جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية/كلية التربية/قسم الكيمياء

زيادة فعالية انزيم الميلوبيروكسيدز وضعف فعالية المايتوكوندريا

تطيل الاستجابة الالتهابية الحادة في مرضى القدم السكري ٠

رسالة مقدمة الى عمادة كلية التربية في جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في الكيمياء الحياتية

من قبل

اشواق عودة عباس

بكالوريوس كيمياء/ جامعة بغداد/ ١٩٩٢

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتورة أنوار جاسب ثعبان

١٤٣٨هجرية ٢٠١٧ميلادية

صدق الله العظيم

سورة الكوثر(الآيات ١-٣)

الاهداء

اهدي جهدي المتواضع هذا الى :
كل من ضحى بنفسة من اجل العراق
من الحشد الشعبي والقوات المسلحة.

الباحثة/ أشواق

شكر وتقدير (Acknowledgements)

أولا وقبل كل شيء، أو د أنْ أعرب عن خالص تقديري وشكري للمشرف الأستاذ المساعد الدكتورة أنوار جاسب لاقتراحها موضوع هذه الرسالة ولتوجيهاتها القيمة طوال مدة إعداد الرسالة فجزاها الله خير الجزاء٠

وأود أيضا أنْ أعرب عن امتناني وتقديري العميق للدكتور علي فوزي لمساعدته لي في جمع عينات الدم من مرضى القدم السكري في مستشفى الديوانية التعليمي٠

وأتوجه بالشكر أيضا إلى كل العاملين في مختبر مستشفى الديوانية التعليمي لمساعدتهم لي في جمع نماذج الدم والحصول عليها٠

وأتقدم بخالص شكري وامتناني إلى عمادة كلية الطب/جامعة القادسية لما قدموه لي من معونة وتسهيل وذلك بالعمل في مختبر بحوث الكيمياء الحياتية التابع إلى فرع الكيميا ء الحياتية في الكلية٠

الطالبة / أشواق

إقرار المشرف على الرسالة

اقر ان الرسالة الموسومة ب(زيادة فعالية انزيم MPO وضعف المايتوكوندريا تطيل الاستجابة الالتهابية الحادة في مرضى القدم السكري) قد اشرفت عليها في كلية الطب بجامعة القادسية وهي من متطلبات

نيل شهادة الماجستير في علوم الكيمياء تخصص الكيمياء الحياتية٠

التوقيع:

المشرف:د٠أنوار جاسب ثعبان

الاختصاص: كيمياء حياتية سريرية

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الطب/جامعة القادسية

التاريخ: / / 2017

إقرار رئيس القسم/مقرر لجنة الدارسات العليا

بناء على التوصيات المقدمة من قبل المشرف٠ارشح هذه الرسالة للمناقشة٠

رئيس قسم الكيمياء

التوقيع:

الاسم:د٠ليث سمير جاسم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / 2017

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن اعضاء لجنة المناقشة اننا اطلعنا على الرسالة الموسومة ب(زيادة فعالية انزيم الميلوبيروكسيدز وضعف فعالية المايتوكوندريا تطيل الاستجابة الالتهابية الحادة في مرضى القدم السكري) وناقشنا الطالبة (أشواق عودة عباس علي) في محتوياتها بتاريخ ٢٠١٧/٤/٢٦وهي جديرة بالقبول شهادة الماجستير في علوم الكيمياء تخصص الكيمياء الحياتية وبتقدير(امتياز)٠

رئيس اللجنة:

التوقيع:

الاسم: د٠فاضل جواد طعمة

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء /كلية الطب

التاريخ: ١٦/٥/٢٠١٧

عضو اللجنة:

التوقيع:

الاسم: د٠حيدر عبد جبار

المرتبة العلمية: مدرس

العنوان: جامعة القادسية/كلية الطب

التاريخ: ١٧/٥/٢٠١٧

عضو اللجنة:

التوقيع:

الاسم : د٠محمود حسين هدوان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة بابل/كلية العلوم

التاريخ: ١٦/٥/٢٠١٧

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:

الاسم: د٠أنوار جاسب ثعبان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة القادسية/كلية الطب

التاريخ: ١٦/٥/٢٠١٧

مصادقة عميد كلية التربية /جامعة القادسية

التوقيع:

الاسم:أ٠د خالد جواد العادلي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: عميد كلية التربية/جامعة القادسية

التاريخ: ٢٠١٧/٥/٢٨

الخلاصة (Summary)

يُعدّ مرض السكري من الأمراض الاستقلابية التي توجد فيها مستويات عالية من السكر في الدم على مدى مدّة طويلة من الزمن ،وإذا ترك مرض السكري من دون علاج فيمكن أن يسبب العديد من المضاعفات مثل قرحة القدم السكري الذي هو مرض يصيب مرضى السكري النوع الثاني من خلال ظهور بعض الاعراض المرضية في القدم مثل التورم والجروح والقروح ،نتيجة الاعتلال العصبي أو قصور الدورة الدموية نتيجة ارتفاع مستوى السكر ٠دور الأكسدة في قرحة القدم السكري (DFU)تم توثيقه بشكل جيد ،ولكن تأثيره في الاستجابة الالتهابية ليس مفهوما ولاسيما في ما يتعلق بأنزيم الميلوبيروكسيدز(MPO)وضعف الميتوكوندريا٠وبينت هذه الدراسة أن زيادة فعالية أنزيم الميلوبيروكسيدز ومستويات مركبات الأوكسجين الفعالة (ROS) مع ضعف الميتوكوندريا ،تساعد على الاستجابة الحادة في قرحة القدم السكري(DFU) من خلال تعزيز دفاعات الخلايا المناعية غير الالتهابية وموت الخلايا ٠

تم جمع عينات دم من المرضى الذين يعانون من قرحة القدم السكري (30عينة)،وكذلك 30عينة دم من الأشخاص الأصحاء بوصفها ضوابط (Control) من مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى السماوة التعليمي الأنزيمات المضادة للأكسدة مثل أنزيم السوبراوكسيددسموتاز(SOD) وأنزيم الكاتاليز(CAT) وكذلك الحركيات الخلوية مثل عامل نخر الورم (TNF-α) وأنتر لوكين -٦(IL-6) وأنزيم الميلوبيروكسيدز(MPO) قد تم تحليلها من خلال تقنية ELISA،في حين تم قياس وظيفة الميتوكوندريا عن طريق المجهرالمتفلور(Fluorescence microscope) وقياس التعبير الجيني BCL-2 بوساطة تقنية qPCR٠أظهرت النتائج انخفاض في مستويات الانزيمات المضادة للأكسدة أنزيم السوبراوكسيددسموتاز(SOD) وأنزيم الكاتاليز(CAT) في المرضى الذين يعانون من قرحة القدم السكري (DFU) مقارنة مع الأصحاء ($P < 0.05$) ٠ بينما اظهرت مستويات السايتوكينات الموالية للالتهابات مثل (TNF-α,IL-6)وكذلك انزيم MPO زيادة في مرضى القدم السكري مقارنة مع الأصحاء،ولوحظ أيضا انخفاض التعبير الجيني BCL-2مع ضعف المايتوكوندريا من خلال استخدام صبغة Mitotracker الخضراء في مرضى القدم السكري مقارنة مع الأصحاء٠

