كان معدلات تركيز الانزيم فيها مرتفعا بشكل واضح فكانت اعلى معنوياً ($P<0.05$) بالمقارنة بمجاميع الاجهاد الحراري من جهة والمجاميع التي اعطيت الثايموكوينون بالتزامن مع الاجهاد الحراري من جهة أخرى ورغم ميلها للارتفاع إلا ان التحليل الإحصائي لم يثبت وجود فروق معنوية ($P>0.05$) بين بينها وبين معدلات مجاميع السيطرة ما عدا في الاسبوع الاخير من التجربة اذ تفوقت معنويا ($P<0.05$)عن مجموعة السيطرة للأسبوع المذكور(شكل 4-1ب).



الشكل (4-1 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** AST **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-1 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** AST **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

(2.4): تركيز إنزيم ALT في المصل وأنسجة الكبد

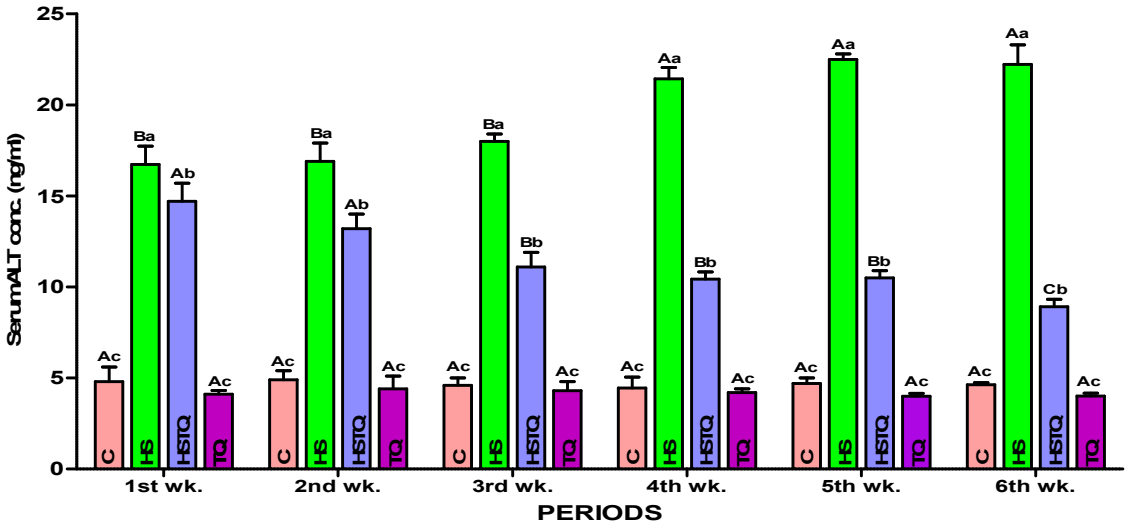
Serum & Liver ALT concentration

يوضح الشكل (4-2أ) معدل تركيز انزيم ALT في مصل دم مجاميع التجربة وقد اظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) في معدل تركيز الانزيم في الحيوانات المجهدة حرارياً HS طوال اسابيع التجربة مقارنة بمجاميع السيطرة وفي الوقت ذاته يتضح من الشكل نفسه ان معدلات تركيز الانزيم في HS كانت اعلى خلال الاسابيع الثلاثة الاخيرة (4^{th}, 5^{th},6^{th})من التجربة بالمقارنة مع الاسابيع الثلاثة (1^{st}, 2^{nd} ,3^{rd})الاولى منها.

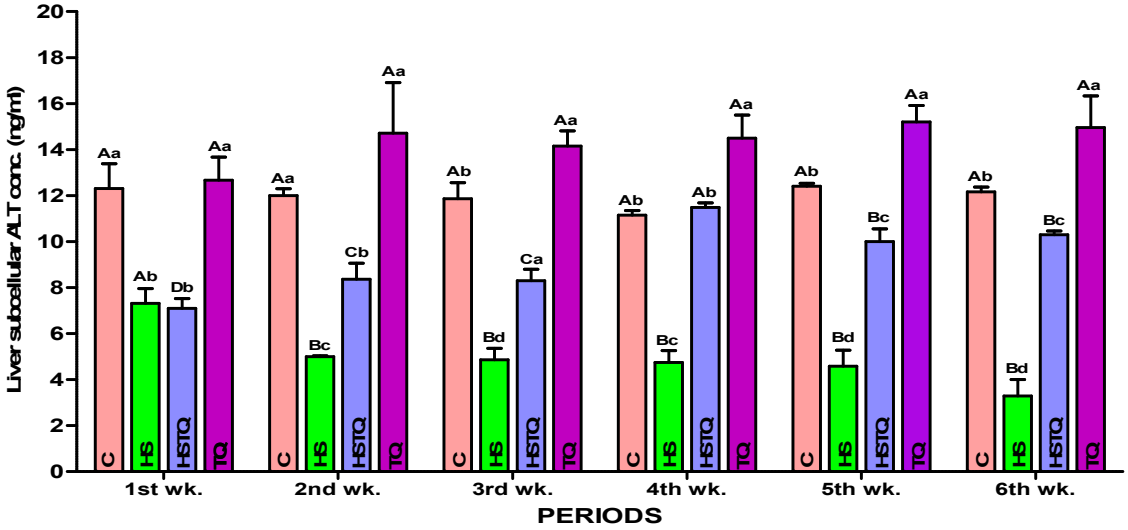
من جانب اخر، تبين ان المعاملة بالثايموكوينون بالتزامن مع الاجهاد الحراري HSTQ ادى الى انخفاض معنوي ($P<0.05$) تدريجي في تركيز الانزيم في مصل الدم مقارنة مع المجموعة المعرضة للحرارة وحدها، إلا ان معدلاته بقيت اعلى معنويا ($P<0.05$) بالمقارنة مع مجاميع السيطرة و المعاملة بالثايموكوينون فقط TQ وهذه الاخيرة كان معدل تركيز انزيم ALT في مصل حيواناتها لايختلف احصائيا ($P>0.05$) عن معدلاته في مجاميع السيطرة طوال مدة التجربة (الشكل4-2أ).

اما في انسجة الكبد، فقد شهد معدل تركيز انزيم ALT في الحيوانات المجهدة حرارياً انخفاض معنوي ($P<0.05$) تدريجي بالمقارنة بمجاميع السيطرة والمجاميع الاخرى(HSTQ, TQ) (الشكل 4-2ب).

وقد تبين من التحليل الإحصائي ان اعطاء الثايموكوينون للحيوانات مع تعريضها للحرارة العالية HSTQ قد تسبب في رفع تركيز انزيم ALT افي انسجة كبدها ابتداءاً من الاسبوع الثاني 2^{nd} وحتى الاسبوع السادس 6^{th} من التجربة بالمقارنة مع معدل تركيزه في انسجة كبد المجاميع المجهدة حرارياً HS، وبالرغم من هذا التحسن الملحوظ إلا انه بقيت اقل معنوياً ($P<0.05$) من مجاميع السيطرة لمعظم الاسابيع ماعدا في الاسبوع الرابع4^{th} فلم يوجد فرق بينها احصائيا($P>0.05$) (الشكل 4-2ب).



الشكل (4-2 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** ALT **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-2 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** ALT **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

(3.4): تركيز إنزيم ALP في المصل وأنسجة الكبد

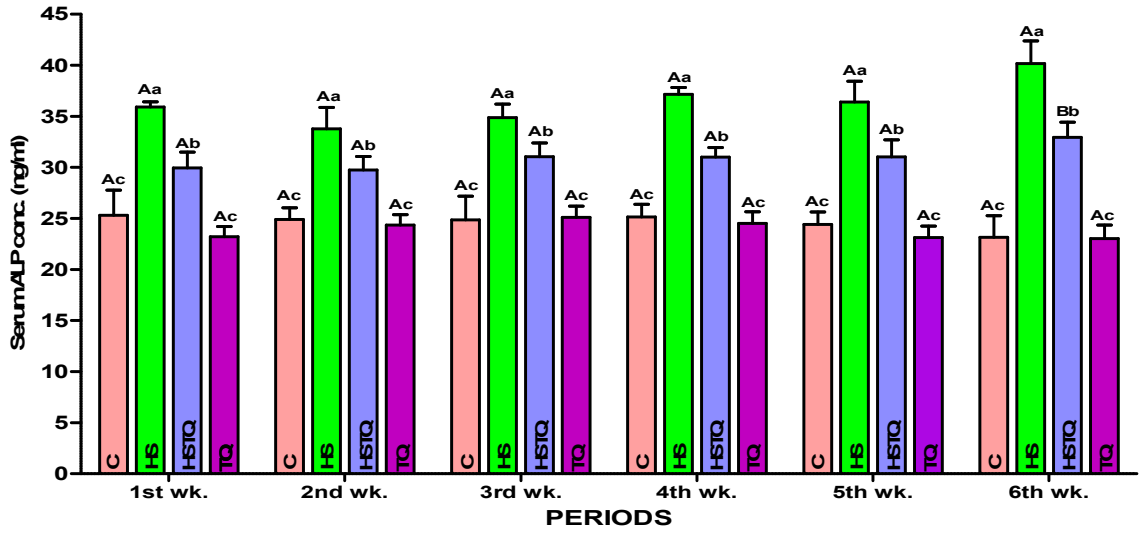
Serum & Liver ALP concentration

بين التحليل الإحصائي لنتائج تركيز انزيم ALP المبينة في الشكل (4-3أ) ان التعرض للحرارة العالية HS قد اثر في تركيز الانزيم في مصل الدم، اذ حصل ارتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) في معدل تركيزه مقارنة بمجاميع السيطرة خلال الاسابيع الستة من التجربة خصوصا الاسبوع الاخير 6^{th}, الذي شهد ارتفاعا معنويا واضحا ($P<0.05$) بالمقارنة مع المجاميع الاخرى فضلا عن السيطرة.

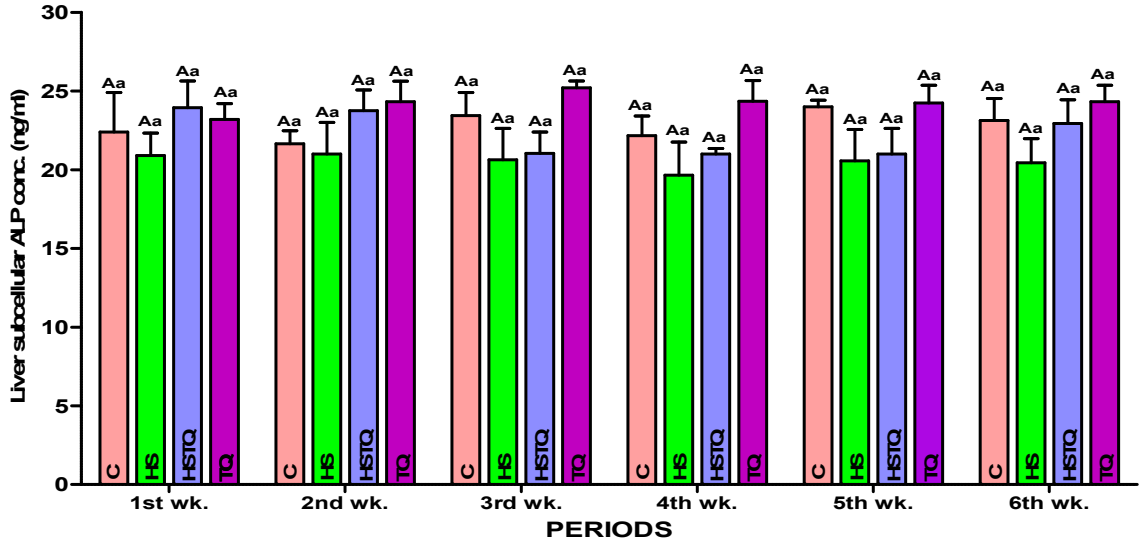
كما اوضحت النتائج المبينة في الشكل نفسه، عدم وجود فروق معنوية ($P>0.05$) بين معدل تركيز انزيم ALP في مصل دم المجموعة المعاملة بالثايموكوينون لوحده TQمقارنة مع معدل تركيزه في مجاميع السيطرة لكل الاسابيع (شكل4-3أ).

من جانب اخر، نجد ان المجموعة التي تناولت حيواناتها الثايموكوينون مع التعرض للحرارة العالية HSTQ قد شهد معدل تركيز انزيم ALP انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) عند مقارنته مع مجموعة ذكور الجرذان المعاملة بالحرارة العالية وحدها إلا انه بقيت اعلى معنويا ($P<0.05$) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (الشكل 4-3أ).

اما في انسجة الكبد، تشير النتائج في الشكل (4-3ب) الى تقارب معدلات تركيز انزيم ALP في انسجة كبد ذكور جرذان السيطرة مع المجاميع الثلاث الاخرى (HS,HSTQ,TQ) خلال كل مدة التجربة، بالرغم من ميل المجموعتان اللتان ضمتا الحيوانات التي اعطيت الثايموكوينون مع التعرض للإجهاد الحراري HSTQ وكذلك التي اعطيت الثايموكوينون فقط TQ خلال الاسبوعين الاول والثاني نحو الارتفاع قليلا، كذلك ميل معدلات تركيز انزيم ALP في انسجة كبد ذكور الجرذان المعاملة بالثايموكوينون خلال الاسابيع الاربعة الاخيرة من التجربة (3^{rd},4^{th}, 5^{th},6^{th}) نحو الارتفاع قليلا ايضاً، إلا ان التحليل الاحصائي لم يثبت وجود فروقمعنوية ($P>0.05$) بين معدلات هذه المجاميع ومعدلات السيطرة لكل اسبوع وكما موضح في الشكل(4-3ب).



الشكل (4-3 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** ALP **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-3 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** ALP **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

(4.4): تركيز MDA في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver MDA Concentration

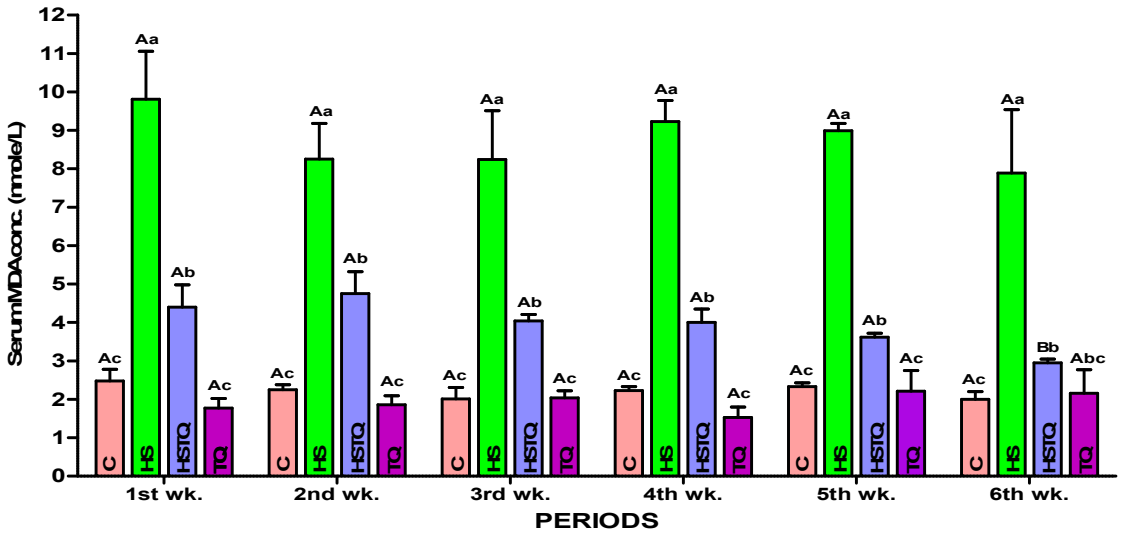
اظهر معدل تركيز MDA في مصل الدم ارتفاعاً معنوياً($P<0.05$) لدى مجموعة الحيوانات التي عرضت للحرارة العالية طوال اسابيع التجربة وهذا ما نلاحظه من النتائج المبينة في الشكل (4-أ)، بالمقارنة مع معدلات مجاميع السيطرة من جهة وباقي المجاميع المعاملة(TQ,HSTQ) من جهة اخرى .

وبالمقابل، نجد ارتفاعاً معنوياً($P<0.05$) معدل تركيز MDA في مصل الحيوانات التي عرضت للحرارة والثايموكوينون معا HSTQ مقارنة بمعدلات مجاميع السيطرة من جهة وبالمقارنة مع المجاميع التي تناولت الثايموكوينون فقط (الشكل4-أ).

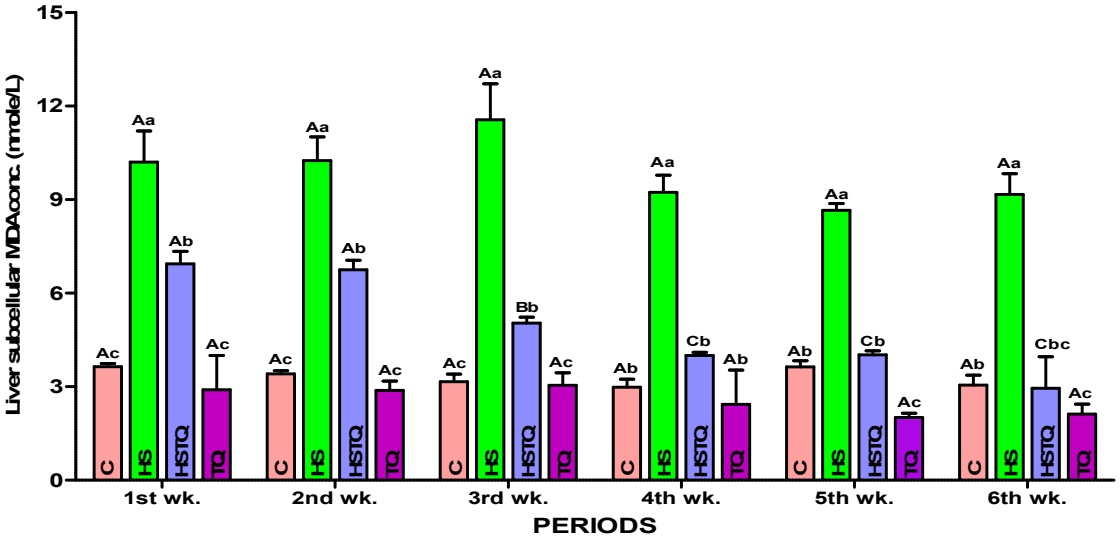
شهد معدل تركيز MDA في مصل الحيوانات التي تناولت الثايموكوينون بالتزامن مع التعرض للحرارة تحسنا ملموسا، اذ انخفض معنوياً ($P<0.05$) بالمقارنة مع نظيرتها مجاميع الحيوانات المجهدة حراريا فقط HS، كما انخفض معدل تركيزه فيها فأصبح متقاربا ($P>0.05$) مع المجموعة المعاملة بالثايموكوينون فقط في الاسبوع السادس من التجربة. هذا ولم يثبت التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي ($P>0.05$) في معدل تركيز MDA بين مجاميع الثايموكوينون ومجاميع السيطرة (الشكل4-أ).

اما في انسجة الكبد، وكما مبين في الشكل (4-ب)، فنجد الامر مقارباً لما شهده معدل تركيز MDA سواء بتأثير التعرض للإجهاد الحراري او المعاملة بالثايموكوينون، إلا ان هنالك اختلافات تتضمن التحسن الملموس جراء المعاملة بالثايموكوينون، فنلاحظ وابتداءاً من الاسبوع الرابع وحتى نهاية التجربة ان معدل تركيز MDA في انسجة كبد ذكور الجرذان المجهدة حراريا والمعاملة بالثايموكوينون، قد انخفض بحيث وصل الى معدلات قريبة من السيطرة والمجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط ($P>0.05$).

من جانب اخر، فان مجموعة ذكور الجرذان التي تناولت الثايموكوينون فقط، قد شهدت انخفاضا معنويا ($P<0.05$) بالمقارنة مع السيطرة في الاسبوعين الاخيرين (5^{th},6^{th}) من التجربة (الشكل4-ب).



الشكل (4-4 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز** MDA **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-4 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز** MDA **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

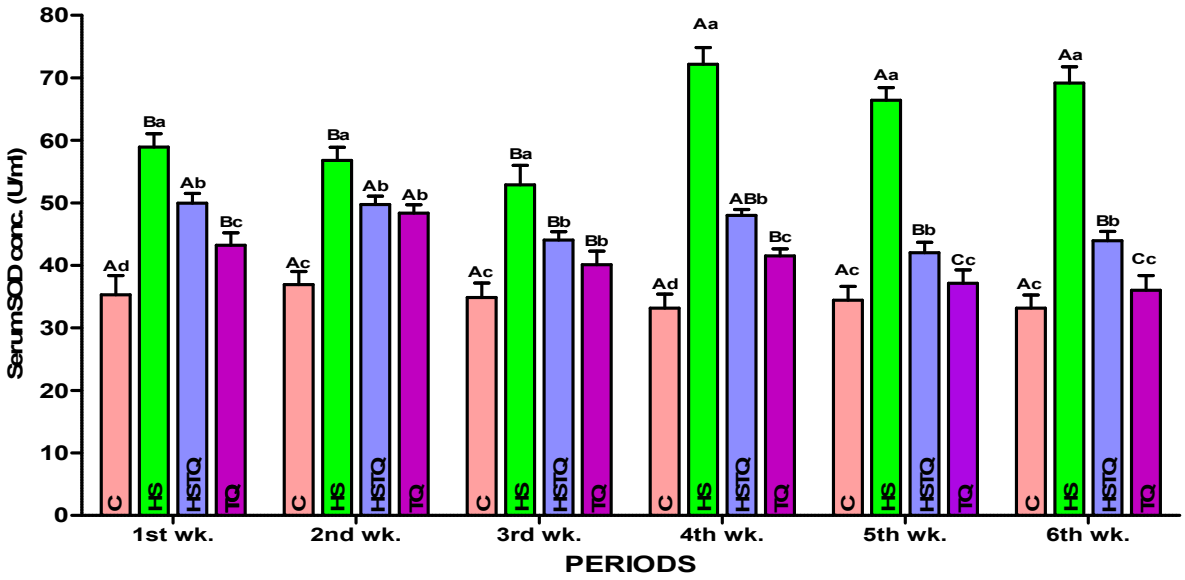
(4-5): تركيز إنزيم SOD في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver SOD Concentration

يوضح الشكل (4-5أ) معدل تركيز انزيم SOD في مصل الدم لمجاميع التجربة، وقد أظهرت النتائج المسجلة في الشكل المذكور حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل تركيز الانزيم للمجموعة التي عرضت حيواناتها للحرارة وحدها HS عند إجراء المقارنة الإحصائية مع معدل مجاميع السيطرة طوال اسابيع التجربة، في الوقت ذاته يشير الشكل نفسه الى انه خلال الاسابيع الثلاثة الاخيرة من التجربة كانت معدلات تركيز الانزيم اعلى ($P<0.05$) مما كانت عليه في الاسابيع الاولى من التجربة.

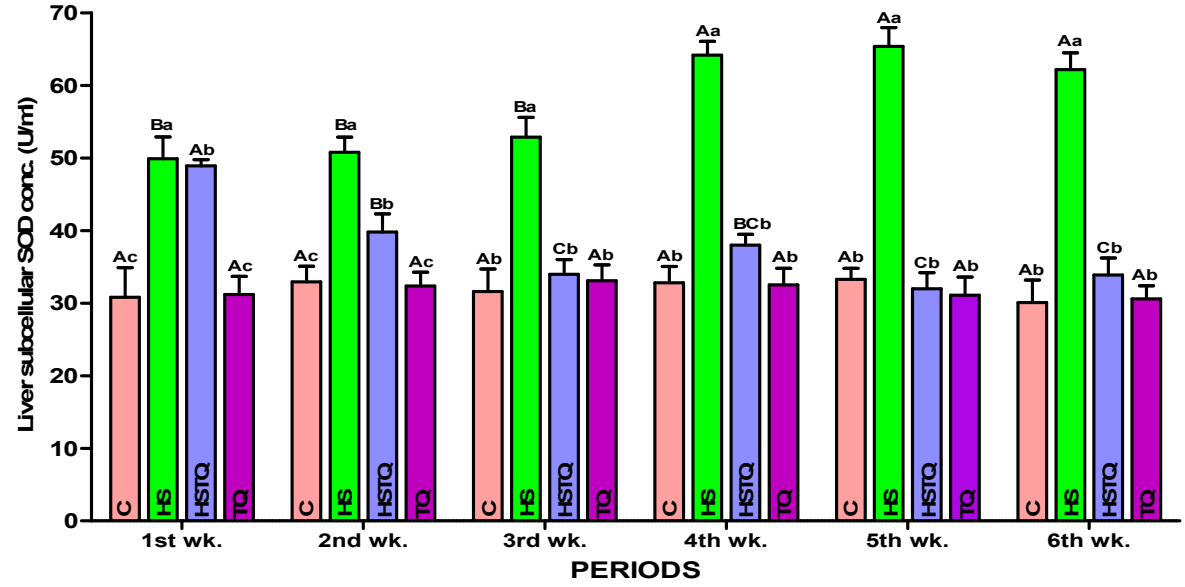
من جانب اخر، لوحظ ان المعاملة بالثايموكوينون لوحده او بالتزامن مع الاجهاد الحراري قد تسبب في ارتفاع تركيز انزيم SOD ($P<0.05$) في مصل ذكور الجرذان مقارنة بمعدلات تركيزه في مجاميع السيطرة منذ بداية التجربة وحتى الاسبوع الرابع منها، ليعود وينخفض بمعدلات قريبة من السيطرة خلال الاسبوع الخامس والسادس بالمقارنة مع مجاميع سيطرة هذين الاسبوعين بالنسبة للحيوانات المعاملة بالثايموكوينون فقط، في حين بقيت معدلات تركيز انزيم SOD في HSTQ اعلى من السيطرة والحيوانات المعاملة بالثايموكوينون فقط ، اما بالمقارنة مع المجموعة المجهدة حراريا فقط، فكانت معدلات المجموعة المعاملة بالثايموكوينون مع الاجهاد الحراري HSTQ اقل منها وكما موضح في الشكل (4-5أ) وهذا ما اثبته التحليل الاحصائي ($P<0.05$).