الاستنتاجات / خلصت نتائج الدراسة إلى أن إنتاج مركبات الأوكسجين الفعالة (ROS) في مرضى القدم السكري مع فعالية MPO الناجم عن السايتوكينات الالتهابية التي بدورها تعزز موت الخلايا المبرمج وضعف وظيفة المايتوكوندريا٠

قائمة المحتويات(List of contents)

التسلسل	العنوان	Tittle	الصفحة
	الخلاصة	Summary	I
	قائمة المحتويات	List of contents	II- VI
	قائمة الجداول	List of Tables	VI- VII
	قائمة الاشكال	List of Figures	VII - IX
	قائمة الرموز والمختصرات	List of symbols and Abbreviations	X- XIII
الفصل الاول(المقدمة)		**Chapter one(Introduction)**	
1.1	نظرة عامة على مرض السكري	Overview on Diabetes Mellitus	1
1.2	تشخيص مرض السكري	Diagnosis of Diabetes Mellitus	3
1.3	تصنيف مرض السكري	Classification of Diabetes	3
1.3.1	النوع الاول من السكري	Type 1 of Diabetes	3
1.3.2	النوع الثاني من السكري	Type 2 Diabetes	4
1.3.3	سكري الحمل	Gestational of Diabetes	5
1.4	مضاعفات مرض السكري	Complications of Diabetes	5

6	Diabetes foot disease	مرض القدم السكري	1.5
8	Pathogenesis of Diabetic foot	مرضية القدم السكري	1.5.1
10	Pathophysiology of Diabetic foot	الفيزيولوجية المرضية للقدم السكري	1.5.2
10	Oxidants	المواد المؤكسدة	1.6
11	Free radicals	الجذور الحرة	1.6.1
13	Oxidants	المواد المؤكسدة من غير الجذور الحرة	1.6.2
13	Antioxidants	مضادات الاكسدة	1.7
14	Enzymatic antioxidants	مضادات الاكسدة الانزيمية	1.7.1
14	Catalase enzyme	انزيم الكاتاليز	1.7.1.1
14	SOD enzyme	انزيم SOD	1.7.1.2
15	Non-Enzymatic antioxidants	مضادات الاكسدة غير الانزيمية	1.7.2
23	Oxidative stress	الاجهاد التأكسدي	1.8
21	Myeloperoxidase MPO	انزيم الميلوبيروكسيدز	1.9
23	Mitochondria and diabetic foot	المايتوكوندريا والقدم السكري	1.10
27	dysfunction causes impaired insulin Mitochondrial action	ضعف كفاءة المايتوكوندريا يسبب اعاقة عمل الانسولين	1.10.1
28	Inflammation	الالتهاب	1.11
29	Cytokines	السايتوكينات	1.12
29	Tumor factor necrosis TNF-α	عامل نخر الورم	1.12.1

1.12.2	انترلوكين-٦	Interlukin-6	30
1.12.3	السايتوكينات ومرض القدم السكري	Cytokines and diabetic foot	30
الفصل الثاني (المواد وطرق العمل)			
2-1	المواد الكيمياوية	Chemicals	36
2-2	المعدات	Equipment	37
2-3	مكونات العدة	Kit components	38
2-4	تصميم الدراسة	Study design	39
2-4-1	اعتبارات اخلاقيات العلوم الحيوية	Bioethical considerations	39
2-4-2	اختيار المرضى وبروتكول الدراسة	Patients selection and study protocol	39
2-5	جمع عينات الدم	Sample collection	35
2-6	قياس فعالية انزيم SOD في بلازما الدم	Measurement of plasma SOD activity	40
2-6-1	مبدا الاختبار بطريقة ELISA	Test principle by ELISA	41
2-6-2	تحضير الكواشف	Reagents preparation	41
2-6-3	طريقة العمل	Procedure	43
2-7	قياس فعالية انزيم CAT في البلازما	Measurement of plasma CAT activity	43
2-7-1	مبدا الاختبار بطريقة ELISA	Test principle by ELISA	43
2-7-2	تحضير الكواشف	Reagents preparation	44
2-7-3	طريقة العمل	Procedure	45
2-8	قياس فعالية عامل نخر الورم(TNF-α)	Measurement of plasma TNF- α activity	46
2-8-1	مبدا الاختبار بطريقة ELISA	Test principle by ELISA	47
2-8-2	تحضير الكواشف	Reagents preparation	47

2-8-3	طريقة العمل	Procedure	49
2-9	قياس انترلوكين-٦ في بلازما الدم	Measurement of plasma IL-6 activity	50
2-9-1	مبدا الاختبار بطريقة ELISA	Test principle by ELISA	50
2-9-2	تحضير الكواشف	Reagents preparation	51
2-9-3	طريقة العمل	Procedure	52
2-10	قياس فعالية MPO في بلازما الدم	Measurement of plasma MPO activity	53
2-10-1	مبدا الاختبار بطريقة ELISA	Test principle by ELISA	54
2-10-2	تحضير الكواشف	Reagents preparation	55
2-10-3	طريقة العمل	Procedure	56
2-11	حساب النتائج	Calculation of results	56
2-12	عزل خلايا الوحيدة النواة من الدم المحيطي	Peripheral blood mononuclear cell	56
2-12-1	مبدا الاختبار	Test principle	56
2-12-2	طريقة العمل	Procedure	57
2-13	قياس فعالية المايتوكوندريا في الخلايا المناعية	Measure the effectiveness of mitochondria in immune cells	58
2-14	قياس التغبير الجيني BCL-2 بواسطة تقنية PCR	Measuring of gene change of bcl-2 by PCR	59
2.14.1	استخلاص RNA من خلايا PBMC	Extraction of RNA from PBMC cell	59
	مبدا الاختبار	Test principle	59
2.14.2	طريقة العمل	Procedure	61
2.14.3	تحويل RNA الى cDNA	Conversion of RNA to	61