اما في انسجة الكبد، وكما مبين في الشكل (4-5ب)، فقد اظهر معدل تركيز انزيمSOD ارتفاعا معنوياً($P<0.05$) في ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري طوال الاسابيع الستة التي استغرقتها التجربة بالمقارنة بمعدلات تركيزه في مجاميع السيطرة، وفي الوقت ذاته كان هذا الارتفاع اكثر وضوحا ومعنويا من الناحية الاحصائية ($P<0.05$)خلال الاسبوع الرابع والخامس والسادس عل التوالي مقارنة بأول ثلاث اسابيع من التجربة.

من جانب اخر، تسبب اعطاء الثايموكوينون للحيوانات المجهدة حراريا في حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في تركيز انزيم SOD في انسجة الكبد اذا ما قورنت بالسيطرة خلال الاسبوع الأول والثاني وكما مبين في الشكل (4-5ب)، ثم ابتداءات في الانخفاض تدريجيا بعد الاسبوع الثاني ليصل قريبا ($P>0.05$) من مجاميع السيطرة خلال الأسابيع الاربعة الاخيرة، كما كانت معدلات تركيز الانزيم في انسجة كبد ذكور الجرذان المعاملة بالثايموكوينون مقاربة مع معدلات مجاميع السيطرة طوال مدة التجربة فلم تلمس فروق احصائية تذكر بينهم ($P>0.05$).



الشكل (4-5 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** SOD **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-5 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** SOD **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

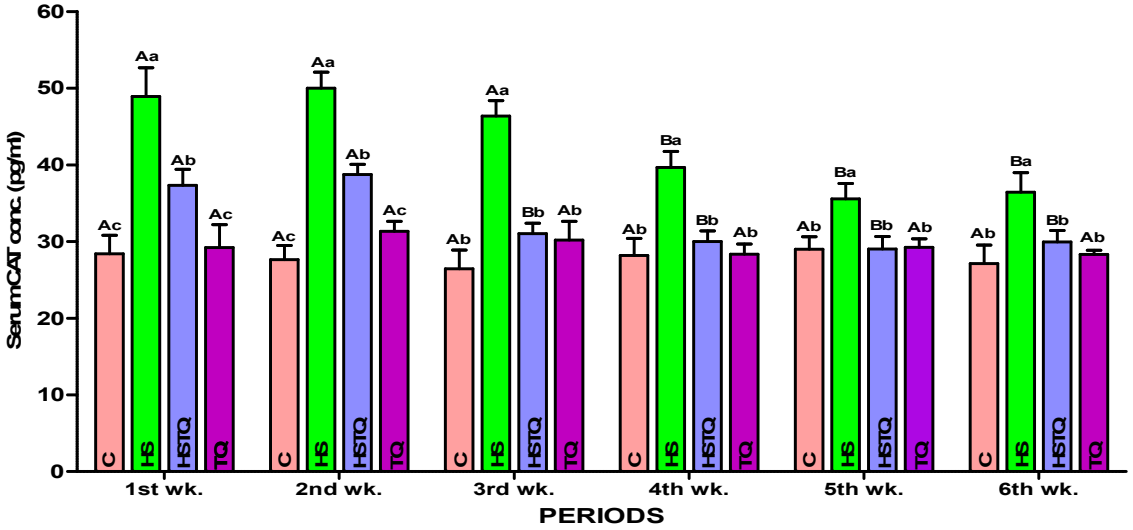
- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

(4-6): تركيز إنزيم CAT في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver CAT Concentration

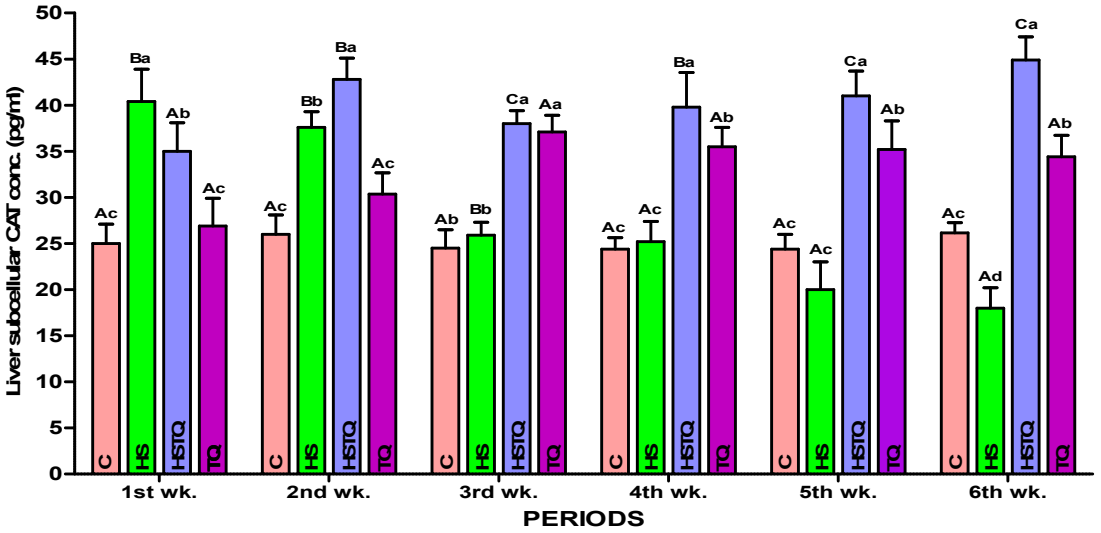
يبين التحليل الاحصائي لنتائج معدل تركيز انزيم CAT المبينة في الشكل (4-6أ) ان التعرض للحرارة HS قد تسبب في حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل تركيز الانزيم في مصل الدم مقارنة مع مجاميع السيطرة وباقي المجاميع طوال اسابيع التجربة، وكان هذا الارتفاع اكثر وضوحا ومعنويا ($P<0.05$)خلال الاسبوع الاول والثاني والثالث مقارنة بالأسابيع الثلاثة الاخيرة من التجربة. من جانب أخر، اوضحت النتائج المدرجة في الشكل نفسه ان الحيوانات التي تناولت الثايموكوينون مع التعرض للحرارة HSTQ قد ارتفع معدل تركيز انزيم CAT في مصولها معنوياً ($P<0.05$) في اول اسبوعين من التجربة (1^{st}, 2^{nd}) مقارنة بالسيطرة، ليعود وينخفض في الاسابيع الاربعة الاخيرة (3^{rd},4^{th}, 5^{th},6^{th}) الى معدلات قريبة من السيطرة ($P>0.05$)، كذلك لم يثبت التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية ($P>0.05$) بينها وبين المجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط، وهذه الاخيرة كانت معدلات تركيز انزيم CAT فيها مستقرة تقريبا طوال مدة التجربة ولم تشهد تغيرا يذكر($P>0.05$) مقارنة مع مجاميع السيطرة (4-6أ).

اما في انسجة الكبد، وكما مبين في الشكل (4-6ب)، فقد اظهر انزيم CAT ارتفاعا لمعدل تركيزه في مجموعة الحيوانات التي عرضت للحرارة وصل الى المعنوية ($P<0.05$) في الاسبوع الاول والثاني من التجربة مقارنة مع معدلات السيطرة، ثم تنخفض خلال الاسابيع الثالث والرابع و الخامس ليكون مقاربا لسيطراتها اذ لم تسجل فروق معنوية ($P>0.05$)عند المقارنة احصائيا، في حين سجل فرق معنوي بينهم في الاسبوع السادس، اذ كان تركيز الانزيم فيها منخفض معنوياً ($P<0.05$) مقارنة مع السيطرة وباقي المجاميع لهذا الاسبوع و الاسابيع الاخرى. بالمقابل، عند اجراء المقارنة الاحصائية بين مجاميع السيطرة والمجاميع المعاملة بالحرارة والثايموكوينون معا HSTQ وجد ارتفاعا معنويا ($P<0.05$) في معدل تركيز انزيم CAT للمجموعة انفة الذكر مقارنة مع سابقتها، كذلك لوحظ بان مجموعة HSTQ كانت معدلاتها اعلى معنويا ($P<0.05$) من معدلات المجموعة المعاملة بالحرارة فقط خلال الاسابيع الاربعة الاخيرة من التجربة.

من جانب أخر، لوحظ تقاربا في معدل تركيز انزيم CAT في انسجة كبد ذكور الجرذان المعاملة بالثايموكوينونTQ مع معدل تركيزه في السيطرة خلال اول اسبوعين من التجربة، اذ لم تسجل فروق معنوية بينهما ($P>0.05$) في حين في الاسابيع الباقية فنلاحظ تأثر تركيز الانزيم جراء المعاملة بالثايموكوينون اذ ارتفع معنويا ($P<0.05$) عما كان عليه مقارنة مع مجاميع السيطرة و المجاميع المجهدة حراريا فقط (شكل 4-6ب).



الشكل (4-6 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** CAT **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-6 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز انزيم** CAT **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

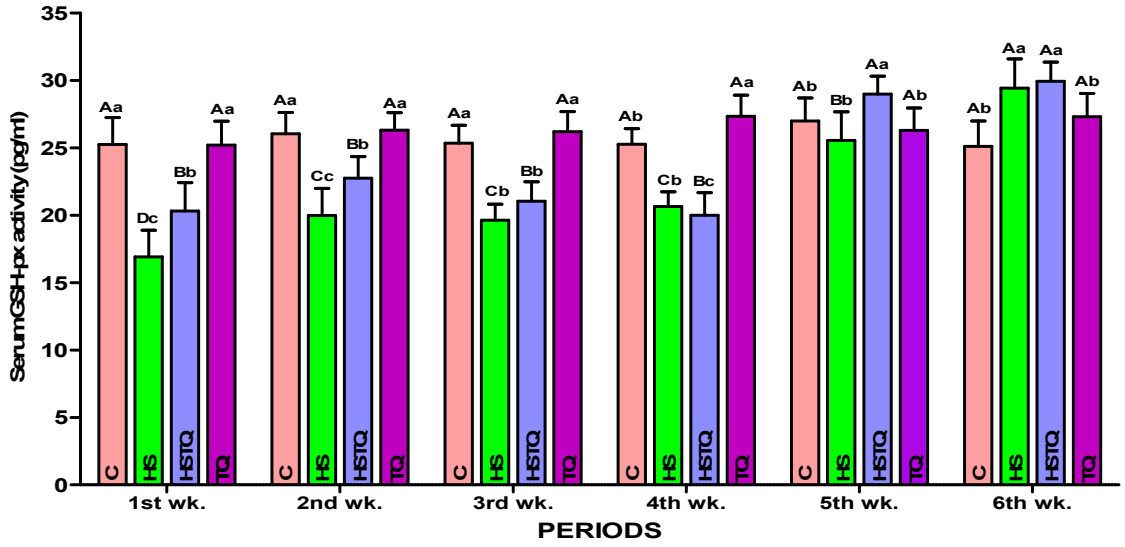
(4-7) فعالية GSH-px في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver GSH-px Activity

يوضح الشكل (4-7أ) معدل فعالية انزيم GSH-px في مصل الدم لمجاميع التجربة، وقد أظهرت النتائج المسجلة في الشكل المذكور حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل فعالية الانزيم للمجموعة التي عرضت حيواناتها للحرارة HS عند إجراء المقارنة الإحصائية مع معدل مجاميع السيطرة والمجاميع الاخرى خلال اول اسبوعين من التجربة، في الوقت ذاته يشير الشكل نفسه الى انه خلال الاسبوع الثالث والرابع من التجربة ارتفعت معدلات فعالية الانزيم لتصبح مقاربة لمعدلات المجموعة التي تناولت الثايموكوينون مع التعرض للحرارة ($P>0.05$) وفي الاسبوع الخامس ارتفع معدل فعالية انزيم GSH-px بحيث اصبح مقاربا للسيطرة والمجموعة المعاملة بالثايموكوينون فقط إلا انه بقي اقل معنويا ($P<0.05$) من مجموعة HS و في الاسبوع السادس ارتفع معنويا بحيث اصبح مقاربا لهذه المجموعة واعلى من مجموعتي السيطرة و TQ. ونجد الامر نفسه فيما يتعلق بالمجاميع التي تناولت الثايموكوينون مع التعرض للإجهاد الحراري HSTQ الا ان معدل فعالية انزيم GSH-px في هذه المجموعة كان اعلى معنويا ($P<0.05$) من مجموعة HS في الاسبوع الاول والثاني والخامس ومقارب له في الاسبوع الثالث والرابع والسادس من التجربة.

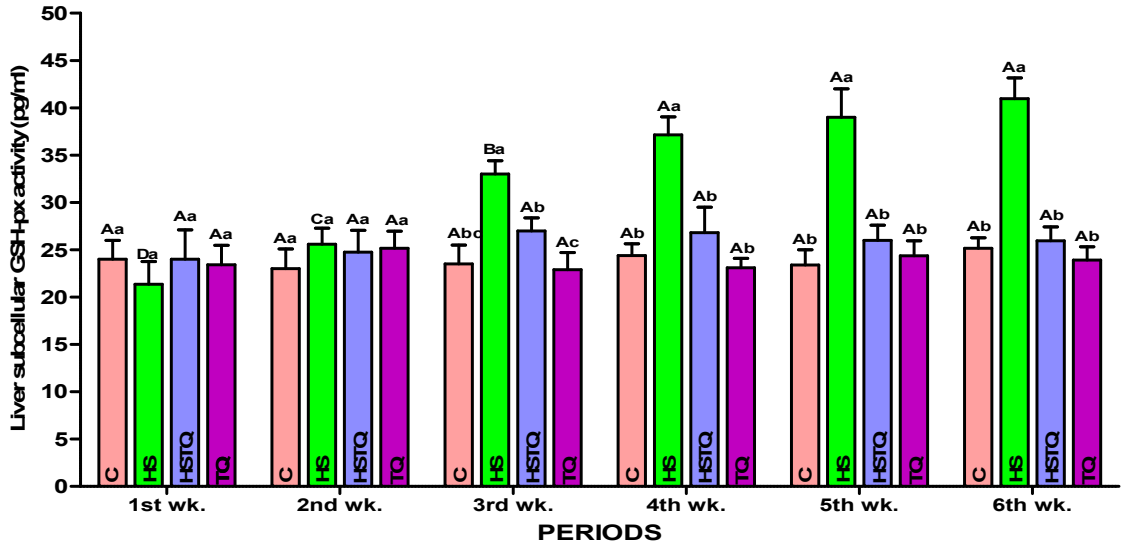
من جانب أخر، لوحظ تقاربا في معدل فعالية انزيم GSH-px في مصل دم الجرذان المعاملة بالثايموكوينون مع معدل فعاليته في السيطرة طوال اسابيع التجربة، اذ لم تسجل فروق معنوية ($P>0.05$) بينهما، وعند المقارنة احصائياً مع المجاميع الاخرى (HS,HSTQ) فنلاحظ ارتفاعه معنويا ($P<0.05$) خلال الاسابيع الاربعة الاولى (شكل 4-7أ).

اما في انسجة الكبد، وكما مبين في الشكل (4-7ب)، فقد اظهر معدل فعالية انزيم GSH-px انخفاضا معنوياً($P<0.05$) في ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري خلال الاسبوع الاول من التجربة بالمقارنة بمعدلات فعاليته في السيطرة والمجاميع الأخرى (HS,HSTQ,TQ) بعدها بدا في الارتفاع بشكل تدريجي ليكون اعلى معنوياً ($P<0.05$) من باقي المجاميع.

بالمقابل، فان المجاميع التي تناولت الثايموكوينون لوحده TQ او بالتزامن مع الاجهاد الحراري HSTQ وكما مبين في الشكل (4-7ب)، لم تلمس فروق احصائية ($P>0.05$) في معدلات فعالية انزيم فيما بينها وبين مجاميع السيطرة خلال اسابيع التجربة ماعدا في الاسبوع الثالث من التجربة اذ كان معدل فعالية الانزيم في مجموعة HSTQ اعلى معنويا ($P<0.05$) من مجموعة TQ فقط ومقاربة مع السيطرة .



الشكل (4-7 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على فعالية** GSH-px **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-7 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على فعالية** GSH-px **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

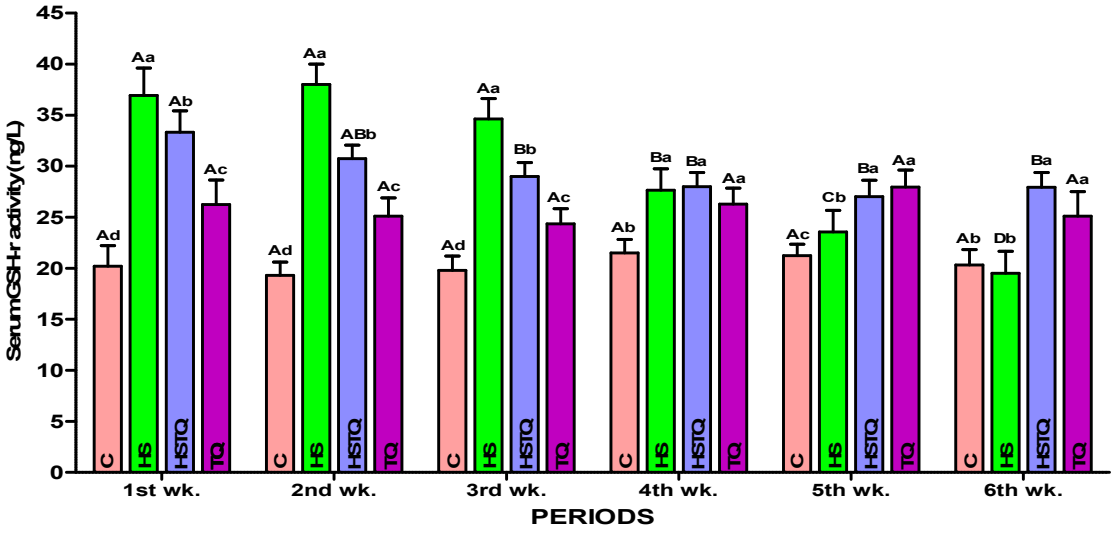
(4–8) فعالية GSH-r في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver GSH-r Activity

اظهر معدل فعالية انزيم GSH-r ارتفاعاً معنوياً($P<0.05$) في مصل دم الحيوانات المعرضة للحرارة HSوكذلك الحيوانات التي تناولت الثايموكونون مع التعرض للحرارة HSTQ خلال الاسابيع الثلاثة الاولى من التجربة مقارنة بالسيطرة والمجموعة التي تناولت الثايموكوينون فقط TQ، وهذا مانلاحظه من النتائج المبينة في الشكل (4–8أ)، إلا انه انخفض بشكل تدريجي ليصل الى عدم المعنوية مقارنة بمجموعة TQ في الاسبوع الرابع من التجربة بالرغم من انه بقي اعلى معنويا من السيطرة. وفي الاسابيع التي تلت ذلك (5^{th},6^{th}) انخفض معدل فعالية انزيم GSH-r في مجموعة الاجهاد الحراري HS ليصبح اقل معنويا من مجموعتي HSTQ و TQ في الاسبوع الخامس و لينخفض في الاسبوع السادس ليصل الى عدم المعنوية مع السيطرة($P>0.05$)عند اجراء المقارنة الاحصائية بينهم (شكل 4–8أ).

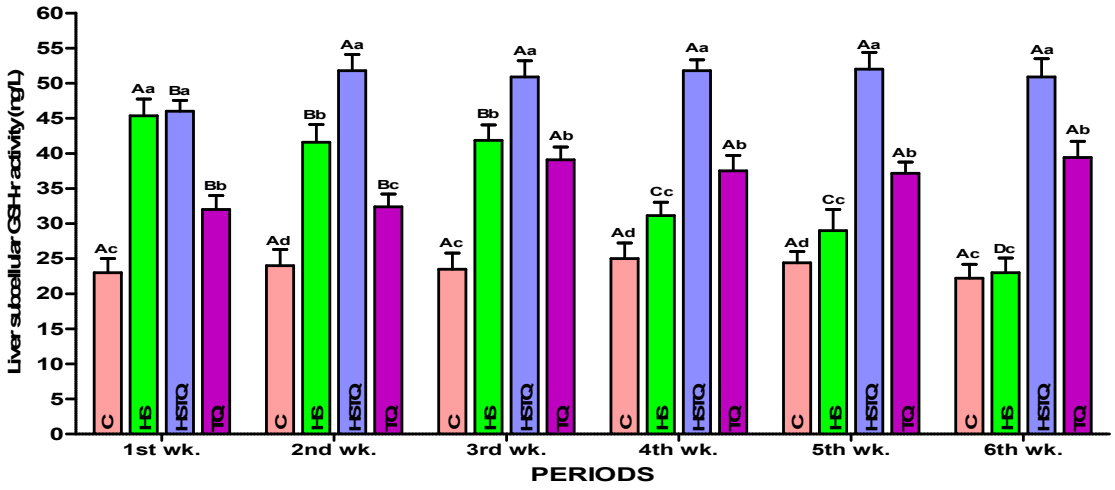
ويتضح من الشكل نفسه ان المجاميع المعاملة بـTQفقط كان معدل فعالية انزيم GSH-r فيها مرتفعا بشكل واضح مقارنة بمجاميع السيطرة فكانت اعلى معنوياً ($P<0.05$) طوال اسابيع التجربة، كما كانت معدلاتها اعلى معنويا من مجاميع الاجهاد الحراري خلال اخر اسبوعين من التجربة.

اما في انسجة الكبد، فقد شهد معدل فعالية انزيم GSH-r في الحيوانات المجهدة حرارياً ارتفاع معنوي($P<0.05$) بالمقارنة بمجاميع السيطرة ومجاميع TQخلال اول اسبوعين من التجربة (الشكل 4–8ب). ليبدأ في الانخفاض ليكون بمستوى غير معنوي($P>0.05$) مقارنة بمجموعة TQ في الاسبوع الثالث من التجربة، وينخفض اكثر خلال الاسابيع الثلاث الاخيرة من التجربة ليكون اقل معنويا ($P<0.05$) من مجموعة الثايموكوينون TQ، وأصبح بمستوى السيطرة في الاسبوع السادس من التجربة.

من جانب أخر، لوحظ عدم وجود فرق معنوي ($P>0.05$) في معدل فعالية انزيم GSH-r في انسجة كبد ذكور الجرذان المعاملة بالثايموكوينون والإجهاد الحراري HSTQ مع معدل فعاليته في مجموعة HS خلال الاسبوع الاول من التجربة، في حين في الاسابيع الباقية لوحظ ارتفاعه معنويا ($P<0.05$) عما كان عليه مقارنة مع مجاميع السيطرة و المجاميع الاخرى جميعها (شكل4–8ب). اما المجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط TQ فقد كان معدل فعالية الانزيم فيها مرتفع معنويا ($P<0.05$) مقارنة بمجاميع السيطرة طوال مدة التجربة،الا انه وكما يتضح من الشكل (4–8ب) انه خلال الاسابيع الاربعة الاخيرة كان معدل فعالية انزيم GSH-r فيها اعلى معنويا ($P<0.05$) عن معدل فعاليته في اول اسبوعين من التجربة.



الشكل (4-8 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على فعالية** GSH-r **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-8 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على فعالية** GSH-r **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

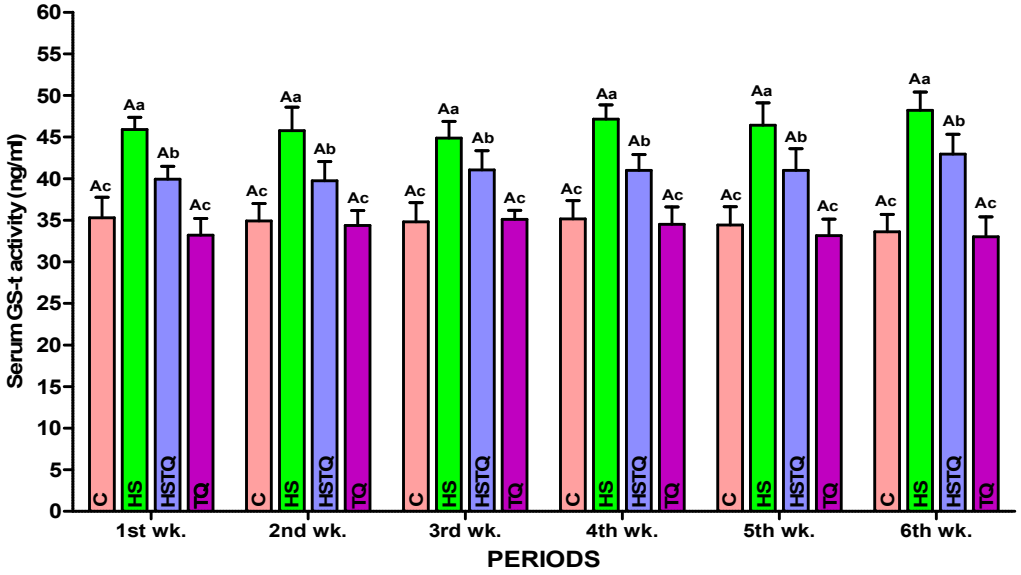
(4–9) فعالية GSH-t في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver GSH-t Activity

بين التحليل الاحصائي لنتائج معدل فعالية انزيم GSH-t المبينة في الشكل (4-9أ)حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) لمستوى فعالية الانزيم في مصل دم ذكور الجرذان في المجموعتاناللتان ضمت الحيوانات التي عرضت للإجهاد الحراري فقط HS و كذلك التي اعطيت الثايموكوينون بالتزامن مع الاجهاد ألحراري HSTQ مقارنة مع مجاميع السيطرة من جهة والمجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط طوال اسابيع التجربة.

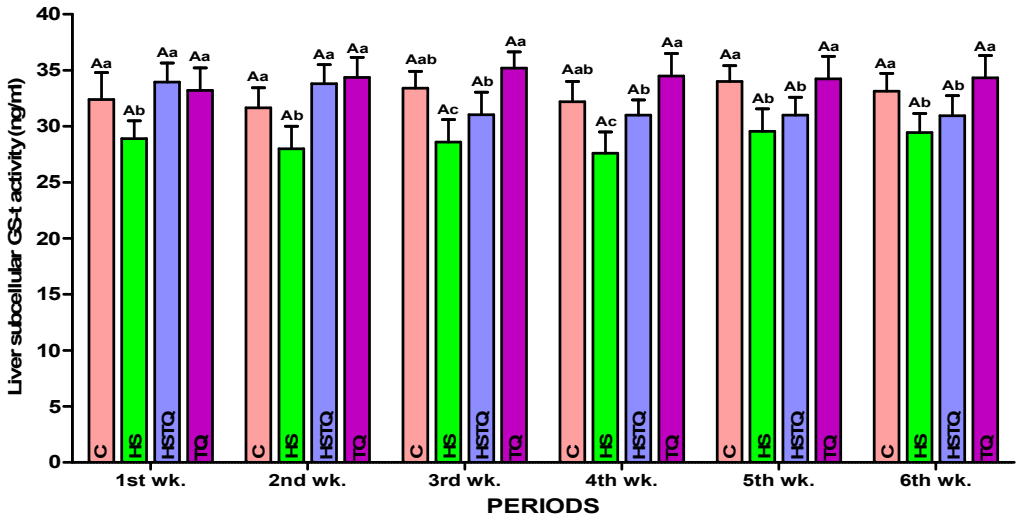
من جانب أخر، لوحظ عدم وجود فرق معنوي ($P>0.05$)في معدل فعالية انزيم GSH-t في مصل دم ذكور الجرذان المعاملة بالثايموكوينون فقط TQمع معدل فعاليته في السيطرة طوال اسابيع التجربة (شكل4–9أ).

اما في انسجة الكبد، فقد بين التحليل الإحصائي لنتائج فعالية انزيم GSH-t ان التعرض للحرارة العالية HS قد اثر في فعالية الانزيم في انسجة كبد ذكور الجرذان، اذ حصل انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل فعاليته مقارنة بمجاميع السيطرة خلال الاسابيع الستة من التجربة فضلا عن المجاميع الاخرى ماعدا في الاسبوعين الاخيرين اذ لم يكن هنالك فرق معنوي احصائيا ($P>0.05$) للمجموعة التي اعطيت الثايموكوينون بالتزامن مع الاجهاد الحراري HSTQ وهذه المجموعة الاخيرة كانت معدلات فعالية الانزيم فيها غير مختلفة معنويا ($P>0.05$) للسيطرة خلال الاسابيع الاربعة الاولى من التجربة لتنخفض عنها معنويا خلال اخر اسبوعين من التجربة وكما مبين في الشكل (4–9ب).

كما اوضحت النتائج المبينة في الشكل نفسه، عدم وجود فروق معنوية ($P>0.05$) بين معدل فعالية انزيم GSH-t انسجة كبد ذكور الجرذان المعاملة بالثايموكوينون لوحده TQمقارنة مع معدل فعاليته في مجاميع السيطرة لكل الاسابيع (شكل4–9أ).



الشكل (4-9 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على فعالية** GSH-t **في مصل دم ذكور الجرذان.**



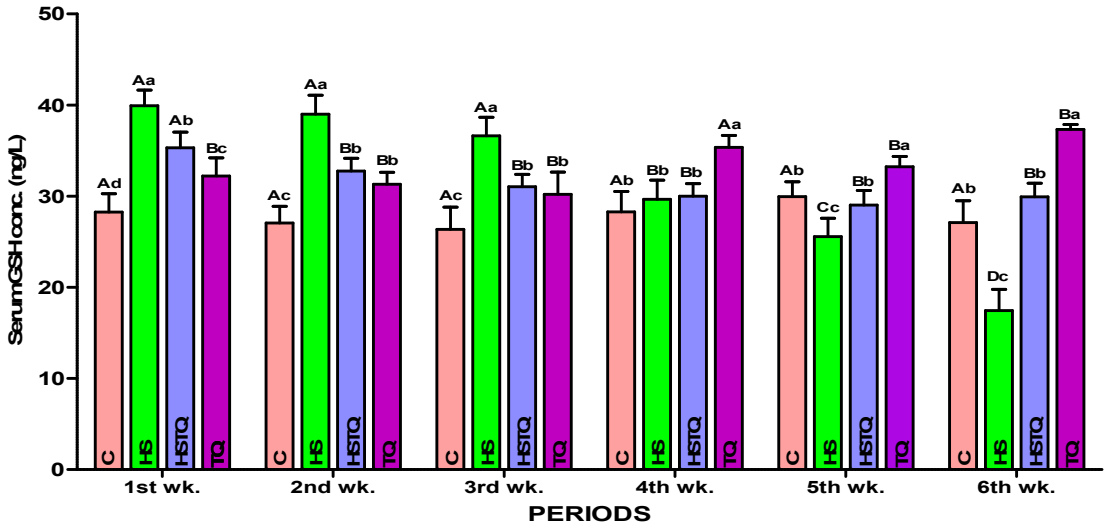
الشكل (4-9 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على فعالية** GSH-t **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

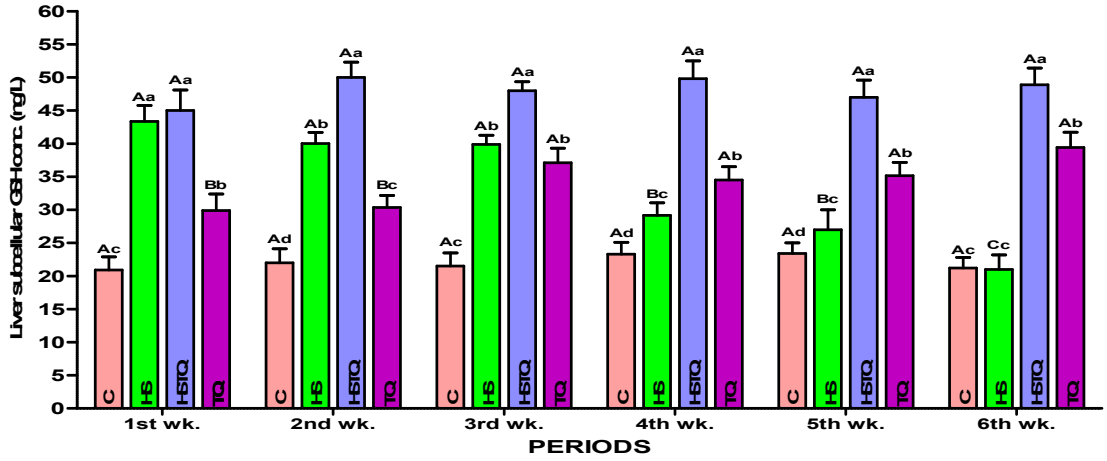
(4–10) تركيز GSH في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver GSH Concentration

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تأثر تركيز GSH في المصل جراء المعاملة بالحرارة العالية، إذ يتبين من الشكل (4–10أ) حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل تركيزه مقارنة مع مجاميع السيطرة وباقي المجاميع خلال الاسبوع الاول والثاني والثالث، بعدها بدأ في الانخفاض ليبصل الى عدم المعنوية ($P>0.05$) مقارنة بالسيطرة ومجموعة HSTQ واقل معنويا ($P<0.05$) من المجموعة المعاملة بالثايموكوينون فقط TQ في الاسبوع الرابع من التجربة، وفي الاسبوعين الاخيرين شهد معدل تركيز GSH انخفاض معنوي ($P<0.05$) مقارنة بباقي المجاميع وكان هذا الانخفاض على اشده في الاسبوع السادس من التجربة. من جانب أخر، اوضحت النتائج المدرجة في الشكل نفسه ان الحيوانات التي تناولت الثايموكوينون مع التعرض للحرارة HSTQ قد ارتفع معدل تركيز GSH في مصولها معنوياً ($P<0.05$) في الاسبوع الاول من التجربة مقارنة بالسيطرة ومجموعة TQ، وثم ينخفض في الاسبوع الثاني الى مستوى قريب من مجموعة TQ و لكنه بقي اعلى معنويا من السيطرة، في حين لم تلاحظ فروق معنوية ($P>0.05$) بين المجاميع الثلاثة هذه خلال الاسبوع الرابع وبقى ضمن معدلات مستقره خلال اخر اسبوعين من التجربة. اما المجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط، فكان معدل تركيز GSH فيها اعلى من السيطرة طوال مدة التجربة، واظهرت تفوقها بشكل واضح خلال الاسابيع الثلاثة الاخيرة من التجربة اذ كانت اعلى معنويا من باقي المجاميع في التجربة (شكل 4–10أ).

اما في انسجة الكبد، وكما مبين في الشكل (4–10ب)، فقد ارتفع معنويا ($P<0.05$) معدل تركيز GSH في مجموعة الحيوانات التي عرضت للحرارة مقارنة مع السيطرة منذ الاسبوع الاول وحتى الخامس ثم انخفض بشكل تدريجي الا انه بقي اعلى من السيطرة الا في الاسبوع السادس، اذ لم تسجل فروق معنوية ($P>0.05$)مع السيطرة. بالمقابل، عند اجراء المقارنة الاحصائية بين المجاميع المعاملة بالحرارة والثايموكوينون معا HSTQ وباقي المجاميع نجد ان تركيز الجلوتاثيون فيها كان اعلى معنويا ($P<0.05$) مقارنة مع البقية ما عدا في الاسبوع الاول اذ كان معدلها غير معنوي ($P>0.05$) مقارنة مع مجموعة HS. من جانب أخر، نلاحظ تأثر تركيز GSH جراء المعاملة بالثايموكوينون اذ ارتفع معنويا ($P<0.05$) مقارنة مع مجاميع السيطرة خلال كل الاسابيع وتفوق على المجاميع المجهدة حراريا فقط خلال الاسابيع الثلاثة الاخيرة، غير انه كان اقل معنويا من معدلات مجاميع HSTQ (شكل4–10ب).



الشكل (4-10 أ): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز** GSH **في مصل دم ذكور الجرذان.**



الشكل (4-10 ب): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على تركيز** GSH **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

(11.4) الدراسة الجزيئية

(1.11.4) التركيز الكلي ونقاوة الحامض النووي الرايبوزي

Total concentration and purity of RNA

التركيز الكلي ونقاوة الحامض النووي RNA في انسجة الكبد للمجاميع المختلفة خلال اسابيع التجربة قيست باستعمال Nanodrop spectrophotometer، اذ أعطت النماذج المختارة تراكيز جيدة من الحامض النووي RNA وبكميات كافية للبدء بفحص تفاعل سلسلة البلمرة كما مبين في الجدول (4-1)،وأشارت النتائج إلى أن النسبة بين الكثافة البصرية Optical density عند الطوليين الموجيين 260و280 نانومتر كانت ضمن النسبة الطبيعية وتتراوح ما بين 1.8 و 2.1 وهذا يُعد دليلاً على نقاوة الحامض النووي RNA الكلي لعينات الأنسجة في الدراسة.

جدول(4-1):**تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون في التركيز الكلي ونقاوة الحامض النووي الرايبوزي في انسجة كبد ذكور الجرذان**.

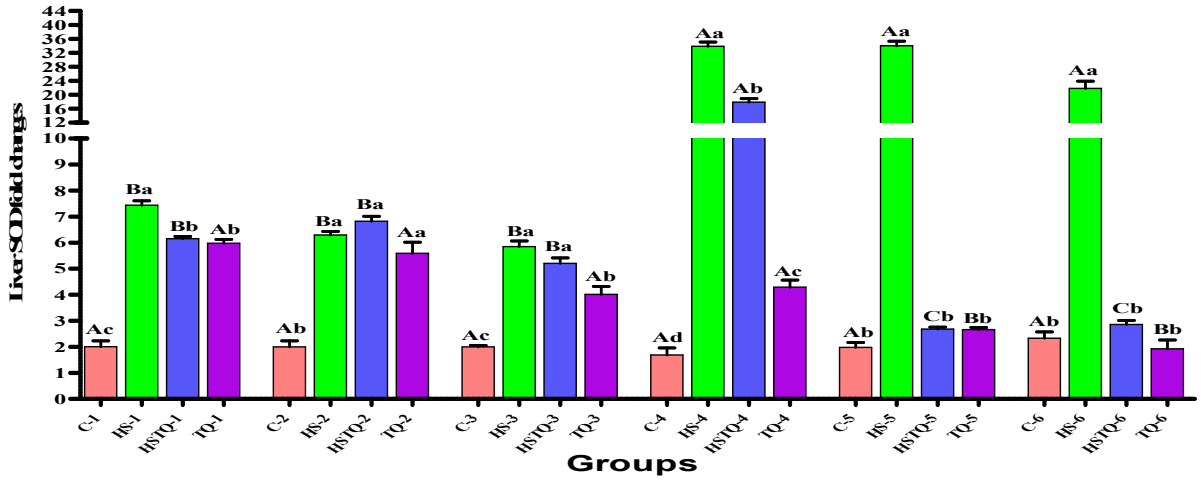
المعاملات		C	HS	HSTQ	TQ
الاسبوع الاول	تركيز RNA الكلي (ng/ul)	322.40	443.40	436.40	326.70
	نقاوة RNA (260/280nm)	1.86	1.89	1.96	1.88
الاسبوع االثاني	تركيز RNA الكلي (ng/ul)	367.20	453.40	437.80	286.10
	نقاوة RNA (260/280nm)	1.91	1.87	2.08	1.96
الاسبوع الثالث	تركيز RNA الكلي (ng/ul)	283.00	447.40	446.20	336.40
	نقاوة RNA (260/280nm)	1.83	1.85	1.94	1.80
الاسبوع الرابع	تركيز RNA الكلي (ng/ul)	359.10	443.40	436.40	326.70
	نقاوة RNA (260/280nm)	1.92	1.98	1.82	1.90
الاسبوع الخامس	تركيز RNA الكلي (ng/ul)	375.20	458.40	436.40	286.10
	نقاوة RNA (260/280nm)	2.01	1.86	1.99	2.00
الاسبوع السادس	تركيز RNA الكلي (ng/ul)	291.50	461.60	466.20	336.40
	نقاوة RNA (260/280nm)	1.98	1.84	1.93	1.88

(2.11.4) الكمية النسبية لتعبير جين SOD في انسجة الكبد

Relative quantification of SOD gene expression in liver

اظهرت نتائج فحص RT-qPCR المبينة في الشكل(4-11) حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى تعبير جين SOD في انسجة كبد ذكور الجرذان في المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري وكذلك المجموعتان اللتان ضمت الحيوانات التي عرضت للاجهاد الحراري و اعطيت الثايموكوينون معا، والحيوانات التي اعطيت الثايموكوينون فقط مقارنة بمجاميع السيطرة خلال الاسابيع الثلاثة الاولى من التجربة . من جانب اخر بينت النتائج حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى تعبير هذا الجين في المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري خلال الاسابيع الرابع

والخامس والسادس مقارنة مع مجاميع السيطرة لهذه الاسابيع من جهة وكذلك بالمقارنة مع نفس المجاميع في الاسابيع الثلاثة الاولى من التجربة وكما مبين في الشكل وبشكل واضح. وفي المقابل فقد شهد مستوى تعبير جين SOD في انسجة كبد ذكور الجرذان للمجموعة التي اعطيت الثايموكوينون خلال التعرض للاجهاد الحراري فيها زيادة معنوية ($P<0.05$) ملحوظة خلال الاسبوع الرابع مقارنة بباقي المجاميع في الدراسة ليعود وينخفض مستواه فيها ليصل الى عدم المعنوية مقارنة بالسيطرة وللمجموعة التي اعطيت الثايموكوينون فقط خلال الاسبوعين الخامس والسادس على التوالي من التجربة وبدون فرق معنوي احصائيا بينها ($P>0.05$)(شكل 4-11). من جانب اخر وكما مبين في الشكل نفسه ان مستوى تعبير جين SOD في انسجة كبد ذكور الجرذان التي اعطيت الثايموكوينون فقط قد شهد وابتداءا من الاسبوع الثالث من التجربة من انخفاض معنوي ($P<0.05$) بالمقارنة مع مستويات تعبير الجين في المجموعتين اللتين ضمت ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري من جهة والجرذان المعرضة للإجهاد الحراري وأعطيت الثايموكوينون من جهة اخرى.



الشكل (11.4): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على التغير التضاعفي لجين** SOD **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للإجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

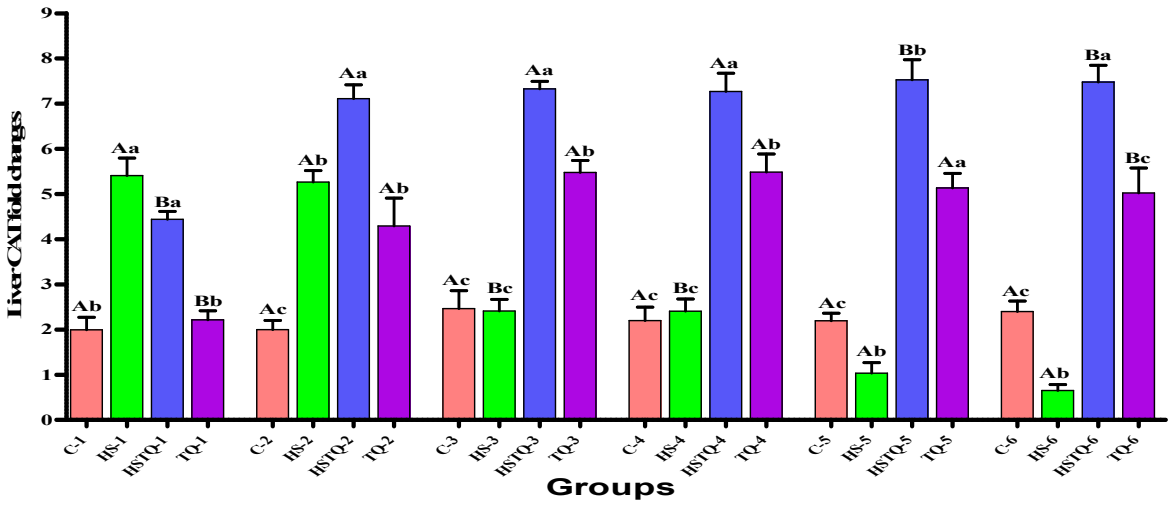
(3.11.4) الكمية النسبية لتعبير جين CAT في انسجة الكبد

Relative quantification of CAT gene expression in liver

اظهرت نتائج فحص تفاعل الاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي RT-qPCR المبينة في الشكل (4–12) حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى تعبير جين CAT في انسجة كبد ذكور الجرذان في المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري وكذلك المجموعة التي اعطيت الثايموكوينون مع التعرض للاجهاد الحراري خلال الاسبوع الاول والثاني من التجربة مقارنة بمجاميع السيطرة لكلا الاسبوعين المشار اليهما، اما في الاسابيع اللاحقة فقد لوحظ حصول انخفاض في مستوى تعبير الجين في المجموعة المعرضة للاجهاد مقارنة بمجاميع السيطرة ليصل هذا الانخفاض الى اشده ويكون معنويا ($P<0.05$) في الاسابيع الاخيرة اي الاسبوع الخامس و السادس على التوالي.

كذلك اظهرت النتائج المبينة في الشكل (4–12) ان اعطاء الثايموكوينون للجرذان المعرضة للإجهاد الحراري قد تسبب في زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى تعبير جين CAT في انسجة كبد ذكور الجرذان مقارنة بمجاميع السيطرة لكل الاسابيع واستمرت هذه الزيادة بمستويات ثابتة تقريبا خلال كل المدة التي استغرقتها التجربة، في حين ان مستوى تعبير الجين في هذه المجموعة كان اقل من مستواه في المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري في الاسبوع الاول ثم شهد ارتفاعا ملموسا ابتداءا من الاسبوع الثاني ليزداد الفرق معنويا بين مستويات التعبير خلال الاسبوع الثالث والرابع ($P<0.05$) ويكون الفرق شاسعا ومعنويا ($P<0.05$) في الاسبوعين والخامس والسادس من التجربة.

وهذا الامر مقارب لما شهده مستوى تعبير الجين في المجموعة التي اعطيت الثايموكوينون فقط اذ لم تلمس فروق معنوية ($P>0.05$) بين مستوى تعبير جين CAT في انسجة كبد ذكور الجرذان لهذه المجموعة مقارنة بمجموعة السيطرة في الاسبوع الاول من التجربة ، بعدها بدأ في الزيادة المعنوية منذ الاسبوع الثاني لتستمر الى الاسبوع الاخير من التجربة ، اذ كانت مستويات تعبير جين CAT في انسجة كبد ذكور الجرذان متقاربة في الاسابيع الاربعة الاخيرة مقارنة مع الاسبوع الاول (شكل4–12).



الشكل (12.4): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على التغير التضاعفي لجين** CAT **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

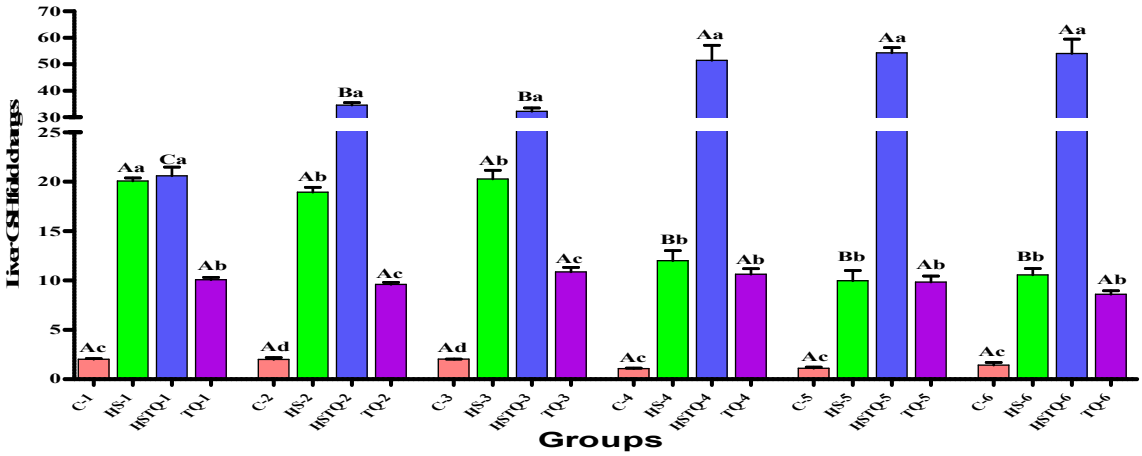
- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

4.11.4) الكمية النسبية لتعبير جين GSH في انسجة الكبد

Relative quantification of GSH gene expression in liver

يبين الشكل (4-13) تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على التغير التضاعفي لجين GSH بوساطة فحص تفاعل الاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي، اذ نجد حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى تعبير الجين في انسجة كبد ذكور الجرذان المجهدة حراريا HS طوال اسابيع التجربة مقارنة بمستويات تعبيره في السيطرة الا انه خلال الاسابيع الثلاث الاخيرة فان مستوى تعبير جين GSH في هذه الاسابيع شهد انخفاضا معنويا ($P<0.05$) مقارنة مع الاسابيع الثلاثة الاولى لنفس المجموعة. بالمقابل، بينت النتائج في الشكل (4-13) ان اعطاء الثايموكوينون للجرذان المعرضة للإجهاد الحراري HSTQ قد تسبب في زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى تعبير جين GSH في انسجة الكبد مقارنة بمجاميع السيطرة لكل الاسابيع واستمرت هذه الزيادة بمستويات ثابتة تقريبا طوال التجربة، في حين ان مستوى تعبير الجين في هذه المجموعة كان بمستوى تعبيره في مجموعة الاجهاد الحراري في الاسبوع الاول ثم شهد ارتفاعا ملموسا ابتداءا من الاسبوع الثاني ليزداد الفرق معنويا خلال الاسبوع الثاني والثالث ($P<0.05$) ويكون الفرق

شاسعا ومعنويا ($P<0.05$) في الاسبوعين والخامس والسادس من التجربة نتيجة للانخفاض المعنوي ($P<0.05$)الذي شهده تعبير جين GSH في ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري HS المشار اليه انفا. كما شهد مستوى تعبير جين GSH في انسجة كبد ذكور الجرذان التي اعطيت الثايموكوينون فقط TQ ارتفاعا معنويا ($P<0.05$) مقارنة بمستويات تعبيره بالسيطرة لكل الاسابيع إلا انه كان منخفض معنويا ($P<0.05$) مقارنة مع مستويات تعبير الجين في مجموعتي الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري من جهة والجرذان المعرضة للإجهاد الحراري وأعطيت الثايموكوينون HSTQ من جهة أخرى، إلا انه نجد ان المجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط كانت مستويات تعبير الجين فيها مستقرة تقريبا طوال ستة اسابيع وهي مدة التجربة (الشكل 4-13).