	Cdna		
62	Procedure	طريقة العمل	2.14.3.1
62	Polymerase chain Reaction PCR	تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي	2.14.4
62	Test principle	مبدأ الاختبار	2.14.4.1
62	Procedure	طريقة العمل	2.14.4.2
63	Primer design	تحضير البرايمرات	2.14.4.3
64	Statistical analysis	التحاليل الاحصائية	2.15
Chapter Three(Results and Discussion)		**الفصل الثالث(النتائج والمناقشة)**	
65	Levels of antioxidant enzymes in diabetic foot ulcers foot	مستوى فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة في مرضى القدم السكري	3-1
67	Levels of proinflammatory cytokines in diabetic foot ulcers	مستوى السايتوكينات المسببة للالتهاب في مرضى قدم السكري	3-2
69	Levels of MPO	مستوى فعالية انزيم MPO	3-3
70	The effectiveness of mitochondria	فعالية المايتوكوندريا	3-4
74	BCL-2 gene expression	التعبير الجيني ل BCL-2	3-5
74	Conclusions	الاستنتاجات	3-6
74	Recommendations	التوصيات	3-7
75	References	المصادر	

قائمة الجداول (List of Tables)

الفصل الاول(المقدمة) Chapter one(Introduction)		
رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-1	معايير تشخيص مرض السكري	3
1-2	مركبات الاوكسجين الفعالة(ROS)	11
1-3	الاجهاد التأكسدي وأضراره في الجسم	17
الفصل الثاني(المواد وطرق العمل) chapter two(Materials and Methods)		
2-1	المواد الكيمياوية والعدد kits المستعملة في الدراسة	36
2-2	الادوات المستخدمة في الدراسة	36
2-3	مكونات العدة(ELISA kit components)	37
2-4	النماذج والمجاميع المستخدمة في الدراسة	40
2-5	محتويات العدة(kit contents)	40
2-6	محتويات العدة(kit contents)	59
2-7	محتويات العدة(kit contents)	61
2-8	طريقة العمل PCR	63
2.9	اسم وتسلسل البرايمرات	63

قائمة الاشكال(List of Figures)

الفصل الاول(المقدمة) Chapter one(Introduction)		
رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-1	القدم السكري	8
1-2	ميكانيكية القدم السكري	9
1-3	مصادر مركبات الاوكسجين الفعالة(ROS)	13
1-4	ارتفاع مستوى الكلوكوز يحفز مسار Polyol	21

1-5	ميكانيكية انزيم MPO	23
1-6	زيادة مستوى الكلوكوز يحفز انتاج ROSمن الميتوكوندريا الذي بدورة يحفز (Poly(ADP-ribose(polymerase,PARP))NAD	26
1-7	ميكانيكية ضعف التئام الجروح لمرضى القدم السكري	33
1-8	تركيب BCL-2	34
الفصل الثاني(المواد وطرق العمل) chapter two(Materials and Methods)		
2-1	تصميم الدراسة	39
2-2	تحضير المحلول القياسي لقياس فعالية انزيم SOD	42
2-3	المنحني القياسي لأنزيم SOD	43
2-4	تحضير المحلول القياسي لقياس فعالية انزيم CAT	44
2-5	صفيحة ELISA انزيم CAT	45
2-6	المنحني القياسي لأنزيم CAT	46
2-7	تحضير المحلول القياسي لقياس عامل نخر الورم(TNF-α)	48
2-8	صفيحة ELISA عامل نخر الورم	49
2-9	المنحني القياسي لعامل نخر الورم TNF-α	50
2-10	تحضير المحلول القياسي لقياس انترلوكين-٦	51
2-11	المنحني القياسي لأنزيم IL-6	53
2-12	تحضير المحلول القياسي لقياس انزيم MPO	54
2-13	صفيحة ELISA انزيم MPO	55
2-14	المنحني القياسي لأنزيم MPO	56
2-15	عزل خلايا PBMCمن الدم	58
الفصل الثالث(النتائج والمناقشة) Chapter Three(Results and Discussion)		

3-1	مستوى انزيم CAT في مرضى قدم السكري	66
3-2	مستوى انزيم SOD في مرضى قدم السكري	67
3-3	مستوى انزيم TNF-α في مرضى قدم السكري	68
3-4	مستوى انزيم IL-6 في مرضى قدم السكري	69
3-5	مستوى انزيم MPO في مرضى قدم السكري	70
3-6 A	صور المايتوكوندريا في خلايا PBMC في مجموعة السيطرة٠	72
3-6 B,C,D	صور المايتوكوندريا في خلايا PBMC في مجموعة القدم االسكري	72
3-7A	مستوى التعبير الجيني ل BCL-2 في خلايا PBMC لدى مرضى قدم السكري	73
3-7 B	صور ناتج PCR في جل 1%Agarose	73

قائمة الرموز والمختصرات(List of Symbols and Abbreviations)

المختصر	الاسم باللغة العربية	الاسم باللغة الانكليزية
$RO^{\cdot}$	جذر الوكسي	Alloxy radical
ATP	ادينوسين ثلاثي الفوسفات	Adenosine tri phosphate
AD	مرض الزهايمر	Alzheimer s disease
ADP	ادينوسين ثنائي الفوسفات	Adenine Di phosphate
PH	الدالة الحامضية	Acidic function
AGF	المنتجات النهائية المتقدمة لغلكايشن	Advanced Glycation end products
A	ادنين	Adenine
Bcl-2	B-خلية سرطان الغدد اللمفاوية	B-Cell lymphoma-2
Bcl-XL	Bcl-2 شكل ١	Bcl-2-like 1 isoform
BH	تناظر-Bcl-2	Bcl-2-homology

Bax	Bcl-2 المرتبطة مع البروتين x	Bcl-2-associated x protein
Bak	Bcl-2 الخصم	Bcl-2-antagonist killer
Bid	BH_3-التفاعل المضاد لموت الخلايا	BH_3-interacting domain death agonist
CAT	انزيم الكاتاليز	Catalase enzyme
C	سايتو سين	Cytosine
DNA	الحامض النووي الريبي منقوص الاوكسجين	Deoxy Ribonucleic Acid
DG	ثنائي اسيل غليسرول	Diacylglycerol
DMSO	ثنائي مثيل سلفوكسيد	Dimethyl sulfoxide
D.W	ماء مقطر	Distilled Water
DFU	قرحة القدم السكري	Diabetic foot ulcers
ELISA	فحص الانزيم المرتبط المناعي	Enzyme- Linked Immunosorbent assay
EDTA	اثيلين ثنائي امين رباعي حامض الخليك	Ethylenediamine tetra acetic acid
Fe^{+2}	ايون الحديد وز	Ferrous iron
Fe^{+3}	ايون الحديديك	Ferric iron
$FADH_2$	ثنائي نيوكليوتيد الادنين فلافين المختزل	Flavin Adenine Dinucleotide
GPx	كلوتاثيون بيروكسيدز	Glutathione Peroxidase
GLU T_4	ناقل الكلوكوز الحساس للأنسولين	Glucose Transport
HbA1c	الهيموغلوبين السكري	Glycated hemoglobin
G	غوانين	Guanine
HOCL	حامض تحت الكلور	Hypochlorus
HDL-C	البروتين الدهني عالي الكثافة الكوليسترول	High Density Lipoprotein
$^{\cdot}OH$	جذر الهيدروكسيد	Hydroxyl radical

H_2O_2	بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen Peroxide
HRP	هوردج بيروكسايدز المقترن	Horse-radish Peroxidase
IDF	الاتحاد الدولي للسكري	International Diabetes Federation
IDDM	مرض السكري المعتمد على الانسولين	Insulin dependent diabetes mellitus
NIDDM	مرض السكري الغير معتمد على الانسولين	Insulin independent diabetes mellitus
IR	الاشعة تحت الحمراء	Infrared
IRS	جزيئات مستقبلات الانسولين	Insulin Receptor Substrate
IL-6	انترلوكين – ٦	Interleulin-6
IL-1	انترلوكين –١	Interleulin-1
IL-12	انترلوكين –١٢	Interleulin-12
IL-10	انترلوكين –١٠	Interleulin-10
IL-4	انترلوكين –٤	Interleulin-4
LDL-C	البروتين الدهني منخفض الكثافة الكوليسترول	Low Density Lipoprotein
VLDL-C	البروتين الدهني منخفض الكثافة جدا الكوليسترول	Lipoprotein,very Low Density
LPO	دهون البيروكسيد	Lipid Peroxidation
ALS	مرض التصلب العضلي الجانبي	Lateral sclerosis Muscular
MPO	انزيم الميلوبيروكسيدز	Myeloperoxidase
MDA	مالونايالدهيد	Malondialdehyde
MtDNA	الحامض النووي المايتوكوندري	mitochondrial DNA
Mn-SOD	انزيم SOD المرتبط مع المنغنيز	manganese superoxide dismutase
NADPH	ثنائي نيوكليوتيد الادنين	Nicotinamide Adenine

Dinucleotide plus Hydrogen phosphate	والنيكوتينااميدالفوسفات	
Nitric Oxide	اوكسيد النتريك	NO
Nitrogen dioxide	ثنائي اوكسيد النيتروجين	NO_2
Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen	ثنائي نيوكليوتيد الادنين والنيكوتين أميد	NADH
Nitric Oxide Synthase	سينسيز أكسيد النيتريك	NOS
Nuclear Factor Kb	العامل النووي	NF-Kb
Optical Density	الكثافة الضوئية	O.D
Oxygen	اوكسجين	O_2
Proxy radical	جذر بروكسي	$ROO^{\cdot}$
Peroxynitrite	بروكسي نيتريت	$ONOO^{-}$
Protein Products	المنتجات البروتينية	AOPP
Protein-53	بروتين-٥٣	P_{53}
Parkinson s disease	مرض باركنسون	PD
Phosphatidylinositol	فوسفادايلسيتول	$P_{13}k$
Polymerase chain reaction	تفاعل البوليمر المتسلسل	PCR
Phosphate Buffered Saline	محلول فوسفات بفر	PBS
Peripheral blood mononuclear cells	الخلايا الدموية وحيدة النواة	PBMC
Paraformaldehyde	بارا فورملدهايد	PFA
Reactive oxygen species	مركبات الاوكسجين الفعالة	ROS
Reactive Nitrogen species	مركبات النيتروجين الفعالة	RNS
Ribonucleic Acid	الحامض النووي الريبي	RNA
Reduced glutathione	كلوتاثيون المختزل	GSH
Super oxide anion	ايون السوبر اوكسيد	$O_2^{\cdot -}$

SD	الانحراف المعياري	Standard Deviation
SE	خطا القياس	Standard Error
SOD	السوبر اوكسيد دسموتاز	Super oxide dismutase
AKT	سيرين/ثريونين بروتين كيناز	Serine/threonine kinase protein kinase B
H_2SO_4	حامض الكبريتيك	sulfuric acid
N_2O_3	ثلاثي اوكسيد النيتروجين	Nitrogen trioxide
TCA	ثلاثي حامض الكاربوكسيلك	Tri carboxylic Acid
TNF-α	عامل نخر الورم- الفا	Tumor Necrosis Factor-alpha
TMB	رباعي مثيل بنزيدين	Tetra methyl Benzedine
T	ثيامين	Thiamine
UV	الاشعة فوق البنفسجية	Ultra Violet
WHO	منظمة الصحة العالمية	World Health Organization
Zn-SOD	انزيم SOD المرتبط مع الخارصين	Zinc superoxide dismutase

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

1.المقدمة

1.1 مرض السكري (Diabetes Mellitus)

نظرة عامة (Overview)

منذ قرون تم التعرف على داء السكري ،والإصابة بمرض السكري يمكن أن تؤدي إلى مجموعة متنوعة من المضاعفات التي تهدد حياة الانسان[1]، وعلى الرغم من الجهود المبذولة للسيطرة على المرض لكن انتشاره في ازدياد على الصعيد العالمي[2]،إذ بلغ معدل الاصابة المقدر لجميع أنواع السكري 366 مليون في عام 2011،وتشير التوقعات الى أنّ عدد الأشخاص الذين يعانون من مرض السكري سوف يرتفع الى 552 مليون بحلول عام 2030 وفقا لأرقام جديدة صادرة عن الاتحاد الدولي للسكري (International Diabetes Federation(IDF)[3]، وتعد الصين، والهند، والولايات المتحدة الأمريكية، وروسيا والبرازيل من أكثر الدول التي فيها أكبر عدد من المصابين بمرض السكري ٠في عام 2011 تم تشخيص ما يقرب من 2.9 مليون شخص يعانون من مرض السكري في المملكة المتحدة وتشير التقديرات إلى أن العدد سوف يرتفع الى خمسة ملايين شخص بحلول عام 2025،وعلاوة على ذلك تشير التقديرات الى أن هناك 850 ألف شخص في المملكة المتحدة الذين لديهم مرض السكري، ولكن لا يعلمون أو لم يتأكد تشخيصهم ،بالإضافة إلى العوامل الوراثية هناك مجموعة واسعة من العوامل التي تسببت في هذه الزيادة الهائلة في عدد مرضى السكري في العقود الأخيرة ،هذه العوامل هي: النمو الاجمالي في عدد السكان ، وزيادة متوسط العمر المتوقع ،ممّا أدى الى مستوى أعلى من مرض السكري ، وزيادة السمنة ، والنظم الغذائية غير الصحية ،و أنماط الحياة المترفة٠