الشكل (13.4): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على التغير التضاعفي لجين** GSH **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

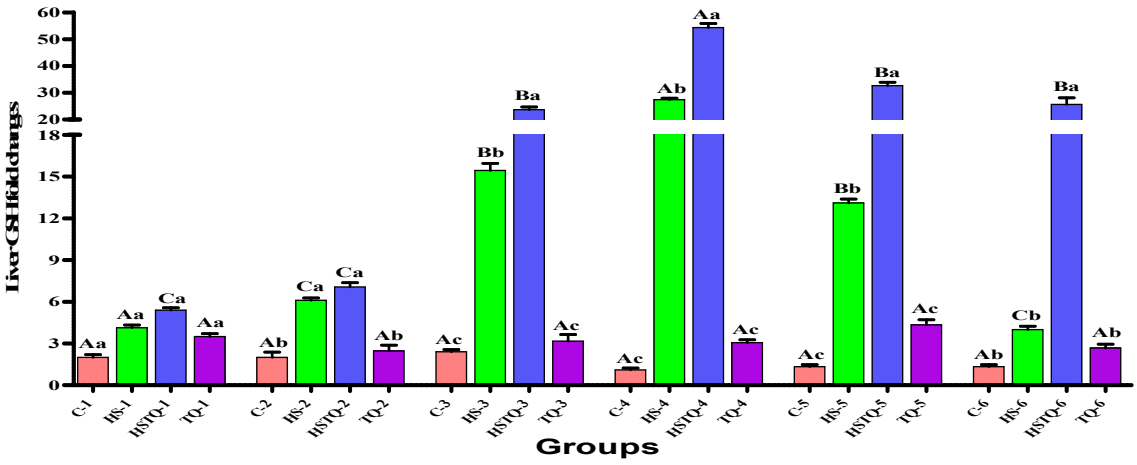
- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي ($P< 0.05$) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

(5.11.4) الكمية النسبية لتعبير جين HSP 70 في انسجة الكبد

Relative quantification of HSP70 gene expression in liver

اظهرت نتائج فحص RT-qPCR المبينة في الشكل (4-14) حصول زيادة لم تصل الى مستوى المعنوية في مستوى تعبير جين HSP 70 في انسجة كبد ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري مقارنة بالسيطرة خلال الاسبوع الاول من التجربة، ثم وصلت هذه الزيادة الى مستوى

المعنوية (P<0.05) ابتداءا من الاسبوع الثاني وحتى الاسبوع الخامس من التجربة لتعود وتنخفض خلال الاسبوع السادس مقارنة بالأسابيع السابقة. كذلك اظهرت النتائج المبينة في الشكل (4-14) ان الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري والتي اعطيت الثايموكوينون قد شهدت زيادة معنوية (P<0.05) تدريجية في مستوى تعبير جين HSP 70 في انسجة الكبد مقارنة بمجاميع السيطرة لكل الاسابيع وكانت هذه الزيادة المعنوية اكثر وضوحا خلال الاسابيع الاربعة الاخيرة من التجربة، ومن جهة اخرى كان مستوى تعبير الجين في هذه المجموعة متقارب مع مستواه في مجموعة الاجهاد الحراري فقط خلال الاسبوع الاول والثاني والثالث من التجربة ثم يبدأ في التفوق عليه خلال الاسبوع الرابع والخامس ليصل الفرق بينهما الى اقصاه خلال الاسبوع السادس من التجربة بزيادة معنوية واضحة (P<0.05) عن باقي مجاميع التجربة جميعها. من جانب اخر وكما مبين في الشكل(4-14) ان مستوى تعبير جين HSP 70 في انسجة كبد الجرذان التي اعطيت الثايموكوينون فقط لم يشهد تغيرا معنويا واضحا (P>0.05)، مقارنة مع مجاميع السيطرة طيلة اسابيع التجربة، وكان مستوى تعبير الجين لهذه المجموعة اقل معنويا (P<0.05) من مجموعة الاجهاد الحراري فقط والمجموعة التي اعطيت الثايموكوينون مع التعرض للحرارة ابتداءا من الاسبوع الثاني من التجربة.



الشكل (14.4): **تأثير الاجهاد الحراري والثايموكوينون على التغير التضاعفي لجين** HSP 70 **في انسجة كبد ذكور الجرذان.**

- الحروف الصغيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي (P< 0.05) بين المجموعات.
- الحروف الكبيرة المختلفة تعني وجود فرق معنوي (P< 0.05) بين الاسابيع لكل مجموعة.
- C مجموعة السيطرة .
- HS المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري.
- HSTQ المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري والمعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.
- TQ المجموعة المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم.

(5): المناقشـــة Discussion

(1.5): تركيز إلانزيمات الناقلة للامين و الفوسفاتيز القاعدي في المصل وأنسجة الكبد

AST,ALT & ALP concentrations in serum and liver

تتباين فعالية وتركيز الأنزيمات الموجودة في مصل الدم حسب الحالات المرضية، بينما في الحالة الطبيعية لا تكون مستويات اغلب هذه الأنزيمات عالية في المصل مقارنة مع مثيلاتها في الأنسجة ألأخرى لذا تعد أنزيمات المصل من العلامات المساعدة في الحصول على معلومات وافية عن النسيج الذي حدث فيه الخلل او الضرر، والإنزيمات المتمثلة بـAST و ALT بالإضافة الى ALP إنزيمات مهمة وضرورية في العمليات البيولوجية و تتواجد بنسب عالية في الكبد (Murray *et al* ., 2003)، ونظرا الى ان الكبد يتميز بالحساسية العالية وسرعة تأثره لذا يعد تقدير تركيز هذه الانزيمات جزءً مهماً من تقييم وظائف الكبد في الحيوانات المتعرضة للاجهاد الحراري . (Kataria *et al*., 2011)

أظهرت نتائج هذه الدراسة حصول ارتفاع في تركيز الإنزيمات الناقلة للأمين ALT و AST وإنزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في مصل دم ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري يقابله انخفاض في تراكيزها في انسجة كبد ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري مقارنة بمجاميع السيطرة من جهة والمجاميع الاخرى من جهة اخرى.

يتباين تأثير الاجهاد الحراري من عضو إلى أخر إلا ان الكبد يعد عضو مستهدف مقارنة مع بقية الأنسجة ويرجع هذا للدور الأساسي الذي يلعبه الكبد في مختلف الوظائف، مما يضعه في مواجهة خطر التعرض للحرارة العالية ونواتجها (Arneson & Brickell, 2007)، ويؤدي الاجهاد الحراري إلى تغيرات على المستوى النسجي في الكبد و يظهر ذلك جليا من خلال النتائج المحصل عليها في الدراسات النسيجية والتي تجسد مدى إستجابة الخلية الكبدية عند التعرض الحاد او المزمن للحرارة العالية وتتمثل باضطرابات في توازن الخلية تنعكس وظيفيا وتركيبيا الراجع بشكل رئيس للأثر السمي للجذور الحرة المتسببة في أضرار لمختلف مكونات الغشاء، ويترجم هذا بتسرب الانزيمات، بعدها تتفاوت سرعة تحرير الأنزيمات من خلال النسيج الى المصل بالنسبة الى الأنزيم الواحد وتعتمد على مدى أمكانية ذلك الأنزيم على النفاذ من خلال جدران الخلايا المختلفة .(Mostafa *et al*., 2007;Easa & Hekal, 2015)

من خلال نتائج مختلف التجارب والدراسات يتجلى بوضوح أن التعرض للحرارة العالية يؤدي إلى ارتفاع تراكيز انزيمات الكبد في الدورةالدموية، منها الدراسة التي قام بها Agrawal و Gupta (2013) في ذكور الجرذان البالغة والمعرضة لدرجة حرارة 0.5 ± 37 ºC لمدة 4 ساعات متواصلة لفترات ضمت 2 و 5 و 10 ايام متواصلة وكان من نتائج هذه الدراسة التأكيد ان التعرض للحرارة العالية من شانه أن يعمل على التأثير تراكيز الإنزيمات الناقلة للأمين ALT و AST وإنزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في المصل مسببا ارتفاعها عن معدلاتها في المجاميع غير المعرضة للحرارة، في حين لاحظ Easa و Hekal (2015) في الارانب المعرضة للاجهاد الحراري ان ارتفاع انزيم ALT الذي يعود سببه بالدرجة الاساس الى تحطم الخلايا الكبدية يصاحبه عادة ارتفاع انزيم AST.

وكما هو معلوم ان الجلد يعد اول الاعضاء تأثرا بالإجهاد الحراري، كما أن معظم الحرارة المتبادلة بين جسم الكائن الحي والمحيط الخارجي تتم عن طريق الجلد، لذا تعد حرارة الجلد ذات اهمية بالغة في عملية التنظيم الحراري من خلال تنشيط دوران الدم Blood flow وتوسع الاوعية الدموية Vasodilatation فيه (Saper, 2003)، يقابله انقباض الاوعية الدموية Vasoconstriction في الاعضاء الداخلية وخصوصا الكبد والطحال اللذان يعدان مستودعا للدم مما يسمح بضخ كمية اضافية من الدم الى سطح الجسم من اجل زيادة الفقد الحراري، الامر الذي يسبب انخفاض في محتوى الاعضاء هذه من الاوكسجين اي ما يعرف بنقص الاوكسجين Hypoxia وان هذه الحالة تسبب ضررا واضحا لنسيج الكبد ينتج عنه تسرب هذه الإنزيمات الكبدية الى مجرى الدم (Agrawal & Gupta, 2013).

تشير الدراسات إلى إن تعرض الحيوانات لمجهدات بيئية مختلفة يؤدي إلى حدوثتغيرات تركيبية واضطرابات في الفعاليات الايضية نظرا لوجود علاقة وطيدة بين التركيب و الوظيفية ومن الامور المتفق عليها أن الإجهاد البيئي ومن ضمنه الإجهاد الحراري يسبب زيادة إفراز هرمون الكورتيكوستيرون (Sinha 2007;Khodaei-Motlagh *et al*., 2011). والذي لهتأثير على أيض البروتينات من خلال تأثيره في العديد من الأنزيمات الموجودة في الكبد مثل AST و ALT التي يكون لها دور في تجهيز مصادر للطاقة من خلال تكوين الكلوكوز من مصادر غير كاربوهيدراتية Gluconeogenesis وتعتمد على توفر الأحماض الأمينية الناتجة من هدم البروتين في ألانسجة إذ يقوم الانزيمانبنقل مجاميع الامين من الاحماض الامينية الى الاحماض الكيتونية وبالعكس وان الاخيرة تعد مصدراً مهماً للطاقة (Burtis &Ashwood,1994).

من جانب اخر تبين ان المعاملة بالثايموكوينون TQ قد ادت الى تحسن ملموس في معدل تركيز الإنزيمات في المصل وانسجة الكبد عندما اعطى بالتزامن مع الاجهاد الحراري مقارنة

بالحيوانات المجهدة حرارياً، إلا انه في الوقت ذاته لا تزال تشهد تباينا بالمقارنة بتراكيز مجاميع السيطرة والمجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط، وبالرغم عدم وجود دراسات كافية على تأثير الثايموكوينون على انزيمات الكبد في حالات الاجهاد الحراري سوى دراسة قام بها Al-Zahrani و جماعته (2011) على ذكور الفئران ودراسة اخرى قامت بها Sattar (2015) على ذكور الجرذان الا ان نتائجهما تؤكد تحسن وظائف الأعضاء وعدم تلف الأنسجة وانه لا يشكل خطورة على أنسجة الجسم المختلفة بدليل عدم ارتفاع مستوى أنزيمات ALT و ALP و AST في مصل الحيوانات المعاملة بالثايموكوينون فقط. وأضاف Al-Zahrani و جماعته (2011) في دراسته المشار اليها ومن خلال فحص انسجة الكبد بالمجهر الالكترونيElectron microscopy،ان الثايموكوينون ساعد في عكس التغيرات المرضية–النسجية Histopathological changes في كبد الفئران المعرضة للحرارة وأعادتها الى تركيبها بصورة مشابهة للسيطرة.

وعلى الرغم من قلة المصادر التي تربط جانبي الدراسة كما اشرنا، إلا ان العديد من الدراسات تطرقت وبينت إلى أهمية الثايموكوينون على الوقاية من وعلاج حالات تلف الخلايا الكبدية وتراجع العطب الغشائي الذي يعكسه الحد من التسرب الإنزيمي عبر ممارسة نشاطه المضاد للأكسدة وتثبيط الأكسدة اللبيدية ومواقع التسرب الإلكتروني خصوصا تدفق أيونات الكالسيوم أو حفظ التخليق البروتيني، وهذا ما أثبتته نتائج دراسات حديثة تناولت التأثير الوقائي للثايموكوينون من التسمم الكبدي المحرض بالأدوية منها دراسة Nagi وجماعته (2010) في الفئران على عقار Acetaminophen المستخدم كمسكن للآلام Analgesic اذ تبين ان اعطاء الثايموكوينون الى الفئران بثلاث تراكيز تبلغ 0.5 و 1 و 2 ملغم/كغم عن طريق الفم لمدة 5 ايام متتالية قد اسهم في عكس التاثيرات السلبية التي سببها 500 ملغم/كغم في البريتون من العقار والتي احدثت التسمم الكبدي Hepatotoxic dose منها خفض تركيز ناقلات الامين في المصل وزيادتها في انسجة الكبد بالمقارنة بالفئران غير المعاملة.

وبينت دراسة Lebda وجماعته (2011) ان الثايموكوينون قد منع تسرب هذه الانزيمات من الكبد Liver enzyme leakage الناتج عن D-galactosamine في الجرذان، كما اوضح Abdel-Wahab (2013) في دراسته حول تأثير الثايموكوينون على التسمم الكبدي المحرض بفلوريد الصوديوم Sodium fluoride (NaF) ان 10 ملغم/كغم من TQ لمدة 4-5 اسابيع قد أسهمت، من ضمن تأثيرات اخرى على صورة الدهون في الحيوانات ومضادات الأكسدة على خفض تركيز الإنزيمات الناقلة للأمين ALT و AST وإنزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في مصل دم الجرذان المعرضة لفلوريد الصوديوم.

وقد وجد ان الثايموكوينون ومن خلال خصائصه المضادة للالتهاب Anti-inflammatory يثبط من افراز العوامل الوسطية عالية الفعالية مثل Nitric oxide synthetase و Interleukin (IL-1β) إضافة إلى عامل Tumor necrosis factor (TNF) المسئولة عن بعض مظاهر التحلل النسجي، اذ بينت الدراسة التي قام بها Al-Malki و Sayed (2014) حول تأثير عقار Cisplatin المستخدم في معالجة الاورام السرطانية Anti-cancer drug، ان الثايموكوينون ومن خلال تثبيطه للعوامل المذكورة قد خفف من الاضرار التي لحقت بخلايا الكبد وعمل على تحسن حالة إنزيمات الكبد عما كانت عليه في الجرذان المعاملة بالسيسبلاتين.

ويمكن أن تؤخذ النتائج التي توصل اليها Bamosa (2015) بنظر الاعتبار في تفسير تأثير الثايموكوينون في انزيمات الكبد، اذ إن تأثيره الخافض للسكر Antidiabetic حسب ما أشارت إليه الدراسات العلمية المستحدث فيها داء السكري تجريبياً علاوة على دوره الايجابي في زيادة مستوى إنتاج الأنسولين Insulinotropic action وزيادة تعبير جينات خلايا بيتا المسؤولة عن انتاجه(Al-Tameemi, 2014) ، قد يكون سبباً في تقليل حركة الدهون وتقليل الاعتماد على الأحماض الدهنية في تصنيع الكلوكوز من مصادر غير كاربوهيدراتية Gluconeogenesis وبالتالي يخفض تركيز الانزيمات في المصل.

كما أن الثايموكوينون ومن خلال مساهمته في خفض تركيز الجليسيريدات الثلاثية Triglyceride يعمل بشكل غير مباشر في خفض تركيز إنزيم ALP المرتفع جراء التعرض للحرارة العالية، فحسب ما اشار اليه Shim وجماعته (2005) و Amici وجماعته (2000)ولعدة أسباب يتم تعطيل أيض الدهون داخل الكبد حيث تتجمع الجلسريدات الثلاثية داخل قطرات في خلايا الكبد ولا تطرح مع الصفراء كما في الحالة الطبيعة فيحصل ارتفاع في تركيز هذا الإنزيم في المصل الذي يعد دالة على الانسداد الكبدي (Kachmar & Moss, 1982)، كذلك بينت دراسة Ogus وجماعته (2012) ان اعطاء الثايموكوينون عن طريق الفم الى الجرذان التي خضعت لعملية ربط لقناة الصفراء قد اسهم في التقليل من الضرر النسيجي المصاحب لهذه العملية المتمثل بتكاثر خلايا القناة الصفراوية Bile duct proliferation والتليف حولها Periductular fibrosis علاوة على تقليل تركيز إنزيم ALP المرتفع جراء هذه التغيرات.

(2.5): تركيز MDA في المصل وأنسجة الكبد

Serum & Liver MDA Concentration

يعد تقدير النواتج النهائية لتأكسد الدهون lipid peroxidation (LPO) من اشهر الطرائق المستخدمة لقياس مستوى الجذور الحرة نظراً لكون الجذور الحرة تملك عمر نصف قصير

(Jomova *et al*., 2010)، وأن تفاعل الجذور الحرة مع الجزئيات الحيوية كالبروتينات والدهون والأحماض النووية ينتج عنه نواتج نهائية مستقرة يمكن عدها مؤشراً لفعل الجذور الحرة لذلك عمد الباحثون لقياس ضرر الجذور الحرة من خلال قياس تراكيز هذه النواتج (Mari *et al*., 2010).

وتحدث اكسدة الدهون على مستوى الأغشية الحيوية للخلية في شكل تفاعلات متسلسلة، إذ تحرض الجذور الحرة المشتقة من الأوكسجين تفاعلات جذرية على مستوى الدهون المفسفرة للأغشية الخلوية، اذ يبحث كل جذر في بيئته على إلكترون ليكمل مداره الخارجي، يجده على جزئية مجاورة، مخلقا بذلك جذر حر جديد و الذي سيبحث بدوره على إلكترون لإتمام مداره الخارجي وهكذا تحدث السلسلة (Repetto *et al*.,2010).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان معدل تركيز MDA في مصل الدم وأنسجة الكبد شهد ارتفاعاً معنوياً لدى مجموعة الحيوانات التي عرضت للحرارة العالية طوال اسابيع التجربة بالمقارنة مع معدلات مجاميع السيطرة و HS,HSTQ .

من خلال نتائج مختلف التجارب والدراسات يتجلى بوضوح ان الخلايا تستجيب للاجهاد الناتج عن ارتفاع درجة الحرارة بنفس الطريقة التي تستجيب بها للإجهاد التاكسدي واختلال التوازن في الاستتباب الداخلي للخلايا مما يقود الى تكوين الجذور الحرة بشكل مفرط (Dhanalakshmi *et al*., 2007;Slimen *et al*., 2014) كذلك فان الجرذان نفسها تعد تحت ضغط اضافي كون تنظيمها الحراري اقل كفاءة من اللبائن كبيرة الحجم، لذا يزداد انتاج الجذور الحرة Overproduction، و تتفاعل الجذور الحرة مع المكونات الخلوية وتعد الأغشية الخلوية الهدف الأكثر تعرضا لتفاعلات الجذور الحرة بسبب احتوائها على الحوامض الدهنية المتعددة غير المشبعة Unsaturated fatty acids،اذ أن هذه الحوامض تمتلك أواصر مزدوجة والتي تعد الهدف الرئيس للجذور الحرة و يؤدي تفاعل الجذور الحرة معها إلى أكسدتها و تشكيل مركبات الديهايدية سامة متمثلة Malondialdehyde (MDA) (Pratt *et al*., 2011)، مما ينتج عنه حدوث تغيرات عدة تركيبية ووظيفية تؤدي إلى انخفاض سيولة الغشاء وتعطيل العديد من الإنزيمات و المستقبلات الغشائية وأخيرا تؤدي إلى تغيير طبيعة الخلية، كما ذكر Stark (2005) ان هذا الاضطراب الناتج سيحرر انزيمات Lipoxygenase التي تؤكسد بدورها ايضا الدهون في الخلايا مما يزيد من انتاج MDA فيها، كما إن ارتفاع MDA ليس فقط علامة واضحة للإجهاد والضرر التاكسدي بل هو إشارة مميزة الى التنظيم غير السوي لمضادات الأكسدة الناتج عن الاجهاد الحراري(Bernabucci *et al*., 2002) .

علاوة على ما تقدم ، أشار Agarwal و Prabhakaran (2005) ان التعرض للاجهاد الحراري يزيد من تكوين ايونات المعادن الانتقالية transition metal ions (TMI) والتي تعمل

كواهب الكتروني للاوكسجين مكونا Superoxide radical او H_2O_2 والذي يختزل بدوره الى OH radical مسببا ارتفاع جهد الاكسدة في الخلية متمثلا بـ MDA، كما اشار كل من Ramnath و جماعته (2007) و Lin وجماعته (2000) الى زيادة اكسدة الدهون وخصوصا بسبب تأكسد البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL في الدواجن وما ينتج عنه من زيادة في MDA.

شهد معدل تركيز MDA في مصل دم مجموعة HSTQ تحسنا ملموسا، اذ انخفض معنوياً بالمقارنة مع نظيرتها مجموعة HS، كما انخفض معدل تركيزه فيها فأصبح متقاربا مع مجموعة TQ في الاسبوع السادس من التجربة. ولم يوجد فرق معنوي في معدل تركيز MDA بين مجاميع TQ والسيطرة. اما في انسجة الكبد، وابتداءاً من الاسبوع الرابع وحتى نهاية التجربة نجد ان معدل تركيز MDA في انسجة كبد مجموعة HSTQ، قد انخفض بحيث وصل الى معدلات قريبة من السيطرة ومجاميع TQ ، وهذه المجاميع الاخيرة قد شهدت انخفاضا معنويا بالمقارنة مع السيطرة في الاسبوعين الاخيرين من التجربة.

يتميز اعطاء الثايموكوينون عن طريق الفم ببطء الامتصاص ولكن سرعة نفاذه من الدورة الدموية وهذا ما يشير الى عمليه تحويله بايولوجياً Biotransformation من خلال نشاط بعض الانزيمات التي تصنعها الكبد مثل Quinine reductase و DT-diaphorase التي تحفز اختزال الثايموكوينون الى Dihydrothymoquinone (Nagi & Almakki, 2009) الذي يمتلك خواص مضادة للأكسدة اقوى مما للمركب الاصلي ومشابه لما ما موجود بمركب Trolox الذي يعد المركب القياسي Standard antioxidant الذي يتم معايرة بقية مضادات الاكسدة نسبة اليه في الفحوصات (Khalife & Lupidi, 2007;Mabrouk & Ben Cheikh; 2016).

كما ان القدرة الوقائية للثايموكوينون إزاء أكسدة دهون اللأغشية لها علاقة مباشرة مع توجيه الثايموكوينون في الأغشية الحيوية و ترتبط بالبنية الجزيئية و القدرة على التفاعل و الدخول في الطبقة الدهنية المزدوجة مما يقلل من تركيز الجذور الحرة المسببة لأكسدة الدهون وتكوين MDA (Badary *et al.*, 2003)، لاسيما وان مجموعة الكوينون في تركيبه لوحدها لها تأثير كاسح لهذه الجذور حسب ما اشار اليه Nagi و Mansour (2000) في تحريهم للفوائد الوقائية للثايموكوينون على التأثيرات السمية لعقار Doxorubicin على القلب Cardiotoxicity في الجرذان.

وأوضح كل من Dhingra وجماعته (2014) و Marsik وجماعته (2005)الدور الفعال للمركبات الفعالة للحبة السوداء وخاصة الثايموكوينون كواحدة من اهم المثبطات الطبيعية لإنزيم Cyclooxygenase (COX) للتقليل من الالتهابات وبالتالي تقليل من الجذور الحرة الناتجة من نشاط الخلايا الالتهامية .

تمتلك الخلية مجموعة متطورة من الاليات التي تؤمن لها التعامل مع المركبات السامة او مثل Malondialdehyde المتمثلة في مجموعة من الانزيمات ومركباتاخرى مثلالجلوتاثيون من خلال تحويلها الى شكل اكثر استقرارا او تمهيدا لنقله الى الاعضاء المسؤولة عن التخلص منه كالصفراء او الكليتين بما يدعى بعملية ازالة السمية Detoxification و المسؤولة عنها الكبد خصوصا (Yadav & Raman, 2013)، وقد وجد ان الثايموكوينون من خلال مساهمته في رفع تركيز الجلوتاثيون فضلا عن التدخل في تعديل مسارات نقل الاشارة Cell singling الخاصة بانزيمات ازالة السمية سيترجم الى مجموعة من التأثيرات الايجابية لهذا المركب والتي اثبتت على حيوانات التجارب مما يؤدي إلى خفض MDA في مصل الدم و الكبد كدليل على التعافي من الاجهاد (Sayed-Ahmed *et al*., 2010; Ismail *et al*., 2010).

(3.5): مضادات الاكسدة في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver Antioxidants

إن التراكيز المحدودة من الجذور الحرة لاغنى عنها، اذ أّنها تؤمن العديد من الفعاليات الحيوية كما هو الحال في الاستجابات المناعية والالتصاق الخلوي والموت المبرمج والشيخوخة، ولسيطرة عليها تمتلك الخلية مجموعة متطورة من الآليات التي تؤمن لها الحماية ضد الجذور الحرة و المتمثلة في جهاز دفاعي متكامل مضادة للأكسدة(Halliwell & Guttteridge, 2007) ، اذ تتضافر جزيئاته الإنزيمية منها وغير الإنزيمية في التخلص من الجذور الحرة، ومن خلال نتائج مختلف التجارب و الدراسات يتجلى بوضوح ان الخلايا تستجيب للإجهاد الناتج عان ارتفاع درجة الحرارة بنفس الطريقة التي تستجيب بها للإجهاد الناتج عن ارتفاع جهد الاكسدة في الخلايا والذي يعرف عامة بالإجهاد التاكسدي (Slimen *et al*., 2014).

وقد يتسبب التشكيل الفائق والسريع للجذور الحرة في زيادة الأكسدة وحدوث استنزاف للجزيئات المضادة للأكسدة، فلا يستطيع الجسم تعويضها أو تجديدها في فترة وجيزة، لذا من الطبيعي أن يلاحظ ضعف في القدرة الدفاعية العامة، لذا زاد الإهتمام أكثر بمضادات الأكسدة الطبيعية المتواجدة في النباتات الطبية والغذائية وذلك لفعاليتها، توفرها و قلة تأثيراتها الجانبية (Kim *et al*., 2010;Kim *et al*.,2012).

(1.3.5): تركيز SOD و CAT في المصل وأنسجة الكبد

Serum & Liver SOD, CAT Concentrations

أظهرت النتائج حصول ارتفاع معنوي في معدل تركيز انزيمي SOD و CAT في مصل دم مجموعة HS مقارنة مع مجاميع السيطرة طوال التجربة، في الوقت ذاته خلال الاسابيع الثلاثة

الاخيرة كانت معدلات تركيز انزيم SOD اعلى مما كانت عليه في الاسابيع الثلاث الاولى من التجربة والعكس بالنسبة لانزيم CAT ، اذ كان هذا الارتفاع اكثر وضوحا خلال الاسابيع الاولى مقارنة بالأسابيع الثلاثة الاخيرة من التجربة.