توجد تداخلات مثل تعديل النظام الغذائي وزيادة النشاط البدني التي تؤدي دورا مهماً في السيطرة على مرض السكري[4]٠ إنّ انتشار مرض السكري أخذ في الارتفاع في جميع أنحاء العالم بسبب التحضر وزيادة السمنة ،ففي عام 2014م كان معدل الانتشار العالمي للسكري يقدر بنحو 9% بين البالغين الذين أعمارهم 18عاما أو أكثر [5]، وفي عام 2012م كان مرض السكري سببا مباشرا في نحو 1.5 مليون حالة وفاة ،ويحدث ما يزيد على 80% من الوفيات الناجمة عن مرض السكري في البلدان المنخفضة والمتوسطة الدخل، وتشير توقعات منظمة الصحة العالمية(WHO) إلى أن مرض السكري سوف يكون السبب السابع للوفاة في عام 2030، نسبة مرض السكري من النوع الثاني حوالي 85-95% من حالات

مرضى السكري في جميع البلدان ذات الدخل المرتفع وربما تصل النسبة إلى أعلى من ذلك في البلدان المنخفضة والمتوسطة الدخل[4].

وفي العراق تشير الاحصائيات الرسمية التي أصدرتها وزارة الصحة العراقية بموجب تقريرها السنوي لعام 2013 الى أن 2.9% من الوفيات للعام كانت بسبب المرض، وإن هناك أكثر من 33 ألف حالة ترقد في المستشفيات وهناك أكثر من 900 ألف مراجعة للعيادات الاستشارية والخارجية في كافة محافظات القطر مع وجود ما يزيد على الـ 520 ألف حالة مراجعة للمراكز الصحية لإصابات متنوعة بسبب مرض السكر، وبموجب تلك الارقام فمن المتوقع أن تكون لدينا، في ذلك العام على وجه التحديد، أكثر من 1.5مليون إصابة بالمرض، من جانب آخر فالإحصائيات العالمية تشير الى أن العراق يحتل المرتبة التاسعة عربياً والـ 30 عالمياً بنسبة إصابات تصل الى.10.2 % من سكانه ممن تجاوزت أعمارهم 20 عاما يعانون من ارتفاع نسبة السكر في الدم ،والذكور هم من أكثر المصابين بمرض السكري النوع الثاني[5].

داء السكري هو مرض ايضي مزمن يتميز بارتفاع نسبة السكر في الدم الناتج عن نقص في إفراز الأنسولين من البنكرياس بكمية كافية ،أو عندما يعجز الجسم عن الاستخدام الفعال للأنسولين الذي ينتجه أو كليهما ،والأنسولين هو هرمون ينظم مستوى السكر في الدم تم اكتشافه لأول مرة من لدن العالم بوشاردت عام 1815م ،إذ وجد أن هناك علاقة وثيقة بين مرض السكر وعدم كفاءة غدة البنكرياس لإفراز الأنسولين.وأول من وصف الطبيعة المدمرة لمرض السكري هو الطبيب اليوناني Aretaeus ولكنه كان عاجزاً عن التعامل مع أعراض المرض بشكل فعال.

الارتفاع المزمن للسكر في الدم يرافقه الكثير من المضاعفات لمختلف الأجهزة في الجسم ،ولاسيما الأعصاب والأوعية الدموية والقلب والعينين والكليتين[6,7]، أو حتى الوفاة المبكرة، فمن مضاعفات داء السكري أنه يزيد من مخاطر الإصابة بأمراض القلب والسكتة الدماغية، إذ وجدت دراسة أن نسبة 50% من المصابين بداء السكري يموتون بسبب أمراض القلب والسكتة الدماغية في المقام الأول[8]، فقد لوحظ أن ضعف تدفق الدم والاعتلال العصبي (تلف الاعصاب) يؤدي إلى قرحة القدم ،ومن ثمَّ إلى بتر الأطراف ،بينما يؤدي اعتلال الشبكية السكري الى العمى ،نتيجة لتراكم الضرر الذي يلحق بالأوعية الدموية الصغيرة في شبكية العين على المدى الطويل ،وتعزى نسبة 1% من حالات العمى في المقام الأول إلى داء السكري ،فرط الاجسام الكيتونية الجسم، وذلك لأن مستويات الأنسولين المنخفضة في الكبد تؤدي الى أنْ يقوم الكبد بتحويل الأحماض الدهنية إلى أجسام كيتونية للحصول على الطاقة غيبوبة السكري (اللاوعي)،والتهاب الجهاز التنفسي وأمراض اللثة و الفشل الكلوي وهشاشة العظام[9].

1.2تشخيص مرض السكري(Diagnosis of Diabetes Mellitus)

يتميز مرض السكري بارتفاع مستوى السكر في الدم الذي ينتج عن خلل في انتاج الأنسولين أو عمل الأنسولين أو كليهما[10]٠وترتبط مع ارتفاع سكر الدم المزمن اضطرابات في الكربوهيدرات ،والدهون، والبروتينات وعملية التمثيل الغذائي٠أعراض مرض السكري الشائعة هي:

تكرار التبول ،والعطش المستمر ،والنهام(الالحاح المتكرر لتناول الطعام)،وفقدان الوزن خلال مدة قصيرة من الزمن، والجفاف، والتقيؤ،و تغيرات الحالة النفسية ،والضعف ٠ومع وجود الاعراض السابقة

ينبغي تطبيق المعايير التالية (جدول رقم 1-1) للتأكد من وجود مرض السكري٠

جدول رقم (1-1):معايير تشخيص مرض السكري[10]

الاختبار	الطبيعي mg/100ml	اختلال او ما قبل السكري mg/100ml	السكري mg/100ml
HbA1c	≤26	126-139	≥141
Fasting glucose	≤108	109.8-124.2	126 l
2.h glucose	≤138.6	104.4-199.8	199.8 l
Random blood glucose	-	-	199.8

1.3 تصنيف مرض السكري (Classification of Diabetes)

تقسم منظمة الصحة العالمية (WHO) مرض السكري الى ثلاثة أنماط رئيسة[11]٠

1.3.1النوع الأول من السكري (Type 1 of Diabetes)

ويسمى مرض السكري المعتمد على الأنسولين (IDDM) أو سكري الأحداث ،لأن هذا المرض في الغالب يحدث في الأفراد الذين تقل أعمارهم عن 30عاما، على الرغم من أنه يمكن أنْ يحدث في أي