قد تبدو النتائج المشار اليها في اعلاه مستغربة في بادئ الأمر، اذ يشير المنطق الى حتمية حصول انخفاض في تراكيز هذه الانزيمات المضادة للأكسدة جراء التعرض للحرارة العالية وليس العكس كما اوضحت النتائج، كون الحرارة العالية تتسبب في زيادة تركيز الجذور الحرة وبالتالي في إحداث تغيرات على مستوى الإنزيمات المضادة للأكسدة، إلا انه ومن خلال المعلومات المستقاة من البحوث والدراسات يتجلى بوضوح أن معايير الاجهاد التاكسدي عموما والإجهاد الناتج عن العوامل البيئية وخصوصا الحرارة تختلف حسب مدة التعرض من حيث كون التعرض مزمن او تحت مزمن او حاد علاوة على كونه متواصل او على فترات متفاوتة، كما ان قدرة وفاعلية مضادات الاكسدة ليس بالضرورة مرتبطة بوجوب الارتفاع في مستوياتها، اذ قد تعاني من انخفاض النشاط الإنزيمي مما ينتج عنه ضعف القدرة الدفاعية العامة رغم ارتفاع قيمها، وهنا تعتبر هذه الزيادة كاستجابة فسيولوجية لعكس وتخفيف التوتر التأكسدي وتعويض النقص الحاصل في فاعليتها (Tosello *et al*., 2007)، كما أشار Malek وجماعته (2004) الى إن الاضطراب الذي يحدث في الجذور الحرة أثناء تفاوت درجات الحرارة يؤثر على الوظيفة الدفاعية لمضادات الأكسدة ومن ثمّ قد يحدث على الأمد الطويل تأقلم في ظل ظروف درجات الحرارة سواء كانت المرتفعة أو المنخفضة وقد يكون ذلك بسبب ارتفاع في النشاط الجيني.

اظهرت نتائج الدراسة التي قام بها Chandra و Aggarwal (2009) على نوع من الابقار الهجينة Crossbred dairy cows، حصول ارتفاع في مستوى إنزيمSuperoxide dismutase، خلال اشهر الصيف عنها في الشتاء، كذلك بين Lallawmkimi (2009) في دراسته على تاثير اختلاف الفصول على مستوى مضادات الاكسدة في صغار الجاموس من نوع Murrah buffaloes انه كان مستوى SOD مرتفعا خلال الصيف مقارنة بالشتاء، كذلك بينت دراسة Bernabucci وجماعته (2002) على الابقار كان مستوى SOD في البلازما مرتفعا خلال الصيف مقارنة بالشتاء.

كما جاء الارتفاع في مستوى انزيم CAT، الذي حصل في المجموعة التي عرضت للحرارة العالية، متفقاً مع النتيجة التي توصل إليها Maan و Kataria (2012) على حوالي 630 من الخراف Marwari sheep من كلا الجنسين في احدى المناطق القاحلة Arid التابعة لإقليم Rajasthanفي الهند للتعرف على تأثير الاجواء الحارة او الباردة على مستوى انزيم CAT

(Kataria *et al*., 2010)، ومن الجدير بالذكر ان نفس الدراسة السابقة قد اوضحت ان تركيز الانزيم في ذكور الحيوانات المختبرة كان اعلى مما في الاناث المرباة في الاجواء الحارة وعزو ذلك الى تأثير هرمون الاستروجين في الاناث والذي له خواص مضادة للأكسدة اقوى مقارنة بهرمون التستوستيرون في الذكور (Tudus, 2000) .

وفي دراسة اخرى هدفت لدراسة تأثير التعريض الحراري المبكر علي مظاهر الاكسدة بالخلية وبعض انزيمات القناة الهضمية والتغييرات الظاهرية في الاثني عشر وكذلك اداء الارانب النامية اثناء الموسم الحار بين Abdel-Kafy وجماعته (2008) حصول ارتفاع في مضادات الاكسدة الكلية في بلازما مجموعة التعريض الحراري المبكر علي مستوي الخلية مما قد يفسر جزئيا ارتفاع تركيز هذين الانزيمين. كما ان فعالية وتركيز انزيمي SOD و CAT تكون عالية في كريات الدم الحمر Erythrocytes اكثر مما في البلازما او المصل والتي تقوم بمنع اكسدة الهيموغلوبين و لذلك عند تحلل الدم Hemolysis جراء تأثير درجات الحرارة العالية على تركيب اغشية الكريات الحمر (Tavazzi *et al*., 2001) ترافق زيادة تركيز هذه الانزيمات في المصل نتيجة لتسربها الى خارج الكرية.

و الاختلاف بين تركيز هذين الانزيمين جراء التعرض للحرارة خلال اسابيع التجربة بالاختلاف بين الاسابيع الاولى والأسابيع الاخيرة المشار اليها، قد يعود الى خصوصية وظيفية كل من هذين الانزيمين، فانزيم Superoxide dismutase يمثل الخط الإنزيمي الدفاعي الأول ضد الإجهاد وتقتضي وظيفته تحويل ايون Superoxide anion هو أول جذر سام يتشكل انطلاقا من الاوكسجين الى بيروكسيد الهيدروجين H_20_2 بعملية الـDismutation ويحدث هذا التفاعل تلقائيا، ولا يحتاج إلى طاقة أو إلى عامل مساعد(Fukai & Ushio-Fukai, 2011).، في حين وظيفة انزيم Catalase هي هدم H_20_2 المتكون إلى ماء و أوكسجين (Odajima *et al*., 2010)، مما يشير الى زيادة انتاج جذر $O^{\cdot}_2$ مع زيادة مدة التعرض. و اوضح Madhuri وجماعته (2014) ان تعريض ذكور الجرذان السويسرية لحرارة بلغت 38 درجة مئوية مدة اربع ساعات ليوم واحد فقط قد ادى الى انخفاض فعالية انزيمي SOD و CAT.

اوضحت النتائج ان الحيوانات التي تناولت الثايموكوينون مع التعرض للحرارة قد ارتفع معدل تركيز انزيم CAT في مصولها معنوياً في اول اسبوعين مقارنة بالسيطرة، ليعود وينخفض في الاسابيع الاربعة الاخيرة الى معدلات قريبة من السيطرة كذلك لم توجد فروق معنوية بينها وبين مجاميع TQ، وهذه الاخيرة كانت معدلات CAT فيها مستقرة تقريبا طوال مدة التجربة ولم تشهد تغيرا يذكر مقارنة بمجاميع السيطرة، اما في انسجة الكبد، فقد ارتفع معنويا تركيز CAT

في مجموعة HS في الاسبوع الاول والثاني مقارنة بالسيطرة، ثم تنخفض خلال الاسبوع الثالث والرابع و الخامس ليكون مقاربا لسيطراتها ، وفي الاسبوع السادس كان تركيز الانزيم فيها منخفض معنوياً مقارنة مع السيطرة وباقي المجاميع لهذا الاسبوع و الاسابيع الاخرى. بالمقابل، عند المقارنة احصائيا بين السيطرة ومجاميع HSTQ وجد ارتفاعا معنويا في CAT للمجموعة انفة الذكر مقارنة مع سابقتها، كذلك لوحظ بان مجموعة HSTQ كانت معدلاتها اعلى معنويا من مجموعة HS خلال الاسابيع الاربعة الاخيرة. و لم تسجل فروق معنوية في معدل تركيز الانزيم في انسجة كبد مجموعة TQ مقارنة بالسيطرة خلال اول اسبوعين في حين في الاسابيع الباقية ارتفع معنويا مقارنة مع السيطرة و المجاميع HS.

اما بالنسبة لانزيم SOD، فقد لوحظ ان المعاملة بالثايموكوينون لوحده او بالتزامن مع الاجهاد الحراري قد تسبب في ارتفاع تركيزه في المصل مقارنة بمجاميع السيطرة منذ بداية التجربة وحتى الاسبوع الرابع منها، ليعود وينخفض قريبة من السيطرة خلال الاسبوع الخامس والسادس بالنسبة لمجموعة TQ، في حين لازالت معدلات الانزيم في مجاميع HSTQ اعلى من السيطرة وحيوانات TQ ، اما بالمقارنة مع مجموعة HS، فكانت معدلات مجموعة HSTQ اقل منها. اما في انسجة الكبد، فقد تسبب اعطاء الثايموكوينون للحيوانات المجهدة حراريا في حصول ارتفاع معنوي في تركيز SOD اذا ما قورنت بالسيطرة خلال الاسبوع الأول والثاني ، ثم ابتداء الانخفاض تدريجيا بعد الاسبوع الثاني ليصل قريبا من مجاميع السيطرة خلال الأسابيع الاربعة الاخيرة، و كانت معدلات تركيز الانزيم في كبد مجموعة TQ مقاربة مع مجاميع السيطرة طوال مدة التجربة .

على الرغم من أن مجموعة المعطيات الموضحة لفعل الثايموكوينون تؤكد أنه من مضادات ألاكسدة على نطاق واسع الا إن القليل فقط يعرف عن قدرته المضادة للأكسدة و كذا النشاط الحيوي على المستوى الخلوي في حالة الاجهاد الحراري، ولذا فلا ضير من الاستعانة بما اثبتته دراسات اخرى تناولت هذا الجانب من الثايموكوينون وتأثيره على انزيمي SOD و CAT كجزء من تأثيره على النظام المضاد للأكسدة بمختلف الحالات التي احدثت خللا بهذا النظام وحتى بتأثيرات اشد مما يمكن ان يؤثر الاجهاد الحراري عليه، فقد اوضح Mabrouk و Ben Cheikh (2016) ان الثايموكوينون لوحده لم يكن له تأثير على فعالية وتراكيز مضادات الاكسدة CAT و SOD و GSH و GSH-px و GSH-r في الكلى ربما بسبب عدم وجود المادة الاساس التي يعمل عليها الانزيم اذ ان الثايموكوينون يعمل ككاسح للجذور الحرة وبالتالي يقل تركيزها فلا داعي لعمل الانزيم في حين اثبتت ان اعطاء الثايموكوينون الى ذكور الجرذان المعاملة بخلات الرصاص Lead acetate كان له الاثر الكبير في رفع تراكيز وفعالية هذه الانزيمات المشار اليها وبشكل واضح مقارنة بالحيوانات المعاملة بالرصاص فقط.

كما بينت دراسة اخرى اجراها Gore وجماعته (2016) على الفئران المعاملة بعقار Cyclophosphamide (CYP) المستخدم في المعالجة الكيميائية Chemotherapy لبعض انواع السرطان مثل Granular lymphocyte leukemia و Metastatic breast cancer والذي يسبب حالة تدعى التهاب المثانة النزفي Hemorrhagic cystitis، ان حقن الفئران بالثايموكوينون بتراكيز 5 او 10 او 20 ملغم/كغم مرتين يوميا لمدة 3 ايام قبل وبعد المعاملة بالعقار المذكور قد ساهمت بشكل فعال في زيادة CAT و SOD و GSH في المثانة. وكذلك بين Desai وجماعته (2015) في دراستهم على الجرذان المصابة بالسكري Diabetic albino rats بواسطة Sterptozotocine ان المعاملة بالثايموكوينون رفعت من مستوى انزيمSOD في الجرذان المصابة مقارنة بالمجموعة المصابة بالسكري وغير المعاملة بالثايموكوينون.

و اوضحت دراسات عدة ان قابلية الثايموكوينون على تثبيط بعض العوامل مثل Necrosis factor-κB (Nf-κB) وCyclooxygenase-2(COX-2) سواء على مستوى الفعالية او حتى على المستوى الجزيئي والتدخل في تعديل مسارات إشارة أخرى يسهم في رفع الفعل الكابح Suppress لهذه المركبات على تكوين مضادات الاكسدة عموما وبالتالي زيادة فعاليتها من جهة فضلا عن تزايد وتيرة تخليقها في الانسجة (Ragheb *et al*., 2009;El-Sheikh *et al*., 2015).

ويمكن الاستفادة مما اشارت اليه دراسة Saeid وجماعته (2013) في تأثير الثايموكوينون على انزيمي SOD و CAT عند إضافة بذور الحبة السوداء في عليقة فروج اللحم طول فترة التربية البالغة 6 أسابيع أدت إلى زيادة في استطالة زغابات الأمعاء فضلا عن زيادة كفاءةالبكتريا النافعة في تحسين عملية الهضم والامتصاص وهذا يؤدي إلى زيادة العناصر المعدنية الضرورية لعمل الانزيمات ومنها مضادات الاكسدة الانزيمية.

و قد يعود السبب في تأثير الثايموكوينون على انزيمي SOD و CAT إلى تأثير المركب في نشاط الغدة الدرقية، اذ اوضحت دراسات عدة منها ما قام به Ayuob وجماعته (2016) في دراسة اجروها على الجرذان التي حرض فيها القصور الدرقي Hypothyroidism بواسطة مركب(PTU) Propylthiouracil، وكذلك بينت دراسة Gullu و Avci (2013) على الجرذان التيغذيت على عليقة غنية بالدهون Fat rich diet ان للثايموكوينون القدرة على تحفيز وزيادة فاعلية الغدة الدرقية وزيادة انتاجها من هرموني T3و T4 ونظرا لما لهذين الهرمونين من فعالية عالية في زيادة سرعة التفاعلات الكيمائية والتأثير على نشاط الانزيمات بما يناسب هذا التحفيز (Bullock, 2001) وهذا يعزز مستوى البروتينات الخلوية ويحفظ فعالياتها الحيوية لذا يمكن ان ينعكس هذا الامر بدوره على نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة.

(2.3.5): فعالية GSH-px و GSH-r و GSH-t في المصل وأنسجة الكبد
Serum & Liver GSH –px, GSH-r, GST Activity

يعد قياس مستويات GSH-px و GSH-r و GSH-t واحداً من المؤشرات التي توضح التغيرات التي تطرأ على جهد الاكسدة في الجسم اذ تلعب دورا مهما في ثبات الجلوتاثيون وضمان التوازن في حلقة أكسدة–إرجاع Redox cycle ، وأحيانا يشار اليهم معا بالنظام الجلوتاثيوني Glutathione system (Morris *et al*., 2014)، نظرا الى علاقتهم الوظيفية بالجلوتاثيون اذ يقوم إنزيم GSH-r بإعادة تجديد GSH من خلال اختزال الشكل المؤكسد GSSG إلى GSH مرة اخرى ويتطلب هذا التفاعل عامل مساعد هو NADPH، في حين يقوم GSH–px بالعكس، اما انزيمGSH-t فيعد هذا الانزيم من الانزيمات متعددة الوظائف من خلال أزالة المتأيضات السمية و المركبات الغريبة في الكبد بواسطة ربط هذه المركبات مع GSH ثم طرحه مع العصارة الصفراوية (Kumar *et al*., 2011).

أظهرت النتائج إنخفاضا معنويا في فعالية انزيم GSH-px في مصل دم مجموعتي HS و HSTQ مقارنة مع السيطرة خلال الأسابيع الأولى من التجربة، إلا أنها عادت مقاربة للسيطرة في الأسبوع السادس. أما في انسجة الكبد، فقد اظهرت فعالية الأنزيم لمجموعة HS تقاربا مع المجموعات الأخرى خلال الأسبوعين الأولين ثم ارتفعت معنويا عنها في الأسابيع الأربعة الأخيرة في حين كانت مستويات مجموعة HSTQ قريبة من مجموعة السيطرة خلال اسابيع التجربة. أظهر معدل فعالية انزيم GSH-r ارتفاعاً معنوياً في مصل دم وأكباد مجموعات المعاملة الثلاث خلال الاسابيع الخمسة الأولى من التجربة مقارنة مع السيطرة، إلا أن الأسبوع السادس شهد تقارب معدلي السيطرة و HS في حين بقي معدلا المجموعتين HSTQ و TQ أعلى منهما. وشهدت فعالية انزيم GSH-t في مصل دم ذكور مجموعتي HS و HSTQ إرتفاعا معنويا طيلة أسابيع الدراسة بالمقارنة مع مجموعتي السيطرة و TQ، في حين كانت فعالية الأنزيم في أنسجة الأكباد متقاربة بين المجموعات طيلة مدة التجربة.

عند النظر إلى نتائج الدراسة المشار اليها في اعلاه ومتابعة التغيرات التي شهدتها فعالية هذه الانزيمات بتأثير الاجهاد الحراري والتي كان من أبرزها التغير الذي شهدته فعاليات هذه الانزيمات ما بين الاسابيع الاولى والأخيرة من التجربة، وكما اشرنا سابقا الى العلاقة التي تربط بين فعالية كل من انزيمي GSH–px و GSH-r وتركيز الجلوتاثيون، لذا وبالنظر الى تأثير الاجهاد الحراري على تركيز الجلوتاثيون، والذي سنتناوله لاحقا، فقد جاءت هذه النتائج متلائمة مع التغيرات التي طرأت على تركيز الجلوتاثيون الى حد ما، وباعتبار هذه الانزيمات من دون شك من

أهم أنظمة الحماية وجزء من النظام المضاد للأكسدة من جهة وان هذه الإنزيمات لا تهدم فقط الـ H_2O_2 لكن أيضا البيروكسيدات العضوية السامة المتشكلة خلال أكسدة الأحماض الدهنية أو الكوليستيرول، فضلا عن دورها كجزء من منظومة التحسس الخلوي للإجهاد التأكسدي وخاصة لحالة المركبات البروتينية (Al-Dalaen &Al-Qtaitat, 2014)، لذا فقد ركزت عليها دراسات عدة ومنها الدراسات ذات العلاقة بموضوع الدراسة والتي تناولت الاجهاد الحراري إلا ان نتائج هذه الدراسات تباينت تبعا لتباين نوع التعرض ان كان مزمن او حاد فضلا عن تأثير عوامل اخرى، فقد بينت دراسة Maseko وجماعته (2014) على الجرذان المعرضة لدرجة حرارة 40 مْ لمدة 90 دقيقة يعمل على زيادة التعبير الجيني لانزيم GSH–px فضلا عن ارتفاع فعاليته عزوه الى محاولة الجسم للسيطرة على التوليد المفاجيء والسريع في الجذور الحرة جراء ارتفاع حرارة الجسم Hyperthermia. في حين لاحظ Ando وجماعته (1997) ان الجرذان المسنة والتي تتراوح اعمارها بين 12-17 شهر والمعرضة لدرجة 30-35 مْ لمدة 3–7 ايام قد انخفضت لديها فعالية الانزيم في الكبد مقارنة بالجرذان الفتية التي لها من العمر 6–7 أسابيع في حين ان الجرذان المسنة تحت الظروف الطبيعية ترتفع فيها فعالية الانزيم مقارنة بالفتية غير المجهدة، ومن هذا نرى ان العمر يعد من العوامل التي تؤثر على استجابة جسم الحيوان في مواجهة الاضطرابات المختلفة ومنها الاجهاد الحراري (Fulda *et al*., 2010).

اما بالنسبة لفعالية انزيم GSH-r وتأثرها بالإجهاد الحراري، فقد جاءت النتائج متوافقة مع ما أشار Sujatha وجماعته (2010) في دراستهم للتحري عن دور بعض الاضافات الغذائية وفيتامين C على الدجاج خلال الاشهر الحارة من السنة، ان فعالية GSH-r قد انخفضت بشكل تدريجي ابتداءاً من الاسبوع الاول الى الثالث الى الاسبوع السادس والتي استغرقتها التجربة في المجاميع غير المعاملة مقارنة بالمعاملة بالإضافات الغذائية. في حين بين Kataria وجماعته (2013) في دراستهم على العجول من نوع يسمى Rathi ان فعالية انزيمGSH-r كانت اعلى في العجول خلال الموسم الحار الجاف عنه في الموسم المعتدل. ويمكن تفسير هذا التباين في التأثر بارتفاع درجة الحرارة الى كفاءة التنظيم الحراري والقدرة على التأقلم باختلاف انواع الحيوانات وفصائلها.

كذلك قد تكون الزيادة في فعالية انزيم GSH-t في مصل دم ذكور الجرذان في المجاميع المعرضة للاجهاد الحراري ناتج بشكل غير مباشر عن الضرر الحاصل في نسيج الكبد Hepatocellular damage (Mostafa *et al*., 2007;Easa & Hekal, 2015)، اذ يتميز هذا الانزيم بحجمه الجزيئي الصغير مما يمكنه من الانتقال من الكبد الى المصل وبالتالي قلة تركيزه في الكبد وارتفاعه في مجرى الدم لذا عده البعض من الباحثين كأحد مؤشرات اختلال وظائف الكبد مثلALT و AST (Koo *et al*., 2000).

اما فيما يتعلق بالثايموكوينون وتأثيره على فعالية الانزيمات الثلاث وعند اخذ نظرة عامة على النتائج التي تتعلق بالمجاميع المعاملة بالثايموكوينون فقط مع مراعاة الاختلافات بين المجاميع خلال اسابيع التجربة، فنجد ان معدلات فعالياتها كانت مستقرة الى حد ما طوال اسابيع التجربة فكانت مقاربة او تتفوق على السيطرة والمجاميع المعرضة للإجهاد الحراري فقط خصوصا في الاسابيع الأخيرة، وهذه النتائج تتوافق مع نتائج دراسات اخرى تناولت تأثير الثايموكوينون على فعالية هذه الانزيمات في حالات مختلفة منها التسمم النفروني الناتج من التعرض لمادة خلات الرصاص (Mabrouk & Ben Cheikh, 2016)، او الجرذان المصابة بداء السكري المحرض بالستربتوزوتوسين Streptozotocin (Hamdy & Taha, 2009).

كما لا يؤثر الثايموكوينون على فعالية انزيمات GSH–px وGSH-r و GSH-t فقط وإنما حتى على تعبيرها الجيني في الانسجة أيضا، فقد بينت دراسة Sayed-Ahmed وجماعته (2010) على ذكور الجرذان المصابة بسرطان الكبد المستحدث بواسطة Diethylnitrosamine، ان المجاميع المعاملة بالثايموكوينون قد تفوق فيها معنويا مستويات التعبير الجيني GSH- px و GSH-t في انسجة الكبد مقارنة بالمجاميع المعاملة بالعقار المذكور والسيطرة.

ونلاحظ ان المجاميع التي جرعت بالثايموكوينون بالتزامن مع الاجهاد الحراري كانت فعالية الانزيمات فيها في احيان كثيرة قد تفوقت على المجاميع الأخرى وهذا الامر ليس بمستغرب اذا ما عرفنا ان الثايموكوينون يعد واحدا من الجزيئات التي يمكن أن تسلك مسلك مختلف من اجل تنظيم الحالات الإجهاد التأكسدي عنها في الحالة الطبيعية غير المواجهة لأي خلل او اضطراب (Mansour *et al*., 2002).

إن واحدة من أهم الفعاليات التي يؤديها الثايموكوينون بايولوجيا هي قدرته الوقائية الكامنة من المركبات الكيميائية السامة،اي يمكن ان يطلق عليه Prophylactic agent، ونظرا لكون الكبد العضو الرئيس المستهدف تقريبا بجميع المواد الكيميائية السامة والمسؤول عن ايض العقاقير، لذا اجريت العديد من الدراسات للتعرف على انعكاس استخدام الثايموكوينون على هذا الجانب، واحدى انعكاسات هذه الفعالية للثايموكوينون تأتي من خلال التأثير على الانزيمات التي تشارك في مسار ايض والتخلص من هذه المركبات، واحد هذه الانزيمات هو GSH-t، اذ بين كل من Nagi و Almakki (2009) و Badary وGamal El-Din (2001) ان الثايموكوينون يعد واحدا من افضل المركبات الطبيعية التي تدعم من نشاط الانزيمات المسئولة عن ايض وازالة سمية العديد من الكيمياويات خاصة ذات التأثير المسرطن، ويأتي في طليعة هذه الانزيمات انزيم GSH-t، و في دراسة اجراها Alharthi و Elsheikh (2010) في الفئران لتقصي الاثار التي يمكن ان يحدثها حقن الثايموكوينون على نشاط انزيمات ايض الدواء في الكلى بعد احداث السمية بواسطة دواء

الجنتمايسين Gentamicin، بينت نتائجها ان حقن الفئران بجرعة 10ملغم/كغم من وزن الجسم يوميا لمدة عشرة ايام متتالية لم تسبب اي تغيرات في نشاط GSH-t في الجرذان المعاملة بالدواء مقارنة بالسيطرة.

(3.3.5): تركيز GSH في المصل وأنسجة الكبد Serum & Liver GSH Concentration

يعرف الجلوثاتيون بأنه اكثر المركبات الغنية بالكبريت انتشاراً في الوسط داخل خلوي، بمختلف الكائنات الحية، و يتشكل من ثلاث أحماض أمينية هي cysteine و glutamate و glycine ، يسمى المشتق ثنائي الكبريت للجلوتاثيون والناتج من أكسدة مجموعة الثيولSH بالجلوثاتيون المؤكسد ويرمز له GSSG، الا ان غالبية الجلوثاتيون الموجودة في الخلية الحية يكون بشكله المختزل (Maher, 2005).

يعد الجلوتاثيون من ابرز مضادات الأكسدة التي استفاضت فيها الدراسات لما له من ادوار حيوية في مختلف الكائنات الحية، ومع ذلك الكثير من هذه الدراسات تباينت نتائجها فيما يختص مضاد الاكسدة هذا وخاصة الدراسات ذات الصلة بالإجهاد الحراري، فقد بينت دراسة Kumar وجماعته (2011) ارتفاع تركيز الجلوتاثيون في مصل دم الجاموس Buffaloes المربى في الاجواء الحارة الجافة في الهند، وفي دراسة اخرى اجراها Ramnath وجماعته (2008) على 48 من الديكة، وجدوا ان تعريض هذه الحيوانات لدرجة حرارة بلغت 40 درجة مئوية لأربعة ساعات يوميا لمدة 10 ايام، لم يوثر على تركيز الجلوتاثيون في المصل عند المقارنة بين اليوم الخامس والعاشر من التعرض مع الحيوانات غير المعرضة للحرارة العالية، في حين نجد العكس في الكبد اذ سبب التعرض للحرارة العالية في زيادة تركيز الجلوتاثيون في الكبد وبشكل واضح مقارنة بالسيطرة.

وقد وجد Morrison وجماعته (2005) انه في بداية تعرض ذكور جرذان F344 للحرارة العالية فان فعالية احد الانزيمات المهمة في مسار بناء الجلوتاثيون GSH synthesis في الكبد المتمثل بانزيم Glutamate cysteine ligase (GCL) او ما يعرف باسم Glutamylcysteine synthetase (GCS) سوف تزداد نتيجة لزيادة تركيز الحامض الاميني Cysteine الحر في الكبد الامر الذي يسبب ارتفاع وتيرة تصنيع الجلوتاثيون الى حد ما مع بداية التعرض، إلا انه مع استمرار التعرض للحرارة يحصل العكس سيما مع انخفاض في NADPH الذي يعمل مع انزيم GSH-r على اعادة اختزال الجلوتاثيون المؤكسد GSSG الى الجلوتاثيون المختزلGSH، كذلك اظهرت دراسة اخرى ان تعرض ذكور الجرذان للحرارة العالية قد يضعف من فعالية GSH-px وهذا

الانزيم يحول الجلوتاثيون المختزل الى الجلوتاثيون المؤكسد مما يؤدي الى ارتفاع تركيز GSH (Madhuri *et al*., 2014).