سن٠ويمثل حوالي 10-15% فقط من جميع حالات مرضى السكري٠ويكون أقل شيوعا من مرض السكري النوع الثاني ويحدث بسبب تدمير خلايا بيتا في البنكرياس من لدن جهاز المناعة في الجسم بسبب عدوى فيروسية ،وهذا ما يسمى برد فعل المناعة الذاتية ،مما يؤدي إلى نقص مطلق في إفراز الأنسولين ولذلك يوصي مرضى السكري من النوع الأول بأخذ الأنسولين يوميا ،وذلك للاستمرار في العيش٠وهناك مسببات مرضية للسكري من النوع الأول مثل العوامل البيئية ،إلى جانب وجود استعداد وراثي لمرض السكري يؤدي إلى استجابة المناعة الذاتية التي تدمر خلايا بيتا في البنكرياس على مدى عدة سنوات[12]، وتشمل أعراض هذا الداء فرط التبول ،والعطش ،والجوع المستمر،و فقدان الوزن ،وتغيرات في البصر، وقد تظهر هذه الأعراض فجأة٠

1.3.2 النوع الثاني من السكري (Type 2 Diabetes)

هو الشكل الأكثر شيوعا من داء السكري ،وقد وصل الى مستويات وبائية في كل من البلدان النامية والمتقدمة ،ويعد الان مشكلة صحية عالمية رئيسة أكثر من 90% من مرضى السكري لديهم السكري من النوع الثاني وانتشاره ارتفع في جميع انحاء العالم بين البالغين (20-79 سنة من العمر)، وتشير التقديرات إلى زيادة في معدل الانتشار من 6.4% (285مليون) في عام 2010 الى 7.7%(439 مليون) في عام 2030 [4]٠

النوع الثاني من مرض السكري يسمى غير المعتمد على الأنسولين (NIDDM) أ و سكري الكبار، وهو مرض نمط الحياة ويرتبط بقوة بارتفاع ضغط الدم والدهون غير الطبيعية في الدم ،ويحدث بسبب مقاومة الانسولين من لدن الأنسجة مثل العضلات والأنسجة الدهنية،وهناك أشخاص لديهم استعداد للإصابة بهذا النوع من مرض السكري مثل وجود تاريخ عائلي من مرض السكري ،أو بسبب التقدم بالسن ،أو من خلفيات عرقية معينة مثل الصينية والأفريقية والأوربية ،أو الناس من شبة القارة الهندية ،أو النساء اللواتي أنجبن طفلا وزنة أكثر من 4.5 kg ،أو أُصبن بسكري الحمل أو النساء اللواتي لديهن حالة تعرف باسم متلازمة تكيس المبيض٠وتكون اعراض هذا النمط مماثلة لا عراض النمط الأول ،ولكنها قد تكون أقل وضوحا في كثير من الأحيان ،ولذلك يشخص الداء بعد مرور عدة أعوام على بدء الأعراض ،أمّا عوامل الخطر لمرض السكري النوع الثاني فتشمل العمر، إذ ان التقدم في السن يزيد من مخاطر الإصابة بمرض السكري النوع الثاني[2]، وزيادة الوزن (السمنة) الذي هو عامل الخطر الأكثر أهمية لمرض السكري النوع الثاني[15]،و العوامل الوراثية (تاريخ عائلي من مرض السكري)،والخمول البدني العرق الوبائية ،إذ ان الامريكيين الأفارقة والدول الغربية هم اكثر عرضة لتطور مرض السكري من الأمريكيين البيض[16]٠

1.3.3النوع الثالث من السكري (سكري الحمل) (Gestational Diabetes)

هي حالة مؤقتة تحدث في أثناء الحمل (عادة خلال الربع الثاني والثالث من الحمل) ،وعادة ما يذهب بعد ولادة الطفل،وهو مماثل للنمط الثاني من حيث أن سببه أيضا يتضمن مقاومة الأنسولين لأن الهرمونات التي تفرز في اثناء الحمل يمكن أن تسبب مقاومة الأنسولين ،والمرأة الحامل أيضا تحتاج إلى الأنسولين الإضافي حتى يتمكن سكر الكلوكوز من الخروج من الدم إلى الخلايا إذ يتم استخدامه للحصول على الطاقة [13]. وحوالي 5-8% من جميع النساء الحوامل يحدث لديهن سكري الحمل في حوالي الأسبوع 24 -28 من الحمل ،والنساء اللواتي أكثر عرضة للإصابة بسكري الحمل تكون أعمارهن فوق 30 سنة ولديهن تاريخ عائلي من مرض السكري من النوع الثاني أو النساء اللواتي يُعانين من زيادة الوزن.وقد ازدادت الإصابة بسكري الحمل خلال السنوات 20 الماضية[17]، بسبب الحساسية المفرطة تجاه الكلوكوز التي تحدث فقط في اثناء الحمل عند بعض النساء الحوامل ،ويؤدي التاريخ العائلي من مرض السكري النوع الثاني من أقارب الدرجة الأولى، وكبار السن، والسمنة، وارتفاع ضغط الدم إلى زيادة الهيموغلوبين (خضاب الدم) ومستويات الفيرتين باعتبارها عوامل الخطر المختلفة[18].ويرتبط سكري الحمل مع كلا من مقاومة الأنسولين وضعف إفرازه [19].

الاليات الكامنة وراء مقاومة الأنسولين الناجمة عن الحمل ماتزال غير مفهومة تماما، وذلك لأنّ الجسم ينتج الأنسولين بكمية غير كافية لتلبية احتياجاته الإضافية خلال الحمل[20]، وهناك أيضا مختلف التغيرات الهرمونية والايضية التي تحدث خلال النصف الثاني من الحمل ،والتي تسهل مقاومة الأنسولين مثل ارتفاع مستوى هرمون البروجستيرون في البلازما خلال الجزء الثاني من الحمل [21].وتسبب الأكسدة في تطوير مقاومة الأنسولين خلال الحمل[22].

1.4مضاعفات مرض السكري (Complications of Diabetes)

المرضى المصابين بفرط سكر الدم توجد لديهم عوامل خطر أخرى مثل ارتفاع ضغط الدم الشرياني فضلا عن العوامل الوراثية،ويؤثر مرض السكري في أجزاء مختلفة من الجسم ،وبمرور الوقت يمكن أن يؤدي إلى مضاعفات خطيرة[23] في الأوعية الدموية الدقيقة والأوعية الكبيرة ،ونتيجة لذلك يسبب أمراض الأوعية الدموية مرض السكري يؤثر ايضاً في الجهاز الكلوي(اعتلال الكلية السكري) ويسبب

أضراراً تصيب العين(اعتلال الشبكية) ، وتلف الاعصاب(الاعتلال العصبي)،وترتبط مضاعفات الأوعية الدموية الكبيرة بمرض السكري مع الآثار المترتبة على الشرايين الكبيرة التي تغذي القلب والدماغ والأطراف السفلية ،ونتيجة لذلك فإنَّ المرضى الذين يعانون من مرض السكري لديهم عامل خطر أكبر للإصابة باحتشاء عضلة القلب والسكتة الدماغية[24]، وبتر اطرافهم (قرحة القدم السكري) وتوجد هناك العديد من المشاكل الصحية الأخرى المرتبطة مع وجود مرض السكري مثل العقم ونتائج الحمل السلبية ومشاكل نفسية والسرطان مثل سرطان المعدة،البنكرياس،المبيض والغشاء المخاطي للرحم[13].