وفي دراسة اجراها Osorio وجماعته (2003) على اناث الجرذان الحوامل والتي عرضت لدرجات حرارة تتراوح بين (28 و30 و 35) م° أظهرت النتائج أنخفاض تركيز الجلوتاثيون في المصل في الاناث المعرضة لدرجة حرارة 28 م° وارتفع تركيزه كلما زادت درجة الحرارة خصوصا في الاناث التي تم تطبيق نظام من التدريب البدني عليها Physical training وعزو هذه النتائج الى ان التدريب قد اسهم بشكل ما في تفعيل دور النظام المضاد للأكسدة مقارنة بالإناث الحوامل غير المتدربة.

وتشير بعض الدراسات منها دراسةZhang وجماعته (2003) و Zuo وجماعته (2000) الى انه ليس بالضرورة ان ينخفض الجلوتاثيون في بداية التعرض للاجهاد الحراري نظرا لعدم كون بيروكسيد الهيديروجين H_2O_2 هو الجذر الحر الاول المتكون نتيجة التعرض للحرارة العالية بل جذر O_2^-.

يحاول جسم الكائن الحي الحفاظ على محتوى مستقر من منه بما يسمى Glutathione homeostasis، ويعد الكبد العضو الذي يمتلك المخزون الرئيسي من الجلوتاثيون ويلعب دورا اساسيا في الحفاظ على التوازن في تركيزه في الدورة الدموية Glutathione homeostasis لذا فعندما يحصل انخفاض في تركيزه في مجرى الدم تحاول الكبد تعويض هذا النقص من خلال تسهيل مروره خلال غشاء الخلايا الكبدية عن طريق مستقبلات الفا α-receptor وهذه الالية تتم تحت سيطرة الهرمونات التي تزادا اثناء الاجهاد Stress hormones وخصوصا الكورتيزول و الادرينالين (Song *et al*., 2000; Mahmoud &Edens, 2003)، و عليه يمكن القول ان تركيز الجلوتاثيون يعتمد بشكل او اخر على الحالة الوظيفية والتركيبية للخلايا الكبدية.

من جانب اخر لابد ان نجذب الانتباه الى نقطة مهمة وهي ان الزيادة الظاهرة في تركيز الجلوتاثيون في الحيوانات المعرضة للإجهاد الحراري في الاسابيع الاولى من الدراسة قد تكون غير حقيقة في الواقع نظرا الى انه لم يتم قياس الشكل المؤكسد من الجلوتاثيون والذي قد يكون بتراكيز اعلى من الشكل المختزل مما يحدث اضطرابا في نسبة GSSG/GSH اذ يؤدي التغاير في هذه النسبة خاصة في الأعضاء ذات الدور الدفاعي مثل الكبد إلى اضطرابات خطيرة لذا بعض الدراسات حاليا تقيس ما يعرف بالجلوتاثيون الكلي Total glutathione (TGSH) الذي يشمل كل من الجلوتاثيون المؤكسد والمختزل (Pastore *et al*., 2003).

وفي الجانب الاخر، بينت دراسات اخرى ان التعرض للحرارة العالية يؤثر على محتوى مصل الدم والانسجة من الجلوتاثيون بخلاف ما اشرنا اليه سابقا، فقد بينت دراسة

Dehghan وجماعته (2010) انخفاض تركيز الجلوتاثيون المختزل في مصل دم الكباش Rams خلال الموسم الحار من السنة في منطقة نوراباد في ايران، في حين اظهرت دراسة Mahmoud و Edens (2003) ان تركيز الجلوتاثيون في المصل لم يتأثر، في حين حصل انخفاض معنوي في تركيزه في كبد الدجاج المعرض للحرارة العالية بعمر 4 اسابيع، كذلك بين Lakritz وجماعته (2002) انخفاض تركيز الجلوتاثيون في الابقار المعرضة لدرجة حرارة تراوحت بين 28–33 درجة مئوية لمدة اربع ساعات طوال اسبوعين وعزوه بشكل رئيسي الى فقدان الشهية وعدم تناول كمية كافية من الغذاء كآلية لتقليل الحرارة الناتجة من الهضم.

اما فيما يخص الثايموكوينون، فقد تواترت الدراسات التي تناولت تأثيره على الجلوتاثيون، فلا تكاد تخلو دراسة تتناول الثايموكوينون وفعاليته المضادة للأكسدة إلا واختبرت تأثيره على الجلوتاثيون، خاصة في الدراسات ذات العلاقة بالمركبات او العقاقير التي لها تأثيرات سمية على الجسم، منها دراسة Mabrouk وBen Cheikh (2016) والتي اوضحت ان اعطاء الجرذان تركيز من الثايموكوينون بلغ 5 ملغم/ كغم يوميا مع خلات الرصاص لمدة 5 اسابيع متواصلة ساهم في رفع تركيز الجلوتاثيون في كلى الجرذان بنسبة 55.16% مقارنة بالمجموعة التي تناولت خلات الرصاص فقط. وفي دراسة اخرى Aycan وجماعته(2014) حول السمية الكبدية لعقار Acetaminophen (APAP) المستخدم كمسكن للالام Analgesic وخافض للحرارة Antipyretic اظهرت هذه الدراسة ان اعطاء الثايموكوينون عن طريق الفم للجرذان بشكل ثلاث جرعات كل منها بلغ 5 ملغم/كغم كل 6 ساعات اي بما مجموعه 15 ملغم/كغم في 24 ساعة قد سبب انخفاض معنوي في تركيز الشكل المؤكسد من الجلوتاثين GSSG جنبا الى جنب انخفاض فعالية GSH-px بما معناه ارتفاع في تركيز الجلوتاثيون المختزل في المصل مقارنة بالجرذان المعاملة بالعقار فقط. كذلك بين Ojha وجماعته (2015) في دراستهم على الجرذان المعاملة بمركب Isoproterenol- (ISP) وهو شكل مصنع من الكاتيكولامينات Synthetic catecholamine ويتنافس على مستقبلات بيتا الادرينالية β-adrenergic agonist والذي يسبب Myocardial ischemic injury ان المجاميع المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 20 ملغم/كغم فمويا لمدة 21 يوم لوحده او بالتزامن مع ISP قد رفع من تركيز الجلوتاثيون في القلب بشكل واضح مقارنة بالمجاميع المعاملة بـISP لوحده والسيطرة. وفي دراسة اخرى اجراها Randhawa وجماعته (2013) على المركب ISP ايضا لوحظ ان استعمال الثايموكوينون بثلاث تراكيز متدرجة (12.5 و25 و50) ملغم/كغم لمدة سبعة ايام قبل حقن الجرذان بـ125 ملغم/كغم من المركب ليومين متتاليين قد اسهم في رفع نسبة الجلوتاثيون المختزل الى المؤكسد في القلب Myocardial GSH/GSSG ratio.

يتميز الثايموكوينون بقدرته على العمل وفق اليات متعددة في تأثيراته عموما، وتأثيره على تركيز الجلوتاثيون خاصة، إذ قد يرجع السبب إلى تأثيره المباشر على الجذور الحرة والمركبات الناتجة عن أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة من خلال عمله كمضاد للأكسدة خارجي المصدر Exogenous antioxidant ، لا سيما وكما اشرنا سابقا ان الثايموكوينون يختزل داخل الجسم الى Dihydrothymoquinone الذي يمتلك خواص مضادة للأكسدة اقوى مما للمركب الاصلي(Nagi & Almakki, 2009)، او من خلال دعم وتنشيط مضادات الاكسدة الداخلية Endogenous antioxidant وحتى زيادة تعبيرهم الجيني (Ismail *et al*., 2010) وبالتالي تزايد معدلات بنائهم وخصوصا زيادة نشاط والتعبير الجيني لانزيم GSH-r الذي يحفز تحويل GSSG الى GSH مما يزيد من تركيزه.

وقد تأتي تأثيرات الثايموكوينون هذه الى جوانب غير مباشرة، فقد تكون انعكاساً للتحسن في معايير صحة الجسم منها زيادة وزن الجسم ومعدل تناول الغذاء ومعدل كفاءة التحويل الغذائي (Rastad *et al*., 2015) ، فضلا عن تحسين عملية الهضم والامتصاص (Saeid *et al*., 2013) وهذا يؤدي إلى توفير الاحماض الامينية الضرورية لبناء الجلوتاثيون.

وربما يعود هذا التاثير إلى قدرة الثايموكوينون على على تنشيط افراز الأنسولين (Al-Tameemi, 2014) وخفض كلوكوز الدم وهذا التأثير على ايض الكاربوهيدرات يتضمن تنشيط تحويله السكر الخماسي Pentose shunt التي تعد المجهز الرئيس للمرافق الأنزيمي NADPH اللازم لإعادة اختزال الجلوتاثيون المؤكسد (Chandrasekaran & Leelavinothan, 2009).

(4-5) الدراسة الجزيئية Molecular study

اتجهت العديد من الدراسات وخصوصا الحديثة منها الى الكشف عن الجوانب الجزيئية التي يسببها مختلف العوامل المؤثرة على الكائن الحي، لاسيما مع تطور التقنيات التي تسهل هذا الامر مما يقلل من الاحتمالات التي يضعها الباحثون في تفسير سبب الاضطرابات التي تحصل وما ينتج عنه من وضع حلول او علاجات او طرق وقاية اكثر كفاءة للتخلص من او على الاقل للتقليل من الاثار الناجمة عن التعرض لهذه العوامل ومنها الحرارة وهذا ما ينعكس خصوصا على المستوى الاقتصادي اذ يتم حاليا تربية سلالات الحيوانات التي تتميز بقدرة اكبر في مقاومة التطرف في درجة الحرارة Thermotolerance مقارنة بباقي السلالات، اذ إن تحديد الجينات التي يُعَبِّرُها Gene expression الحيوان في أثناء الاستجابة للعوامل البيئية المجهِدة سوف تثرينا بالمعلومات التي تعمل على زيادة وعينا للكيفية التي يقوم بها الحيوان بعمليات الاستجابة واستنفار

القدرات الوراثية الكامنة للحيلولة دون انهيار النظم الحيوية الفسيولوجية والذي يمثل المعنى الحقيقي لمفهوم التحدي للظروف البيئية الضارة ومن اكثرها تأثيراً الحرارة (Bhusari *et al*., 2008).

ونتيجة للدراسات الجزيئية يتم حاليا التوصية باستعمال مواد غالبا ما تكون ذات اصل نباتي Phytochemicals، ثبت ان لها تأثيرها ايجابيا وذو جوانب متعددة منها المساهمة في استقرار المحتوى الوراثي Genome stability بشكل مباشر او غير مباشر فضلا عن قدرتها على تعديل الإضطراب او التغاير الجيني الذي تحدث بحالات عدة ومنها الاجهاد (Harvey *et al*., 2015).

(5-4-1): الكمية النسبية لتعبير جين SOD و CAT في انسجة الكبد
Relative quantification of SOD and CAT genes expression

اظهرت النتائج حصول زيادة معنوية في مستوى تعبير جين CAT في مجموعة HS و HSTQ خلال الاسبوع الاول والثاني مقارنة بالسيطرة، اما في الاسابيع اللاحقة فقد حصل انخفاض في مستوى تعبير الجين في مجموعة HS مقارنة بالسيطرة ليصل هذا الانخفاض الى اشده ويكون معنويا في الاسبوع الخامس والسادس. واستمرت هذه الزيادة بمستويات ثابتة تقريبا خلال كل التجربة في مجموعة HSTQ، وكان مستوى تعبير الجين فيها اقل من مجموعة HS في الاسبوع الاول ثم شهد ارتفاعا منذ الاسبوع الثاني ليزداد الفرق معنويا خلال الثالث والرابع ويكون الفرق شاسعا ومعنويا في الخامس والسادس وهذا الامر مقارب في مجموعة TQ، اذ كان مقاربا للسيطرة في الاسبوع الاول بعدها بدأ في الزيادة المعنوية منذ الاسبوع الثاني لتستمر الى اخر التجربة، اذ كان متقاربا في الاسابيع الاربعة الاخيرة مقارنة مع الاسبوع الاول .

اما بالنسبة لمستوى تعبير جين SOD فقد اظهرت النتائج حصول زيادة معنوية في مجموعة HS و HSTQ وكذلك TQ مقارنة بمجاميع السيطرة خلال الاسابيع الثلاثة الاولى كما حصلت زيادة معنوية في مجموعة HS خلال الاسابيع الثلاثة الاخيرة مقارنة بالسيطرة لهذه الاسابيع ومع نفس المجاميع للاسابيع الثلاثة الاولى. وشهدت مجموعة HSTQ زيادة معنوية في الاسبوع الرابع مقارنة بباقي المجاميع ليعود وينخفض مستواه فيها قريبا للسيطرة ومجموعة TQ خلال الاسبوعين الاخيرين. وعانى مستوى تعبير جين SOD في مجموعة TQ وابتداءا من الاسبوع الثالث انخفاضاً معنوياً بالمقارنة مع مجموعتي HS و HSTQ .

هنالك مجموعة من الجينات في جميع الخلايا الطبيعية يتم التعبير عنها بشكل مستمر ودوري اعتمادا على ظروف تلك الخلايا فتصبح نشيطة في مراحل مختلفة، تدعى الجينات الوظيفية Functional genes اذ يتم فك شفرة المعلومات التي يحتويها الجين بواسطة عمليتي النسخ والترجمة، وذلك لإنتاج البروتينات، والجينات التي تشفر لبناء الانزيمات المضادة للأكسدة تتبع هذا

النوع من الجينات، اذ تتواجد ضمن تركيب الدنا DNA structure في مجموعة من الجينات يطلق عليها مجتمعة بـ Antioxidant response elements (AREs) وهي عناصر معززة Enhancer element (Mates, 2000) وتمثل تسلسل او تعاقب من الدنا DNA sequences ترتبط به عوامل الاستنساخ Transcription factors وغيرها من الوسائط التي تؤثر على التعبير الجيني لمضادات الاكسدة، ومن هذه العوامل Activator protein-1 (AP-1) وهو معقد مكون من اثنين من الجزيئات المتماثلة Homodimeric (Jun/Jun) او المختلفة Heterodimeric (Jun/Fos) ، خلال الظروف الطبيعية تنتج الخلية مستوى قليل من Fos و Jun ، إلا انه في حالة حدوث اضطراب في توازن Antioxidant/Oxidant يزداد انتاج هذه البروتينات وترتبط لتكون AP-1 الذي ينتقل الى النواة ويرتبط بتسلسلات AREs المذكورة انفا مما يؤدي الى انتاج مضادات الاكسدة التي تشفرها هذه الجينات (Sadi & Sadi , 2010).

وفي دراسة اجراها Rimoldi وجماعته (2015) على سلالتين من الفروج الهجين Broiler hybrid strains لها من العمر 4–8 اسابيع والتي تم تربيتها تحت درجة حرارة بلغت 34 °C لمدة اربعة اسابيع بعدها تم الكشف عن مجموعة من الجينات ذات بالإجهاد ضمت Glucocorticoid receptor NR3C1 و Caspase 6 CASP6 وSuperoxide dismutase SOD و Catalase CAT و Heat shock protein 70 HSP70 و HSP90 وأفضت نتائج الدراسة الى ان الاجهاد الحراري سبب زيادة تنظيم up regulating في التعبير الجيني لإنزيم CAT يقابله انخفاض تنظيم downregulating في التعبير الجيني لإنزيم CASP6 في حين لم يظهر من الدراسة تأثر كل من NR3C1mRNA و SOD و HSPs بالإجهاد الحراري.

واشار Montilla وجماعته (2014) الى زيادة التعبير الجيني لانزيمات SOD و CAT في عضلات اناث الخنازير Female pigs المعرضة للاجهاد الحراري، كون الاجهاد الحراري يحدث خللا في توازن الكالسيوم والمخزون في العادة في الشبكة الساركوبلازمية وبسبب الاجهاد الحراري يتعطل عمل انزيم Ca-ATPase في غشاء الشبكة مما يسبب تسرب ايونات الكالسيوم داخل الخلية مما يخفض من جهد Potential غشاء المايتوكندريا وبالتالي زيادة انتاج الجذور الحرة و بالتالي يستدعي الحاجة الى مضادات الاكسدة.

وفي دراسة اجراها Zeng وجماعته (2013) على سلالتين من البط Duckes يتم تربيتهم في الصين هما Muscovy و Pekin للتحري على البروتينات التي يتم التعبير عنها في الاجواء الحارة والفرق بين السلالتين في التحمل الحراري، بينت نتائج الدراسة ان اول البروتينات التي يتم التعبير عنها هي البروتينات التي لها علاقة بربط الايونات الانتقالية Transition ion metal binding

مثل الفريتين، تليها مباشرة البروتينات ذات الفعالية المضادة للأكسدة Antioxidant activity في اعضاء الدماغ ثم الكبد مباشرة.

في حين ان دراسات اخرى اجراها Yamashita وجماعته (1997) على الخلايا العضلية القلبية للجرذان Rat cardiac myocytes وYamashita وجماعته (1998) على الجرذان في حالة ischemia/reperfusion injury اظهرت ان قد ازداد فيها مستوى SOD mRNA فضلا عن فعاليته بحوالي 1.8 ضعف بدرجة حرارة (42 °C). كذلك بين Kim وجماعته(2015) حصول زيادة في SOD mRNA في انسجة كبد الجرذان المعرضة للحرارة.

وهنالك عدة عوامل يمكن ان تؤثر على مستوى التعبير الجيني لهذه الانزيمات، فقد اشارت دراسة الى ان عمر الحيوان المتعرض يمكن ان يؤثر على التعبير الجيني لهذه الانزيمات خلال الاجهاد الحراري فقد بين Akbarian وجماعته (2014) في دراستهم على الدجاج، حصول ارتفاع معنوي في CAT mRNA في كبد وقلب الدجاج المعرض للحرارة بعمر 42 يوم مقارنة بعمر 31 يوم في حين لم يتأثر مستوى SOD mRNA فيها بينما في الكلى فكان مستوى SOD mRNA اعلى بعمر 31 يوم عنه في الدجاج المعرض للحرارة بعمر 42 يوم. في حين بينت دراسة Zhang وجماعته (2002) انه في الجرذان الفتية كان مستوى التعبير الجيني لكل من SOD و CAT في الكبد مقارنة بالجرذان المسنة بعد التعرض للحرارة العالية.

اما فيما يخص الثايموكوينون ، فقد اشارت العديد من الدراسات انه يعد واحداً من المركبات الطبيعية القلائل والتي تمتلك خاصية التأثير على تعبير الجينات المسؤولة عن بناء مضادات الاكسدة الداخلية فضلا عن نشاطها المضاد للأكسدة الخاص، فقد اوضح Ismail وجماعته (2016) في دراستهم التي تم اجرائها على الخلايا العصبية Human neuronal cells المعزولة من البشر والمعاملة ببيروكسيد الهيدروجين، ان استعمال الثايموكوينون كان له وجهين من التأثير في الجانب الجزيئي، الوجه الاول متمثل بزيادة التعبير الجيني لإنزيمي SOD وCAT والوجه الاخر يتمثل في التأثير على عوامل نقل الاشارة Signal transduction مثل MAPK وAkt و التي يودي تنشيطها الى زيادة فرص نجاة الخلايا من خلال تنظيم عملية التمايز والنمو وتثبيط موت الخلايا المبرمج.

وفي دراسة اخرى، اشار Ismail وجماعته (2010) ان المعاملة بالثايموكوينون بتركيز 20 و 100 ملغم/كغم لمدة 8 اسابيع قد تسبب في زيادة التعبير الجيني لإنزيمي SOD وCAT، والمرافق لارتفاع تركيزهما ايضا، في انسجة الكبد في الجرذان المصابة بفرط الدهون تجريبيا Hypercholesterolemic. كذلك بين Sayed-Ahmed وجماعته (2010) في دراستهم حصول ارتفاع في التعبير الجيني mRNA expression لإنزيم CAT ومجموعة من مضادات الاكسدة

الاخرىبتأثير الثايموكوينون بتركيز 4ملغم/كغم لذكور الجرذان المعاملة بمادة Diethylnitrosamine (DENA) والتي تتواجد في دخان السكائر وبعض المركبات الصيدلانية والزراعية المسببة لسرطان الكبد Hepatic carcinogenesis. في حين دراسة Abd-El-Hafez وجماعته (2016) بينت حصول زيادة في التعبير الجيني لإنزيم SOD بتأثير الثايموكوينون في الجرذان المصابة بالبكتريا *S. aureus* و *E. coli*.

وهذا التأثير يأتي على وجه الخصوص من خلال التأثير على عامل استنساخ في الخلية يدعى (Nrf2) Erythroid 2-related factor2 و يمثل العامل الرئيسي الذي يساعد في المحافظة على الاتزان في الخلية بالنسبة لمضادات الاكسدة (Surh *et al*., 2008;Tang *et al*., 2014)، ففي الحالات الطبيعية يرتبط هذا العامل ببروتين يوجد في السايتوبلازم يدعى kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1) لذا يكون غير فعال inactivated ، وعندما يحدث خلل في جهد الاكسدة لأي سبب يطرأ على الخلية ينفصل Nrf2 عن Keap1 اما بتحوير Keap1 او فسفرة Nrf2 phosphorylation وبذلك يتم تنشيطه (Watai *et al*., 2007) ثم ينتقل الى النواة ويتحد مع Antioxidant response element في الحامض النووي DNA مما يشجع التعبير عن بعض الجينات للمركبات المسؤولة عن حماية الخلية ومنها مضادات الاكسدة وإنزيمات ازالة السمية Detoxifying enzymes خاصة GSH-t فضلا عن GSH و لذلك فان المركبات التي تستهدف زيادة تفعيل Nrf2 تستخدم لمواجهة مختلف الحالات التي تضر بالاتزان بين مضادات الاكسدة والمؤكسدات (Enomoto *et al*., 2001;Klaassen & Reisman, 2010).

وبهذا الصدد اشارت دراسة Gore وجماعته (2016) على الفئران المصابة بالتهاب المثانة النزفي Hemorrhagic cystitis المحدث بواسطة Cyclophosphamide (CYP) ان حقن هذه الفئران بالثايموكوينون قبل وبعد المعاملة بهذا العقار قد ادى الى زيادة مستوى تعبير هذا عامل الاستنساخ Nrf2 مقارنة بالفئران المعاملة بالعقار فقط، وعدو الباحثون هذه النتيجة كبداية في طريق التعافي من تاثيرات العقار السمية،

(2-4-5): الكمية النسبية لتعبير جين GSH في انسجة الكبد

Relative quantification of GSH gene expression

في الكائن الحي تمتلك الكبد وظائف متنوعة توجه بمجموعها لإنتاج مركبات لازمة للجسم و توفر خطاً ضد السموم التى تغزو الجسم، مما مكنه من ان يلعب دورا حيويا في الاستجابات التأقلمية Adaptive response للكائن الحي في مواجهة الاجهاد الذي يتعرض له باختلاف نوع العامل المجهد ومن هذه الاستجابات هو اللجوء لتضخيم بعض مورثاتها الخلوية لمواجهة

الاضطراب او التغيرات التي تطرأ على جهد الاكسدة في الجسم(Djordjevic *et al*., 2010)، و بهذا الصدد كان الجلوتاثيون من اكثر مضادات الاكسدة غير الانزيمية التي نالت جانبا وافرا من الدراسة، لا سيما وانه يؤدي العديد من الأدوار في الخلية الحية وأهمها على الإطلاق دوره في تفاعلات إزالة السمية للمركبات السامة داخلية المنشأ Endogenic منها أو الخارجيةExogenic بواسطة تفاعلات الاقتران Conjugated reactions بوجود إنزيم Glutathiones-S-transferase اذ تنتج مشتقات مقترنة Conjugated derivates مع GSH تكون غير سامة يعقبها تعرضها لسلسلة من التفاعلات الكيمائية لتعطي في النهاية أحماض الميركبتوريك Mercaptoric acid غير ذائبة في الماء لتُطْرح مع البول أو الصفراء (Kumar *et al*., 2011)، كذلك فان العديد من تفاعلات الأكسدة والاختزال يشارك فيها الجلوتاثيون من خلال منحه بروتون المجموعة الثيولية من أجل اختزال مختلف البيروكسيدات السامة (Trachootham *et al*., 2008).

بينت النتائج حصول ارتفاع معنوي في مستوى تعبير جين GSH في مجموعة HS طوال مدة التجربة مقارنة بالسيطرة الا انه انخفض معنويا خلال الاسابيع الثلاثة الاخيرة مقارنة بالثلاثة الاولى. وحصلت زيادة معنوية في مستوى تعبير الجين في مجموعة HSTQ مقارنة بالسيطرة لكل الاسابيع واستمرت هذه الزيادة بمستويات ثابتة تقريبا خلال كل التجربة، وكان مستوى تعبير الجين في هذه المجموعة بمستوى تعبيره في مجموعة HS في الاسبوع الاول ثم شهد ارتفاعا ابتداءا من الاسبوع الثاني ليزداد الفرق معنويا خلال الثاني والثالث ويكون الفرق ومعنويا في الخامس والسادس نتيجة للانخفاض المعنوي في تعبير جين GSH في مجموعة HS. من جانب اخر، شهد مستوى تعبير جين GSH في مجموعة TQ ارتفاعا معنويا مقارنة بالسيطرة لكل الاسابيع إلا انه كان منخفض معنويا مقارنة مع مجموعتي HS و HSTQ، إلا انه نجد ان مجاميعTQ كانت مستويات تعبير الجين فيها مستقرة تقريبا طوال مدة التجربة.

يتم التنظيم الجيني للجلوتاثيون بعدة آليات، منها الالية نفسها التي اشرنا اليها في موضوع التعبير الجيني لانزيمي SOD و CAT اي عن طريق Antioxidant response elements (AREs) وعوامل الاستنساخ المرتبطة بها، باعتبار الجلوتاثيون جزء لايتجزء من منظومةمضادات الاكسدة المتأثرة بتغير حالة التوازن الحاصلة بين مضادات الاكسدة/المؤكسدات فيالخلايا (Jeyapaul & Jaiswal, 2000) ، وقد اوضحت العديد من الدراسات ان التعرض للحرارة العالية كان له تأثير بارز على جميع مكونات النظام الجلوتاثيوني، منها دراسة Li وجماعته (2013) والتي بينت ان التعرض للحرارة العالية قد ادى الى زيادة تعبير γ-GCS mRNA في خصى الفئران والذي يساعد على ربط اثنين من الاحماض الامينية المكونة للجاوتاثيون وهما Cysteine وGlutamate بوجود ATP الامر الذي يؤدي الى زيادة وتيرة بناء الجلوتاثيون في الخلية .

كما اشار Verbeke وجماعته(2001) ان تأثر المركبات الحاوية على الكبريت او ما يطلق عليه اصطلاحا المركبات الثيولية Thiol compounds في الخلية بالحرارة يعد من الامور المؤثرة على التعبير الجيني للجلوتاثيون او الانزيمات ذات العلاقة به.

كما يتضح ان التعرض للحرارة العالية قد يؤثر بشكل غير مباشر على التعبير الجيني للجلوتاثيون، من خلال تنشيط مستقبلات تسمى Glucocorticoid receptor (GR) فضلا عن عامل استنساخ هو عامل Nuclear factor kappa B (NFkB) (Rojo *et al.* 2004).

وبين Nakano وجماعته (2014) في دراستهم على اسماك السلمون Salmon التي تربى في المياه بدرجة حرارة عالية زيادة التعبير الجيني في الجلوتاثيون في اكبادها والمترافق مع زيادة مستوى الجلوتاثيون في المصل. كما اشارت دراسة Yao وجماعته (2011) زيادة تعبير GSH-t mRNA expression في انسجة كبد ابقار الهولشتاين Holsteins المعرضة للحرارة العالية وهذا الانزيم عادة يترافق مع زيادة انتاج الجلوتاثيون من اجل ربط المركبات السامة الناتجة من اكسدة الدهون بفعل الاجهاد الحراري ومحاولة التخلص منها (Kumar *et al.*, 2011). كما قد يكون زيادة التعبير الجيني للجلوتاثيون كنوع من رد الفعل على تاكسد مضادات الاكسدة الانزيمية الاخرى خصوصا فيتاميني C و E اذ يعمل الجلوتاثيون على اعادتها الى حالتها المختزلة من اجل ضمان اقصى توازن في الخلية (Ryan *et al.*, 2010) .

اشرنا سابقا الى ان هنالك علاقة ايجابية بين استخدام الثايموكوينون وتركيز الجلوتاثيون في مختلف الاعضاء اعتمادا على نتائج الدراسات التي اشرنا اليها سابقا في معرض مناقشة تاثير الثايموكوينون على تركيز الجلوتاثيون في مصل وأنسجة كبد ذكور الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري، وجاءت نتائج الدراسة الجزيئية لتوكد ما تم التوصل اليه، اذ شهدت المجاميع التي تناولت الثايموكوينون بالتزامن مع التعرض للحرارة العالية استجابة واضحة، اذ كان مستوى تعبير GSH mRNA فيها عاليا مقارنة ببقية المجاميع وتصاعدياً مع مرور اسابيع التجربة، وهذا يأتي منطقيا وفي ضمن اطار ما اشرنا اليه، اذ يعد الثايموكوينون من ضمن المركبات التي تستحث او تحفز Induce على بناء مضادات الاكسدة عموما والجلوتاثيون خصوصا على المستوى الجزيئي، لا سيما اذا عرفنا حقيقة ان الثايموكوينون من المركبات قليلة الذوبان في الماء Hydrophobic و بالتالي يحتاج الى مركب اخر يرتبط به ليسهل انتقاله في الجسم لذا يرتبط بالجلوتاثيون، حيث يتكون مركب Glutathionyl-dihydrothymoquinone والذي يتمتع بخاصيتين هي الخاصية المضادة للأكسدة وأيضا سهولة الدخول الى اي جزء من اجزاء الخلايا نظرا للانتشار الواسع للجلوتاثيون (Khalife & Lupidi,2007)، وكذلك وبمجرد دخوله الى الخلايا ينفصل الثايموكوينون عن الجلوتاثيون بما يسمح له بالارتباط بالمركبات التي تحتاج الخلايا الى طرحها ، وهذا ما

اشارت له الدراسات التي تناولت تأثير الثايموكوينون على المركبات العضوية والعقاقير ذات التأثير السام والتي تتايض داخل الجسم الى مركبات ثانوية ذات تأثير اكثر خطورة من شكلها الاولي (Aycan *et al*., 2014;Ojha *et al*., 2015).

وبين El-Sayed (2011) الى ان الثايموكوينون قد ساهم في رفع تنظيم Upregulation التعبير الجيني للجلوتاثيون من جهة فضلا عن الانزيمات المؤثرة على ارتباط الاحماض الامينية الداخلة في تركيبه في كبد الجرذان المعرضة للتسمم برابع كلوريد الكاربون CCL4، منها انزيم Microsomal epoxide hydrolase ،وأيضا يشار اليه باسم اخر هو γ-Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS)، والذي يعمل على ربط الـ Cysteine وGlutamateبوجود ATP.

من جهة اخرى قد يكون التاثير الملاحظ على تركيز الجلوتاثيون وباقي مضادات الاكسدة عرضيا نتيجة لقدرة الثايموكوينون على اصلاح الدنا المتضرر Damaged DNA، اذ بينت دراسات عديدة منها دراسة Al-Shdefat وجماعته (2014) ان خلايا الدم البيض المعزولة من الانسان والمعاملة بعقار Doxorubicin (DXR) المستخدم في العلاج الكيميائي للسرطان، قد شهد معدل التعبير الجيني عن عوامل اصلاح الدنا مثل p53 فيها زيادة ملحوظة مقارنة بالخلايا غير المعاملة بالثايموكونون، علما ان p53 يوصف بأنه الحارس على المحتوى الوراثي Genome's guardian لأنه يراقب العمليات التي تجري أثناء إنقسام الخلية، فإذا حصل تلف أو خلل في الـDNA غير قابل للإصلاح فانه ينشط جينات تحرض على الموت المبرمج Apoptosis للخلايا التالفة.

(3-4-5): **الكمية النسبية لتعبير جين** HSP 70 **في انسجة الكبد**

Relative quantification of HSP70 gene expression

ان بروتينات الصدمة الحرارية Heat shock proteins (HSPs) تشفر بوساطة جينات تتأثر قدرتها التعبيرية خلال ظروف الاجهاد المختلفة وإن انتاج هذه البروتينات يزيد من فرص بقاء الحيوانات وإعادة التوازن الخلوي(Latchman, 2001) من خلال حماية البروتين من المسخ وإعادة الالتفاف للبروتينات القابلة للإعادة وعرض المتحللة وغير القابلة للالتفاف إلى التحلل البروتيني Proteolysis (Katschinski, 2004;Goloubinoff & De Los Rios, 2007).

ان مسؤولية التحفيز لحث التعبير الجيني لبروتين الصدمة الحرارية 70 تنظم بوساطة عوامل مختلفة ابرزها من عوامل استنساخ تتوسط انتاجHSP70mRNA وهي عامل استنساخ الصدمة الحرارية Heat shock transcription factor (HSF) (Akerfelt *et al*., 2010) وعوامل سكما Sigma factors (σ) (Sikora & Grzesiuk, 2007). هذه العوامل ترتبط مع مركب وراثي آخر بمثابة المحث Inducer يسمى عنصر الصدمة الحرارية Heat Shock element (HSE) موجود

على مواقع المحفز Promoter لجين بروتينات الصدمة الحرارية، وعندما الاجهاد الذي يولد اشكال غير طبيعية من البروتين عبر مسخها Denaturation بالعوامل المجهدة سوف يطلق الاشارة الابتدائية للاجهاد لتحويل مسارات الطاقة التي تقود لتنشيط عامل استنساخ صدمة الحرارة HSF ويتفكك من معقد غير نشط إلى جزيئة احادية التكوين monomers ثم ينشط إلى جزيئة ثلاثية التكوين Trimeres بالفسفرة Phosphorylation ثم يتحرك إلى النواة ليرتبط مع عنصر الصدمة HSE مما يحث على انتاج نسخة بروتينات HSPs (Holmberg *et al*., 2001) فتطلق بروتينات HSPs الحرة فترتبط مع البروتينات الممسوخة وتؤدي دورها كما اشرنا سابقا.

بينت النتائج حصول زيادة لم تصل الى مستوى المعنوية في مستوى تعبير جين HSP 70 في انسجة كبد ذكور الجرذان المعرضة للاجهاد الحراري مقارنة بالسيطرة خلال الاسبوع الاول من التجربة ، ثم وصلت هذه الزيادة الى مستوى المعنوية ابتداءا من الاسبوع الثاني وحتى الاسبوع الخامس من التجربة لتعود وتنخفض خلال الاسبوع السادس مقارنة بالأسابيع السابقة.

تتفق نتائج الدراسة لحالية مع ما توصل اليه Kim وجماعته (2015) في دراسة اجروها للتعرف على تعبير الجينات ذات العلاقة بالإجهاد التاكسدي وايض الدهونLipid metabolism المرافق للتعرض للحرارة العالية(C 38~37) في الجرذان لمدة 2– 4 أسابيع اذ لاحظوا زيادة تنظيم up-regulation لنشاط جين $HSP\text{-}A_1$ الذي يشفر لبروتين HSP70 في الكبد. وتتفق كذلك مع نتائج دراسة Hosseini وجماعته (2015) في ارتفاع التعبير الجيني للبروتين في القلب والكلى وعضلات صدر الدجاج المجهد حراريا، وكذلك مع دراسة Akbarian وجماعته (2014) في الدجاج المعرض للحرارة العالية بشكل دوري و تأثير اضافة الزيوت الاساسية لنباتي الزعتر *Origanum compactum* والكركم *Curcuma xanthorrhiza* في العليقة مع التعرض للحرارة، ومن نتائج هذه الدراسة ارتفاع مستوىmRNA HSP70 في انسجة الكبد تليها الكلى ثم القلب وعزو هذه النتائج الى خصوصية وظيفة كل من هذه الاعضاء. وايضا لاحظه كذلك Gu وجماعته (2012) فيما يتعلق بالتعرض الحاد للحرارة Acute heat stress من انه ايضا يسبب تعبير عالي Over expression لبروتين الصدمة الحرارية 70 في خلايا امعاء فروج اللحم. كما اظهرت دراسةPei وجماعته (2011) زيادة معدل التعبير عن HSP70 في خصى الارانب المجهدة حراريا جنبا الى جنب مع بروتينات اخرى مثل HSP60 و HSP90 في حين ان الارانب غير المجهدة لم يظهر فيها اي تعبير لهذا البروتين مما يؤكد انه يفرز في حالة الاجهاد فقط.

و اوضح Luo وجماعته (2001) ان مستوى افراز بروتين الصدمة الحرارية HSP70 تحت مستوى حراري43 م° لمدة ساعة واحدة قد تضاعف من 3–4 مرات من مستوى المعاملة المعرضة على37 م° لمدة ساعة واحدة، وتحدث الزيادة بشكل مبكر في مزرعة الخلايا المجهدة حرارياً لأن

قياس مستوى HSP70 mRNA كان قد زاد بصورة تقريبية ثلاث مرات عما هو موجود في المعاملة 37 م°. واوضحت دراسة قام بها Leger وجماعته (2000) ان معدل بروتين HSP70 المفرز من عضلة قلب الفئران المعرض للاجهاد الحراري قد اعطى زيادة معنوية بالمقارنة بالفئران غير المعرضة للإجهاد. وبين Xu وجماعته (2000) ان درجة الحرارة 42 م° ولمدة 30 دقيقة قد حثت تخليق بروتينات الصدمة الحرارية HSP70 في خلايا العضلات الملساء للاوعية الدموية في الجرذان بأعلى مستوى لإنتاج HSP70 من الاجهاد على درجة 37°م مدة 6 ساعات.

وانخفاض التعبير الجيني للبروتين خلال الاسبوع الاخير يتفق مع ما اشار اليه Morimoto وجماعته (1996) من ان الزيادة الحاصلة في تركيز HSP70 في الدورة الدموية قد يكون له تأثير تثبيطي على عوامل الاستنساخ الخاصة بالجين المسؤول عن بناءه مما يؤدي في النتيجة الى تثبيط التعبير الجيني لهذا البروتين ، فعندما تصبح مستويات بروتينات HSPs مرتفعة يؤدي إلى تحرير فعل كابح على عامل HSF فيحوله من جزيئة ثلاثية التكوين مفسفرة مرتبطة إلى جزيئة احادية غير قادرة على حث الاستنساخ على موقع المحفز فتكبح عملية الاستنساخ فيتوقف انتاج HSPs (Xu *et al*., 2000;Tamanek & Somero, 2002)، فضلا عما ذكره Guerreiro و جماعته(2004) في دراستهم على الدجاج للتحري عن قدرته على التأقلم للعيش في الاجواء الحارة، ان احدى طرق عمل البروتين تأتي من خلال ارتباطه بمستقبلات الكورتيزول Cortisol receptors في السايتوبلازم، لذا فان وجود الكورتيزول بتراكيز عالية وهو ما لوحظ في الحيوانات المجهدة حراريا ومن خلال تنافسه مع HSP70 على الارتباط بهذه المستقبلات سوف يسبب زيادة تركيز HSP70 الحر في الدورة الدموية مما يسبب التأثير التثبيطي لتعبيره في الكبد كما ذكرنا سابقا.

اظهرت النتائج ان الجرذان المعرضة للإجهاد الحراري والتي اعطيت الثايموكوينون معا قد شهدت زيادة معنوية تدريجية في مستوى تعبير جين HSP 70 في انسجة الكبد مقارنة بمجاميع السيطرة لكل الاسابيع وكانت هذه الزيادة المعنوية اكثر وضوحا خلال الاسابيع الاربعة الاخيرة ، ومن جهة اخرى كان مستوى تعبير الجين في هذه المجموعة متقارب مع مستواه في مجموعة الاجهاد الحراري فقط خلال الاسابيع الثلاث الاولى ثم يبدأ في التفوق عليه خلال الاسبوع الرابع والخامس ليصل الفرق بينهما الى اقصاه خلال الاسبوع السادس بزيادة معنوية واضحة عن باقي المجاميع. من جانب اخر فان مستوى تعبير جين HSP 70في انسجة الكبد للجرذان التي اعطيت الثايموكوينون فقط لم يشهد تغيرا معنويا واضحا، مقارنة مع مجاميع السيطرة طيلة الاسابيع الستة ، وكان مستوى تعبير الجين لهذه المجموعة اقل معنويا من المجموعة المعرضة للاجهاد الحراري

فقط والمجموعة التي اعطيت الثايموكوينون مع التعرض للحرارة ابتداءا من الاسبوع الثاني من التجربة.

بالرغم من ان الثايموكوينون يلعب دورا مهما في السيطرة على تعبير العديد من الجينات في الحالة الطبيعية وفي الحالات المرضية وخاصة السرطانية منها الا ان المعلومات المتوافرة عن دوره حصرا في التعبير الجيني لبروتينات الصدمة الحرارية وخاصة 70 تحت ظروف الاجهاد الحراري قليلة اذا لم تكن معدومة، فقد بينت دراستين قام Hamadyوجماعته (2015) وHamady (2011) للتعرف على التأثير المناعي للمستخلصين الميثانولي والفينولي لبذور الحبة السوداء في ذكور جرذان الوستر المجهدة حراريا ان التعبير الجيني لبروتين الإجهاد HSP70 في عينات القلب والكبد والخصى للجرذان التي عوملت بالمستخلصين فقط او مع الاجهاد الحراري كان اعلى من تعبيره في انسجة الحيوانات المجهدة حراريا فقط واعلى كذلك من مجاميع السيطرة وعزاه الى دوره في تعزيز المناعة.

علاوة على ما تقدم، لا بد من ان نشير الى الدراسة الوحيدة التي اشارت الى العلاقة المحتملة بين الثايموكوينون تحديدا والتعبير الجيني لبروتين HSP70 وجينات اخرى وهي الدراسة التي قام بها Salim وجماعته (2013) على خط الخلايا السرطانية المسببة لسرطان ابيضاض الدم اللمفاوي Acute lymphocyte leukemic cell line (CEMss)، اذ من المعروف انه في الخلايا السرطانية يرتفع مستوى تعبير جين بروتين HSP70 مقارنة مع الخلايا السوية من اجل رفع فرص بقاء الخلايا السرطانية المعروفة بارتفاع نسبة النمو فيها مقارنة بالخلايا السوية (Porter & Janicke, 1999)، في حين تسبب المعاملة لهذه الخلايا السرطانية بالثايموكوينون في تثبيط تعبير الجين لبروتين HSP70 في الخلايا السرطانية جنب الى جنب مع رفع نسبة تعبير جينات البروتينات المسؤولة عن الحث على موت الخلايا المبرمج مثل BAX مما يساهم في تثبيط نمو الخلايا السرطانية وجعلها اكثر تقبلا للعلاج الكيميائي، وعزا الباحثون هذه النتائج الى خاصية الانتقائية Selectivity التي يمتلكها الثايموكوينون فضلا عن العديد من المركبات الفعالة الاخرى في التأثير في الخلايا السرطانية، بسبب بعض الخواص التي تمتلكها الخلايا السرطانية وغير الموجودة في الخلايا الطبيعية، مثل سرعة الايض لتكوين أوعية الدموية الجديدة وكذلك شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلية السرطانية وإمكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة (Folkman 2000;Moteki *et al.*, 2002) .

عامل النواة كابا Nuclear factor-kappa B($Nf\text{-}_kB$) عامل استنساخ يوجد في سايتوبلازم خلايا الكبد حيث يكون مرتبطا بوحدة تثبيطية Inhibitory subunit يشار اليها بـ I-κB، ونتيجة للإجهاد يتم تنشيط هذا العامل من خلال فك ارتباطه مع الوحدة التثبيطية بعملية الفسفرة، وينتقل

الى النواة ويرتبط بالحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA ويستحث استنساخ بعض الجينات المسؤولة عن الاستجابات الالتهابية مثل Cytokine و Chemokine الامر الذي يعجل في دخول الخلايا الى مرحلة الموت المبرمج (Zhu & Fung, 2000)، و أوضح Malhotra و Wong (2002) ان المركبات التي تعمل على تثبيط Nf-$_k$B تودي الى تحفيز البروتينات التي لها علاقة بمواجهة الاجهاد وخصوصا بروتينات الصدمة الحرارية، وبهذا الصدد اوردت دراسات عديدة ان الثايموكوينون يمتلك تأثير تثبيطي على Nf-$_k$B منها على سبيل المثال لا الحصر الدراسة التي قام Bai وجماعته(2013) على خلايا الكبد Hepatic stellate cells في الجرذان المعاملة بالسكريات الدهنية المتعددة Lipopolysaccharide المستخلصة من غشاء البكتريا السالبة لصبغة غرام Gram-negative، ودراسةAl-Malki وSayed (2014) على الجرذان المعاملة بعقار Cisplatin المضاد للسرطان والذي يسبب اثارا سلبية على الكبد Hepatotoxicity، وكذلك دراسة Mahmoud وجماعته (2014)على الجرذان المعاملة بالمضاد الحيوي جنتمايسين Gentamicin antibiotic، وملخص نتائج هذه الدراسات تشير الى الفعالية المضادة للالتهاب Anti-inflammatory التي يؤديها الثايموكوينون على اختلاف المركبات لتي تؤثر في الكبد على وجه الخصوص من خلال تثبيط العوامل المسببة للالتهاب مثل TNF-α و Toll-like receptor4 (TLR4) و Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) والتي تشارك في مسار تنشيط Nf-$_k$B و بالتالي تثبيط انتاج هذا العامل، مما يعطينا احتمال الى الالية التي يمكن من خلالها ان يؤثر الثايموكوينون على التعبير الجيني لبروتين الصدمة الحرارية HSP70 موضوع الدراسة نظرا الى حالة الاضطراب الواضح التي يسببها الاجهاد الحراري في معظم أجهزة الجسم وحالة التأهب والتغير المفاجئ التي تعاني منها الحيوانات التي من شأنها أن تزيد حالة الإجهاد التاكسدي عند الحيوانات وتجعلها تعمل على إعادة الوضع الى حالتها الأصلية ورجوع الجسم الى حالته الطبيعية وزوال الكرب أو الإجهاد بعد حصول الضعف المناعي العام. كما ان زيادة تعبير جين HSP70 في المجموعة المعاملة بالحرارة والثايموكوينون معا يمكن ان يكون كجزء من دعم عملية التكيف او التحمل الحراري Thermotolerance سيما وان هذا البروتين مهم ليس فقط في وقت التعرض للحرارة وإنما حتى فيما بعد التعرض حيث يكون جسم الحيوان في حاجة فعلية حقيقية لمواجهة مسؤولية اصلاح الاضرار التي سببتها الحرارة (Malyshev *et al*., 2000).

.

الاستنتاجات Conclusions

يستنتج من نتائج الدراسة الحالية ان التعرض للاجهاد الحراري المزمن يحدث تأثيرا سلبيا في معظم وظائف الجسم ومنها على وجه الخصوص وظائف الكبد المتمثلة بخلل مستويات انزيمات وظائف الكبد وجينات الصدمة الحرارية HSP70 و مضادات الاكسدة الانزيمية (CAT، SOD، GSH-px، GSH-r، GSH-t) وغير الانزيمية (GSH) فضلا عن ارتفاع مستويات MDA. على نقيض ذلك ادت المعاملة بعقار الثايموكوينون الى تدعيم انظمة الدفاع المانعة للأكسدة عن طريق تحسين مضادات الاكسدة الذاتية وانتاج بروتين الصدمة الحرارية عند استخدام العقار لمدة ستة اسابيع بجرعة 50 ملغم/كغم من وزن الجسم في ذكور الجرذان البالغة.

التوصيات Recommendations

استكمالاً لما تم التوصل إليه من نتائج في هذه الدراسة، يمكن طرح المشاريع البحثية الآتية لتكون مكملة للجوانب التي لم تتطرق إليها الدراسة الحالية والتي يمكن إيجازها على النحو الآتي:

1. اجراء دراسات اخرى مماثلة لهذه الدراسة ولكن في ظروف حرارية مختلفة والمقارنة بينهما لمعرفة مدى التداخل بين الثايموكوينون وحرارة البيئة في نفس المعايير المدروسة.

2. دراسة امكانية استخدام الثايموكوينون قبل الاجهاد الحراري وبعده بتراكيز تختلف عن التركيز المستخدم في الدراسة الحالية.

3. اجراء دراسات بغرض اختبار الفعل الوقائي او العلاجي للثايموكوينون على حالات مرضية تتميز بتحريض الاجهاد التاكسدي .

4. التوسع في دراسة التعبير الجيني لأنواع اخرى من بروتينات الصدمة الحرارية مثل HSP90 خلال التعرض لدرجات الحرارة العالية مع استخدام الثايموكوينون إذ تعد ميداناً خصبا وواسعا بحاجة للمزيد من الدراسة والبحث في هذا المجال.

5. اجراء دراسة كيمائية نسيجية مناعية لمتابعة مستويات مضادات الاكسدة في الكبد والأعضاء الاخرى في الجرذان المتعرضة للاجهاد الحراري.

المصادر

Abba, Y.; Hassim, H.; Hamzah, H. and Noordin, M. (2015). Antioxidant vitamins, oxidant injuries and diseases. Pertanika J. Scholarly Res. Rev., 1(1): 58-66.

Abdelatif, A.; Mariam, Y. and Hassan, Y. (2009). Seasonal variation in erythrocytic and leukocytic indices and serum proteins of female Nubian goats. Middle-East J. Sci. Res., 4: 168-174.

Abdel-Azeiz, A.; Saad, A.H. and Darweesh, M.F.(2013). Efficacy of thymoquinone against vaginal candidiasis in prednisolone-induced immune-suppressed mice. J. Am. Sci., 9(4): 155-159.

Abd-El-Hafez, S.M.; Ismael, A.B.; Nasir. O.; Soliman, M.; Mohamed, E.H. and Kafaween, I.K. (2016). Synergetic effect of probiotic and *Nigella sativa* to control enteric and respiratory infections in an animal model. Natl. J. Physiol.Pharmacol., 6(5): 1-8.

Abdel-Kafy, E.M.; Hoda, A.S. and Saeed A.M. (2008). Changes in oxidative profile, activity of some gastrointestinal enzymes and performance of growing rabbits during hot season due to neonatal heat exposure. 9th World Rabbit Congress – June 10-13, Verona – Italy, pp 513-517.

Abdel-Wahab, W.M.(2013). Protective effect of thymoquinone on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. J. Basic Appl. Zool., 66 (5): 263-270.

Abu-Khader, M.M. (2012).The effect of route of administration in thymoquinone toxicity in male and female rats. Indian J. Pharm. Sci.,74:195-200.

Agarwal, A. and Prabhakaran, S. (2005). Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. Ind. J. Exp. Biol., 43: 963-974.

Agrawal, S. and Gupta, D. (2013). Assessment of liver damage in male albino rats after repetitive heat stress of moderate level. Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol., 3(2): 147-152.

Ahmad, A. ; Husain, A.; Mujeeb, M.; Khan, S.A. ; Najmi, A.K. ; Siddique, N. A.; Damanhouri, Z. and Anwar, F. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 3(5):337–352.

Ahmad, Z.; Laughlin, T.F. and Kady, I.O. (2015). Thymoquinone inhibits *E. coli* ATP synthase and cell growth. PLoS One, 10(5):1-12.

Ahmadabadi, A.; Tavakoli, F.; Hasanzadeh, G.; Rahimi, H. and Sabzevari, O. (2011). Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B1 induced liver toxicity in mice. Daru J. Pharm. Sci., 19:282-

287

Akbarian, A.; Michiels, J. ; Golian,A. ; Buyse, J.; Wang, Y. and De Smet, S. (2014). Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed *Origanum compactum* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oils. Poult. Sci., 93 :1930–1941.

Akerfelt, M.; Morimoto, R.I. and Sistonen, L.(2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 11(8): 545–555.

Al-Ali, A.; Alkhawajah, A.A.; Randhawa, M.A. and Shaikh, N.A. (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. J. Ayub Med. Coll. Abbottabad. 20, 252-257.

Al-Haidary, A.A.(2005). Effect of dehydration on body temperature of young arabian camels Camelus dromedarius. J. King Saud Univ., Agric. Sci., 18: 1-7.

Alkharfy, K. M.; Ahmad, A.; Rao, M. A.; Khan, A. and Al-Shagha, W.M. (2015). Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit model. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin., 40(3): 319-323.

Al-Malki, A.L. and Sayed, A. (2014). Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepato- toxicity via nuclear factor kappa- β. Compl. Alter. Med., 14:282-289.

Al-Naqeep, G.; Ismail, M. and Allaudin, Z.(2009). Regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene expression by thymoquinone-rich fraction and thymoquinone in HepG2 cells. J. Nutrigen. Nutrigen.,2:163–172.

Al-Said, M.; El-Olemy, M. and Elhag, H.M. (2002). Biotechnological production of biologically active metabolites by plant cell culture techniques. Saudi Arabia KACST., : 218–256.

Al-Shdefat, M.; Abd-ElAziz, A. and Al-Saikhan, F. I. (2014). Genoprotective and genotoxic effects of thymoquinone on doxorubicin-induced damage in isolated human leukocytes.Trop. J. Pharm. Res., 13(12): 2015-2020.

AL-Talla, H.A (2013). Thermodynamic analysis of thymoquinone binding to human serum albumin and denaturation study of the resultant complex. M.Sc. Thesis Islamic University - Gaza Palestine P 73.

Al-Tameemi, W. T. (2014). Antihyperglycemic and pancreatic regenerative effect of thymoquinone in streptozotocin induced diabetic male rats. Ph.D. thesis, College of Education, Al- Qadisiya University.

Altan, O.; Pabuccuoglu, A.; Alton, A.; Konyalioglu, S. and Bayraktar, H. (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and

some stress parameters in broilers. J. Br. Poult. Sci., 4: 545-550.

Al-Zahrani, S.; Kandeal, S.; Mohany, M. and Badr, G.(2011). Effects of vitamin E and thymoquinone on physiological and histological characteristics of heat-stressed male mice. Afr. J. Pharm. Pharmacol. , 5(19):2174-2183.

Al-Zahrani, S.; Mohany, M.; Kandea, S. and Badr, G.(2012). Thymoquinone and vitamin E supplementation improve the reproductive characteristics of heat stressed male mice. J. Med. Plants Res., 6(3):493-499.

Aman, S. and Moin, S. (2013). Antioxidant activity of thymoquinone and its protective effect against oxidative hemolysis. Int. J. Sc. Res., 2(4): 28-30.

Amaral, B. C.; Connor, E. E.; Tao, S.; Hayen, M. J.; Bubolz, J. W. and Dahl. G. E. (2010). Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. Domest. Anim. Endocrinol., 38:38-45.

Amaral, B. C.; Connor, E. E.; Tao, S.; Hayen, M. J.; Bubolz, J. W. and Dahl. G. E. (2011). Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows. J. Dairy Sci., 94: 86-96.

Amici, A.; Frnci, O.; Mastroiacono, P.; Merendino, N.; Nardini, M.; Tomassi, G.; Abdeelatif, A. M. & Modawi, S. M. (2000). Short term cute heat stress in rabbits: functional, metabolic and immunological effects. J. World Rabbit Sc., 8(1): 11-16.

Anwar, K.; Iqbal, J. and Hussain, M.M. (2007). Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. J. Lipid Res., 48: 2028- 2038.

Armario, A.; Valles, A.; Dal-Zotto, S.; Marquez, C. and Belda, X.(2004). A single exposure to severe stressors causes long-term desensitisation of the physiological response to the homotypic stressor. Stress, 7(3):157-172.

Arnaud, C.; Joyeux, M.; Garrel, C.; Godin-Ribuot, D.; Demenge, P. and Ribuot, C. (2002). Free-radical production triggered by hyperthermia contributes to heat stress-induced ardioprotection in isolated rat hearts. J. Bri., of Pharmacology. 135(7): 1776-1782.

Arneson, W. and Brickell, J. (2007). Assessment of liver function. In: Clinical Chemistry: A Laboratory Perspective. Arneson, W. & Brickell, J. (eds.) F.A. Davis Co., Philadelphia, pp: 233- 266.

Ashour, T. H. (2014).Effect of thymoquinone supplement on erythrocyte indices and osmotic resistance in rat model of acute hemorrhagic anemia. Kaser EL-Aini Med. J., 20(2): 19-23.

Attoub, S.; Sperandio, O.; Raza, H.; Arafat, K.; Al-Salam, S. and Al Sultan,

M.A. (2013). Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. Fundam. Clin. Pharmacol.,27(5):557-569.

Aycan, I.O.; Tufek, A.; Tokgoz, O.; Evliyaoglu, O.; Firat, U.; Kavak, G.O.; Turgut, H. and Yuksel, M. (2014).Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Int. J. Surg., 12(3) :213–218.

Ayuob, N.N; El-Shitanyc, N.A and Alamae, M. N. (2016). Thymoquinone protects against hypothyroidism-induced cardiac histopathological changes in rats through a nitric oxide/antioxidant mechanism. Biomed. Res., 27 (1): 93-102.

Ayyat, M.; Soliman, M.; Abd El-Monem, U. and El-Sheikh, S. (2002). Performance of growing rabbits as affected by some environmental conditions. Egyp. J. Rabbit Sc., 12: 43-58.

Badary, O.A.; Abdel-Naim, A.B.; Abdel-Wahab, M. H. and Hamada, F. M (2000). The influence of thymoquinone on doxorubicin induced hyperlipidemic nephro-pathy in rats. Toxicology, 143: 219-226.

Badary, O.A.; Taha, R.A; Gamalel-Din, A. and Abdel-Wahab, M. (2003): Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. Drug Chem. Toxicol., 26: 87–98.

Bai, T.; Lian, L.H.; Wu, Y.L.; Wan, Y. and Nan, J.X. (2013) Thymoquinone attenuates liver fibrosis via PI3K and TLR4 signaling pathways in activated hepatic stellate cells. Int. Immunopharmacol., 15: 275–281.

Bamosa, A.O. (2015). A review on the hypoglycemic effect of *Nigella sativa* and thymoquinone. Saudi J. Med. Med. Sci., 3:2-7.

Bartlett, J. R. and Smith, M. O. (2003). Effect of different levels of zinc on the performance and immune-competence of broilers under heat stress. Int. J. Poult. Sci., 82: 1580-1588.

Benavente, A.; Raschi, A.; Romano, E.; Molina, M.A. and Stephens, PW.(2004). Crystal structure determination of thymoquinone by high-resolution x-ray powder diffraction. AAPS Pharm. Sci.Tech., 5(2): 1-28.

Bernabucci, U.; Lacetera, N.; Baumgard, L.H.; Rhoads, R.P.; Ronchi, B. and Nardone, A. (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. Animal, 4: 1167–1183.

Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Lacetera, N. and Nardone, A. (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. J. Dairy Sci., 85: 2173-2179.

Bhusari, S.; Hearneb, L.B.; Spiers, D.E.; Lamberson, W.R. and Antoniou, E. (2008). Transcriptional profiling of mouse liver in response to chronic heat stress. J. Thermal Biol., 33 157–167.

Boulant, J. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermo-regulation and fever. Clin. Infect. Dis., 5: 157-161.

Bullock, J . (2001). Endocrine physiology. In: Physiology. 4th ed. Bullock, J.; Boyle III, J., & Wang, M.B.(eds.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p : 693-706.

Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (1994). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2nd ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pp: 788-831.

Butt, M.S. and Sultan M.T. (2010). *Nigella sativa*: reduces the risk of various maladies. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 50(7): 654-656.

Chandra, G. and Aggarwal A. (2009) Effect of dl-α-tocopherol acetate on calving induced oxidative stress in periparturient crossbred cows during summer and winter seasons. Indian J. Anim. Nutr., 26(23): 204-210.

Chandrasekaran, S. and Leelavinothan, P. (2009). Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life Sci., 85(23-25): 830-834.

Charles, D.R. (2002). Responses to the thermal environment. In: Poultry Environment Problems, a guide to solutions. Charles, D.R. & Walker, A.W. (eds). Nottingham Univ. Press, UK, pp.1–16.

Chen, Y.; Arsenault, R.; Napper, S. and Griebel, P. (2015). Models and methods to investigate acute stress responses in cattle. Animals, 5:1268-1295.

Cheon, M.; Park, D.; Kim, K.; Park, S.D. and Ryu, K. (1999). Homologous up regulation of GnRH by continuous GnRH in cultured rat pituitary cells. Endocr., 11: 49-55.

Cheung, S.; McLellan, T. and Tenaglia, S. (2000). The thermophysiology of uncompensable heat stress: physiological manipulations and individual characteristics. Sports Med., 29, 329-59.

Collier, R.J. and Gebremedhin, K. G.(2015). Thermal biology of domestic animals. Annu. Rev. Anim. Biosci., 3:10–20.

Craig, E.A. (1985). The heat shock response. Crit. Rev. Biochem., 18(3): 239-280.

Cui, Y.; Hao, Y.; Li , J.; Bao, W.; Li, G.; Gao, Y. and Gu, X. (2016). Chronic heat stress induces immune response, oxidative stress response, and apoptosis of finishing pig liver: A proteomic approach . Int. J. Mol. Sci., 17, 393-416.

Darakhshan, S.; Pour, A.B.; Colagar, A.H. and Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. Pharmacol. Res., 95: 138-158.

Das, R. ; Sailo, L. ; Verma, N.; Bharti, P.; Saikia, J. ; Imtiwati, N. and Kumar,

R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review .Vet. World, 9(3): 260–268.

Day, B. J.(2009). Catalase and glutathione peroxidase mimics. Biochem. Pharmacol., 77: 285-296.

Deane, E.E.; Kelly, S.P.; Chow, I.N.K. and Wo, N.Y.S. (2000).Effect of a prolactin pharmacological stimulant (sulpiride) and suppressant (bromocriptine) on heat shock protein 70 expression in silver sea bream, *Sparus sarba*. Fish Physio. Biochem., 22: 125–133.

Dehghan, A.; Arabi, M.; Nahid, S. and Aminlari, M. (2010). Changes of serum reduced and oxidized glutathione in heat stressed ram. Asian J. Anim. Vet. Adv., 5: 472-477.

Deng, W.; Dong, X. F. ;Tong, J. and Zhang, Q. (2012). The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress induced impairment of egg production, gut morphology ,and intestinal mucosal immunity in laying hens. Int .J. Poult. Sci., 91:575-582.

Desai, P.; Manjunath, S.; Kadi, S.; Chetana, K. and Vanishree, J.(2010). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 14: 959-967.

Desai, S.D.; Saheb, S. H.; Das, K. and Haseena, S.(2015). Effect of thymoquinone on MDA and SOD levels in sterptozotocine induced diabetic albino rats. J. Pharm. Sci. Res., 7(8):523-526.

Devasagayam, T.P.; Tilak, J.C.; Boloor, K.K.; Sane, K.S.; Ghaskadbim, S. and Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. J. Assoc. Physicians Ind., 52:794-804.

Dewick, P.M. (2002). Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach. 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd. England 507 p.

Dhanalakshmi, S.; Devi, R. S.; Srikumar, R.; Manikandan, S. and Thangaraj, R. (2007). Protective effect *Triphala* on cold stress-induced behavioral and biochemical abnormalities in rats. J. Yakugaka Zaasshi, 127(11): 1863-1867.

Dhingra, A.K.; Chopra, B.; Dass, R. and Mitta, S. K.(2014). A review on COX and their inhibitors: Present and future .IPP., 2 (4):470-485.

Djordjevic, J.; Djordjevic, A.; Adzic, M.; Niciforovic, A. and Radojcic, M. B. (2010). Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of wistar rats. Physiol. Res., 59: 729- 736.

Easa, F. and Hekal, A. (2015). Effect of early heat exposure on some physiological and histological changs in the liver and kidney of rabbits before weaning. Egypt. Poult. Sci., 35 (I): 149-175.

El-Sayed, W.M. (2011). Upregulation of chemoprotective enzymes and glutathione by *Nigella sativa* (black seed) and thymoquinone in CCl4-intoxicated rats. Int. J, Toxicol., 30 (6): 707-714.

El-Sheikh, A.; Morsy, M.; Abdalla, A. ; Hamouda, A. H. a Alhaider, I. A. (2015). Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats. Mediators Inflam., 2015: 1-12.

Emery, J. (2004). Heat stress in poultry-solving the acclimatization immediately prior to heat stress might be problem attributed to a reduction in feed consumption. Endocrine. J. Rev., 23: 38–89.

Enomoto, A.; Nagayoshi, E.; Haruta, J.; Kimura, T. ; O'Connor, T.; Harada, T. and Yamamoto, M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. Toxicol. Sci., 59:169–177.

Firdaus, F.; Zafeer, M. F.; Anis, E.; Fatima, M.; Hossain, M. and Afzal, M. (2016). Antioxidant potential of thymoquinone against arsenic mediated neuro-toxicity. Free Rad. Antiox., 6 (1): 115- 123.

Folkman, J. (2000). Tumor Angiogenesis. In: Cancer Medicine 5th ed., Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.F.; Weichselboum, R.R.; Holland, J.F.; Ferri III, E. & Ganster, T.E. (eds.). BC. Decker Inc. Canada.

Fouad, A.; Albuali, W.H. and Jresat, I. (2014). Protective effect of thymoquinone against arsenic-iInduced testicular toxicity in rats. Int. J. Med. Health, Biomed. Bioeng. Pharmac. Eng., 8(2):98-101.

Fukai, T. and Ushio-Fukai, M.(2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid. Redox Signal, 15: 1583-1606.

Gali-Muhtasib, H. and Schneider-Stock, R.(2004). The medical potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components: New trends in research strategies on lead molecules from natural products. Elsevier Inc. Amsterdam.

Ganong, W.F. (2003). Review of Medical Physiology 21st ed. Lange Medical Books /McGraw Hill Medical Publishing Division.

Gaoua, N. (2010). Cognitive function in hot environments: a question of methodology. Scand. J. Med. Sci. Sports, 20(3):60–70.

Ghosheh, O. A.; Houdi, A. A. and Crooks, P. A.(1999). High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). J. Pharmac. Biom. Anal.,19(5) : 757–762.

Girard, O.; Brocherie, F. and Bishop, D. J.(2015). Sprint performance under

heat stress: A review. Scand. J. Med. Sci. Sports, 25 (1):1-12.

Goloubinoff, P. and De Los Rios, P. (2007). The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together.Trends Biochem Sci.,32(8):372-80.

Gomes, C.G.; Zuniga, J.E.; Karakaya, E.; Greco, L.F.; Sinedino, L.D. ; Martinez, N. ; Bisinotto, R.S. ; Ribeiro, E.S.; Leopoldo, P.M.; Engstrom, M.A.; Driver, J.P.; Santos, J.E. and Staples, C. R. (2013). Effects of prepartum evaporative cooling and vitamin E supple-mentation on immune function of Holstein cows during summer in Florida. J. Dairy Sci., 97(1): 725.

Gore, P. R.; Prajapati, C. P.; Mahajan, U. B.; Goyal, S. N.; Belemkar, S.; Ojha, S. and Patil, C. R. (2016).Protective effect of thymoquinone against cyclo-phosphamide induced hemorrhagic cystitis through inhibiting DNA damage and up regulation of Nrf2 expression. Int. J. Biol. Sci., 12(8): 944-953.

Gosslau, A.; Ruoff, P.; Mohsenzadeh, S.; Hobohm, V. and Rensing L. (2001) Heat shock and oxidative stress induced exposure of hydrophobic protein domains as common signal in the Induction of hsp68. J. Biol. Chem., 276(3):1814-1821.

Gu, X. H.; Hao, Y. and Wang, X. L.(2012). Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: Intestinal oxidative stress. Poult. Sci., 91:790–799.

Gudev, D.; Popova-Ralcheva, S.; Moneva, P.; Aleksiev, Y.; Peeva, T.; Ilieva, Y. and Penchev, P. (2007). Effect of heat-stress on some physiological and biochemical parameters in buffaloes. Ital. J. Anim. Sci., 6 (2): 1325-1328.

Guerreiro, E.N.; Giachetto, P.F.; Givisiez, P., Ferro, J.A.; Ferro, M.I.; Gabriel, J.E.; Furlan, R.L. and Macari, M, (2004). Brain and hepatic Hsp70 protein levels in heat-acclimated broiler chickens during heat stress. Braz. J. Poult. Sci., 6 (4) :201 – 206.

***Guida**, M. S. ; AbdEl-Aa, A.; Kafafy, Y.; Salama, S. ; Badr, B. M. and Badr, G.* (2016*). Thymoquinone rescue t lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis and exhaustion by modulating pro-inflammatory cytokine levels and PD-1, Bax, and Bcl-2 signaling.* Cell Physiol. Biochem1., 38(2):786-800.

Gullu, E. B. and Avci, G. (2013). Effects of thymoquinone on plasma leptin, insulin, thyroid hormones and lipid profile in rats fed a fatty diet. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. : 9345

Gunes, A. (2005). The production of thymoquinone from thymol and carvacrol by using zeolite catalysis. Msc. Thesis, School of Engineering and

Sciences of Izmir Institute of Technology, Turkey.

Guyton, A.C. and Hall, J.F. (2006). Textbook of Medical Physiology. 11th ed., Elsevier Saunders Inc. Philadelphia.

Halberstein, R. A. (2005). Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. Ann. Epidemiol., 15(9): 686-699.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1989). Free radicals in biology and medicine. Clarendon press. Oxford, pp. 16, 28, 37, 100, 106, 147.

Halliwell, B. and Guttteridge, J.M. (2007) .Free Radicals in Biology and Medicine Oxford University Press, Clarendon, Oxford pp. 221–238

Hamady, J. J (2011). Immunological Effects of Methanolic and Phenolic Extracts of *N. sativa* Seed in Chronic Heat-Stressed Male Wistar Rats. M.Sc. thesis, College of Veterinary Medicine. Al-Qadisiya University.

Hamady, J.J.; Abdel Karim, H. and Abdul Kadhum, E. (2015).Testicular heat shock protein effects of methanolic and Pphenolic extracts of *N. sativa* seed in chronic heat-stressed male wistar rats. Wasit J. Sci. Med.,8(2): 128 -137.

Harvey, A.; Edrada-Ebel, R. and Quinn, R. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. Nature Rev. Drug Disc., 14(2), 111–129.

He, J.; Yu, Y.; Chen, X.; Sun, W.; Fang, F.; Li, N. and Zheng, J.(2010). Research progress on drug, of flavanoids. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 35.2794 -2789 .

Herbette, S.; Roeckel-Drevet, P. and Drevet, J. R.(2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. more than simple antioxidant scavengers. FEBS J. 274 : 2163-2180.

Holmberg, C.I.; Hietakangas, V.; Mikhailov, A.; Rantanen, J.O.; Kallio, M.; Meinander, A.; Helman, J.; Morrice, N.; Mackintosh, C.; Morimoto, R.I.; Eriksson, B.E. and Sistonen, L. (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor-1. EMBO J.14: 3800-3810.

Horowitz, M. (2002). From molecular and cellular to integrative heat defence during exposure to chronic heat. J. Comparative Biochem. Physiol., 131(3): 475–483.

Hosseini, S. M.; Afshar, M.; Ahani, S. and Azghandi, M.V.(2015). Heat shock protein70 mRNA expression and immune response of heat-stressed finishing broilers fed propolis (bee glue) supplementation. Arch. Anim. Breed., 58: 407–413.

Hyde, R.M.(2000). Immunology .4th ed. Lippincott Williams and Wilkins , A wolters Kluwer Company .

Ikeuchi, M.; Sugimoto, K. and Iwase, A.(2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. Plant Cell, 25: 3159–3173.

Ismail, M.; Al-Naqeep, G. and Chan, K. W. (2010). *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. Free Radic. Bio. Med., 48(5): 664–672.

Ismail, N.; Ismail, M.; Azmi, N.; Abu Bakar, M.F.; Basri, H. and Abdullah, M. A. (2016). Modulation of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human neuronal cells by thymoquinone-rich fraction and tThymoquinone via transcriptomic regulation of antioxidant and apoptotic signaling genes. Oxid. Med. Cell. Longev., 2016:1-15.

Ismail, R.A. (2013).Reproductive performance of Ossimi rams in summer season under different amelioration strategies of heat stress. M.Sc. Thesis, Fac. Agric., Fayoum Univ., Fayoum, Egypt.

Jeyapaul, J. and Jaiswal, A.K. (2000). Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. Biochem. Pharmacol. 59: 1433-1439.

Jomova, K.; Vondrakova, D.; Lawson, M. and Valko, M.(2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. Mol. Cell Biochem., 345: 91-104.

Kachmar, J. and Moss, D. (1982). Enzymes. In: Fundamentals of Clinical Chemistry. Tietz (ed.).2nd ed. Saunders Co., London. P: 565.

Kanter, M. (2009). Effects of *Nigella sativa* seed extract on ameliorating lung tissue damage in rats after experimental pulmonary aspirations. Acta. Histochem., 111: 393–403.

Kanter, M. (2011).Thymoquinone reestablishes spermatogenesis after testicular injury caused by chronic toluene exposure in rats. Toxicol. Ind. Health 27 (2) :155-166.

Karthikeyan, J. and Rani, P.(2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in selected piper species. Indian J. Exp. Biol., 41: 135-140.

Kataria, N.; Kataria, A.K.; Chaturvedi, M. and Sharma, A. (2011). Changes in serum enzymes levels associated with liver functions in stressed Marwari goat. J. Stress Physiol. Biochem., 7 (1): 13-19.

Kataria, N.; Kataria, A and Gahlot, A. K. (2008). Ambient temperature associated variation in serum hormones and interrelated analysis of broiler chickens in arid tract. Slov. J. Vet. Res., 45: 127-134.

Kataria, N.; Kataria, A. K.; Pandey, N. and Gupta, P. (2010). Serum biomarkers of physiological defense against reactive oxygen species during environmental stress in Indian dromedaries. Human Vet. Med.

Bioflux. 2:55-60.

Katschinski, D.M. (2004). On heat and cells and proteins. News Physiol. Sci., 19: 11-5.

Khalife, K.H. and Lupidi, G. (2007). Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. Free Radic. Res.; 41: 153-161.

Khalil, A.A.; Kabapy, N.F.; Deraz, S.F. and Smith, C. (2011). Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? Biochim. Biophys. Acta, 1816(2): 89-104.

Khan, A.; Tania, M.; Wei, C.; Mei, Z.; Fu, S.; Cheng, J.; Xu, J. and Fu, J. (2015). Thymoquinone inhibits cancer metastasis by down regulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition Oncotarget. 6(23): 19580–19591.

Khodaei-Motlagh, M.; Shahneh, A.Z.;. Masoumi, R. & Derensis, F. (2011). Alterations in reproductive hormones during heat stress in dairy cattle. African J. Biotech., 10 (29) : 5552-5558.

Kibanova, D.; Nieto-Camacho, A. and Cervini-Silva, J. (2009). Lipid peroxidation induced by expandable clay minerals. Environ. Sci. Technol., 43: 7550-7555.

Kim, H.G.; Kim, T.M.; Park, G.; Lee, T.H. and Oh, M.S. (2013). Repeated heat exposure impairs nigrostriatal dopaminergic neurons in mice. Biol Pharm Bull., 2:22-35.

Kim, K. J.; Yoon, K. ; Hong, H. and Lee, B.Y. (2015). Role of the red ginseng in defense against the environmental heat stress in sprague dawley rats. Molecules, 20:20240–20253.

Kim, K.J.; Hong, H.D.; Lee, O.H. and Lee, B. (2010). The effects of *Acanthopanax senticosus* on global hepatic gene expression in rats subjected to heat environmental stress. Toxicology, 278:217–223.

Kim, K.J.; Yoon, K.Y.; Hong, H.D. and Lee, B.Y. (2012). *Schisandra chinensis* prevents hepatic lipid peroxidation and oxidative stress in rats subjected to heat environmental stress. Phytother. Res., 26:1674–1680.

Klaassen, C.D. and Reisman, S.A. (2010). Nrf2 the rescue: Effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. Toxicol. Appl. Pharmacol., 244:57–65.

Koivula, M. J.; Kanerva, M.; Salminen, J. P.; Nikinmaa, M. and Eeva, T.(2011). Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit (*Parus major*) nestlings. Environ. Res., 111:362 -370 .

Kregel, K. C. (2002). Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J. App.

Physiol., 92 (5): 2177-2186.

Kumar, S.; Kataria, M. and Kumar, A.(2011). Amelioration of Heat Stress by feeding electrolytes, ascorbic acid and zinc in buffaloes. Buffalo Bull. 30 (4).

Kunz-Plapp, T.; Hackenbruch, J. and Schipper, J. W. (2016). Factors of subjective heat stress of urban citizens in contexts of everyday life. Nat. Hazards Earth Syst. Sci., 16:977–994.

Lakritz, J.; Leonard, M.J.; Eichen, P.A.; Rottinghaus, G.E.; Johnson, G.C. and Spiers, D. E.(2002). Whole-blood concentrations of glutathione in cattle exposed to heat stress or a combination of heat stress and endophyte-infected tall fescue toxins in controlled environmental conditions. Am. J. Vet. Res., 63 (6):799-803.

Lallawmkimi, C. (2009). Impact of thermal stress and vitamin-E supplementation on heat shock protein 72 and antioxidant enzymes in Murrah buffaloes. Ph.D. Thesis NDRI deemed University, Karnal (Haryana), India.

Latchman, D. S. (2001). Heat shock proteins and cardiac protection review. Cardiovas. Res., 51 637–646.

Lazarevic, M.;Zikie, D. and Uscebrka,G. (2000). The influence of long term sound stress on the blood leukocyte count, hetrophil/lymphocyte ratio and cutaneous basophil in broiler chickens . Acta Vet. Belgrade., 50:63 –76 .

Lebda, F.M.; Ahmed, M.A.; Abd El Samad, A.A. and Shawky, M.K. (2011). Protective effect of thymoquinone against D-galactosamine-induced liver injury in rats. Aust. J. Basic App. Scie., 5: 49-58.

LeBlanc, P.; De Jonge, J. and Schaufeli, W. (2000). Job Stress and Health. In: Introduction to Work and Organisational Psychology, Chmiel. N.(Ed), Oxford, Black Well Publishers.

Lee, W. ; Moon, M.; Kim, H.; Lee, T. and Oh, M.S. (2015). Heat stress induced memory impairment is associated with neuroinflammation in mice. J. Neuroinfl., 12: 102-114.

Leger, J. P.; Smith, F.M. and Currie, R.W. (2000). Co focal microscopic localization of constitutive and heat shock induced proteins HSP70 and HSP27 in the rate heart. Circulation, 102(14) :1703.