1.5 مرض القدم السكري(Diabetic foot disease)

القدم السكرية هي قدم المريض المصاب بداء السكري النوع الثاني ،التي تكون عرضة للإصابة بالتقرحات والالتهابات والغرغرينا بسبب مجموعة من الاعتلالات العصبية والشريانية والعضلية التي

يسببها مرض السكري الذي يؤثر في كل أعضاء الجسم وأثره في القدمين من أكثر المضاعفات حدوثا وخطورة ،مما يتسبب في بتر الأطراف السفلية بشكل كلي أو جزئي ،إذ إن البتر غالبا ما يكون ناتجا من حدوث تقرحات في القدم ،وما يتبعها من التهابات وغرغرينا وتسمم التهابي موجبة البتر في المراحل الأخيرة، لذلك يجب على مرضى السكري معرفة تلك المضاعفات وأسبابها للحيلولة دون وقوعها ومراجعة المختصين للعناية بالقدم السكرية ،علما أن أكثر من 80% من حالات البتر الناتجة عن داء السكري والقدم السكري يمكن تجنبها٠ يسبب داء السكري اعتلالاً في الأعصاب الحسية والحركية في الساقين ،فيؤثر في القدمين ،ويسبب أيضا اعتلالاً في الأوعية المتوسطة والصغيرة والدقيقة، مما يسبب نقصا في وصول الدم إلى القدمين ،ويسبب نقصا في مناعة الجسم ومقاومة الالتهابات ،بما في ذلك التهاب تقرحات القدم السكرية٠إنّ ،ضعف التئام الجروح وتقرحات القدم السكري تشكل مشكلة صحية لدى المرضى الذين يعانون من مرض السكري وتشكل 15%من حالات مرضى السكري وتعد سبباً رئيسياً لعمليات البتر في العالم الغربي٠فضلاً عن أن التئام الجروح هي عملية معقدة تنطوي على عدد من المراحل المترابطة والمتداخلة بما في ذلك الالتهاب (إذ تزال الخلايا الميتة والتالفة من منطقة الجرح) ، ومرحلة نمو نسيج جديد وإعادة تنظيم وترتيب له ،وتشارك العديد من أنواع الخلايا في كل مرحلة من مراحل التئام الجروح ،بما في ذلك الخلايا المناعية والخلايا البطانية والكيراتينية والليفية ،التي تخضع لتغيرات ملحوظة في التعبير الجيني والنمط الظاهري[25]، ويسبب تأخر التئام الجروح في مرضى السكري من خلال تقلص الخلايا الكيراتينية ،وهجرة الخلايا الليفية، والانتشار، والتمايز، وموت الخلايا المبرمج التي تؤدي الى زيادة الالتهاب وإنتاج السايتوكينات الالتهابية [26].

إنَّ تقرحات القدم السكري تنتج من عدة أسباب وهي الاعتلال العصبي ،وتشوه القدم هو المسؤول عن أكثر من 50% من حالات قرحة القدم [38]، والالتهاب ، ونقص المناعة ،واعتلال الأعصاب الطرفية، ونقص التروية من أمراض الأوعية الدموية الطرفية والعدوى اللاحقة ٠

وهناك مجموعة من الأعراض التي تشير إلى وجود اعتلال بالأعصاب هي:

- فقدان تدريجي بالإحساس٠
- شعور بحرقة في القدم٠
- شعور بحرارة أو برودة في القدم٠
- صعوبة حفظ التوازن أثناء الوقوف أوالمشي٠
- الالام المتكررة بالقدم بدون إصابات أو جروح٠

وهناك مجموعة من العلامات التي تظهر في مريض القدم السكري:

- الشقوق والقروح والبثور وتشقق الأظافر٠
- الغرغرينا (زرقة أو سواد بالأصابع أو بطن القدم)٠
- تغير لون أجزاء من القدم مثل ميلها إلى الحمرة٠
- الجروح التي لاتلتئم٠
- تورم بأجزاء من القدم أو بكل القدم٠
- السخونة أو البرودة الزائدة في القدمين٠
- خروج صديد من القدمين وهي علامة متأخرة جدا٠

تكون القدم من أكثر أجزاء الجسم عرضة للإصابة حتى في الأشخاص الطبيعيين ،وذلك بسبب المشي حافيا على أرض ساخنة ،ولبس الأحذية الضيقة وغير المناسبة ، وعدم الاهتمام بنظافة القدم، والضغط الزائد على القدم نتيجة الوزن الزائد، والكدمات أو الحرق بماء ساخن ،أو استخدام مواد حادة لتنظيف القدم ،وطرق خاطئة في قص الأظافر[27]٠ إنّ من أهم أسباب القدم السكري هو عدم ضبط مستوى السكر في الدم لمدة طويلة ،إذ إن ذلك يؤدي إلى تلف الأعصاب الطرفية ومشاكل في الجلد والشرايين وضعف المناعة ،وهذه كلها تسهم في حدوث القدم السكري٠

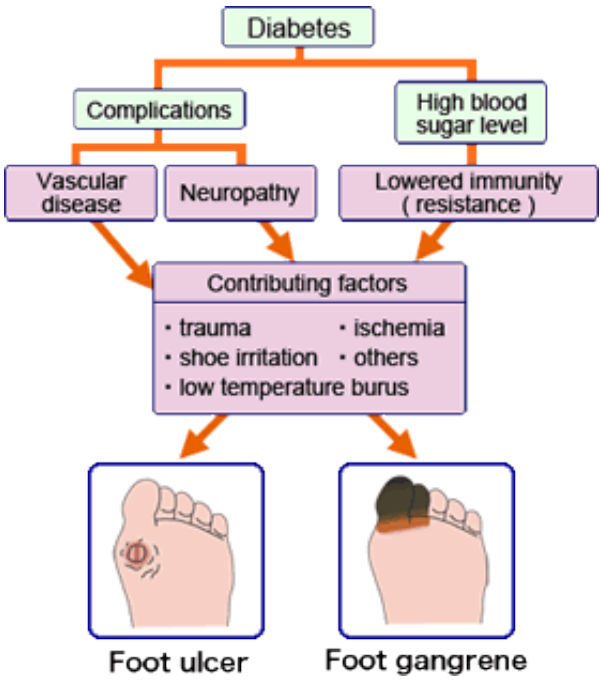
وهناك مجموعة من القواعد الأساسية لمعالجة القدم السكرية:

- العمل على السيطرة بكافة الوسائل المتاحة على نسبة السكر في الدم لتبقى حول المعدل الطبيعي٠

- إعادة الدورة الدموية وتحسينها في القدمين ٠
- تنظيف الانسجة الميتة وازالتها حول القدم وداخله ٠
- معالجة الالتهابات بالمضادات الحيوية المناسبة٠
- استخدام مضادات خاصة تساعد في التئام التقيحات٠
- العلاج بالأوكسجين عالي الضغط والأوزون ومغاطس ثاني أوكسيد الكاربون في حالات

خاصة(يمنع الأكسدة ويمكن أن يعمل على تفعيل النظام المضاد للأكسدة والتأثير في مستوى السكر في الدم)٠

- استعمال الليزر لمعالجة التقيحات وزيادة نسبة الشفاء٠



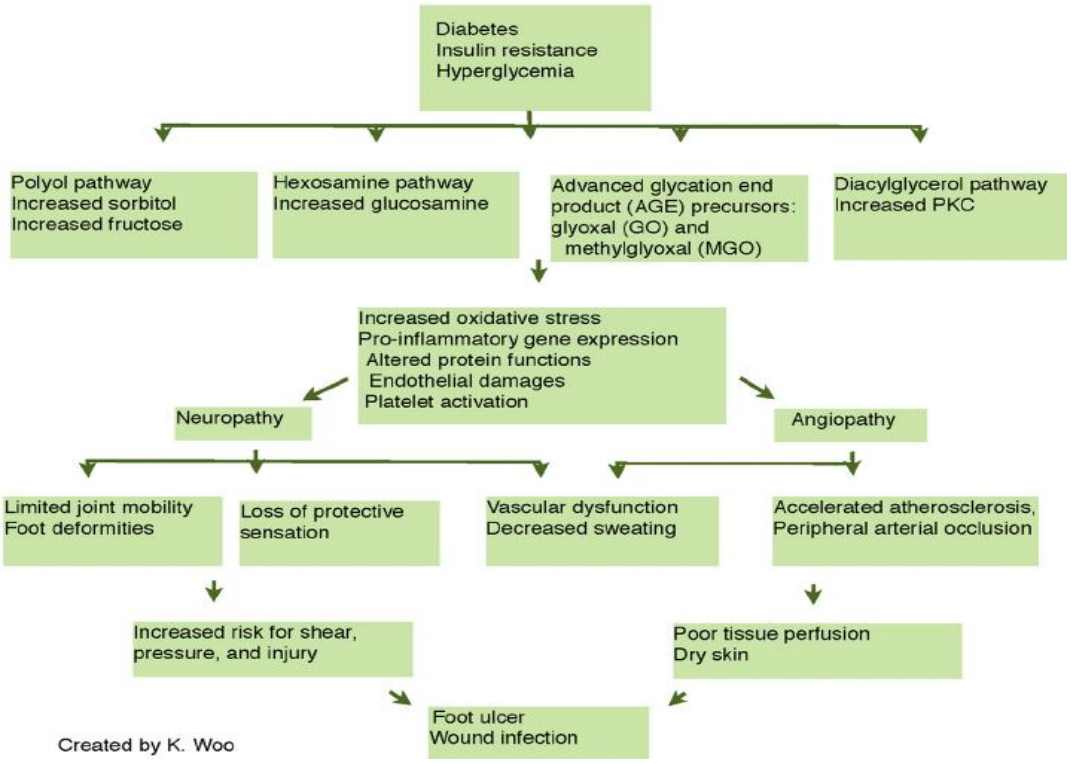
شكل رقم (1-1):القدم السكري[25]

1.5.1مرضية القدم السكري (pathogenesis of diabetic foot)

تقرحات القدم السكري ينتج من عدة أسباب منها الاعتلال العصبي٠ إنَّ أكثر من 60% من حالات قرحة القدم هي نتيجة العمليات الايضية غير الطبيعية التي يسببها ارتفاع السكر في الدم[29]،وأحد هذه الأسباب الأكثر شيوعا هو طريق polyol (تحول سكر الكلكوز الى سكر الفركتوز)،والذي يسبب تطور الاعتلال العصبي ،وحالة فرط سكر الدم تؤدي إلى زيادة في عمل الانزيمات مثل aldose

reductase,sorbitol dehydrogenase،وهذا يؤدي إلى تحول سكر الكلوكوز الى sorbitol (كحول سكري) الذي يتأكسد إلى سكر الفركتوز داخل الخلايا وتراكم منتجات السكر هذه تؤدي إلى انخفاض في تركيب myoinositol للخلايا العصبية،بالاضافة إلى ذلك التحول الكيميائي لنواتج سكر الكلوكوز فإنّها تؤدي إلى استنزاف في مخزونnicotinamide adenine الضرورية لإزالة السموم من مركبات الأُوكسجين التفاعلية (Reactive Oxygen Species) وأوكسيد النتريك (NO)،وهذه الزيادة في الخلايا العصبية تزيد من تضيق الأوعية الدموية ممّا يؤدي الى نقص التروية ،وتعّزز إصابة الخلية العصبية وموتها ،إنَّ ارتفاع السكر في الدم والإجهاد العصبي أيضا يُسهم في تكوين Glycationغير الطبيعي لبروتينات الخلية العصبية ،وتفعيل أنزيم protein kinase مما يؤدي إلى المزيد من الخلل العصبي ونقص التروية[28].

كما أن الاعتلال العصبي اللاإرادي يؤدي إلى تناقص في وظائف الغدة العرقية،ونتيجة لذلك تفقد القدم القدرة الطبيعية على ترطيب الجلد فيصبح جافا، وعرضة بشكل متزايد للالتهاب والعدوى،و فقدان الإحساس بوصفه جزءاً من اعتلال الأعصاب المحيطية يؤدي إلى تفاقم وضع التقرحات[30].



شكل رقم (2-1):ميكانيكية القدم السكري[31]

1.5.2 الفيزيولوجية المرضية للقدم السكري (Pathophysiology of diabetic foot)

الأشخاص الذين يعانون من مرض السكري النوع الثاني هم أكثر عرضة للإصابة بقرحة القدم ،التي هي مشكلة شائعة بشكل متزايد ،ويحدث فيها تكاثر الكائنات الحية الدقيقة في انسجة القدم، ويؤدي في نهاية المطاف إلى الاستجابة الالتهابية ،وتدمير الأنسجة ،ونقص تروية القدم[32]،وجروح القدم عند مرضى السكري غالبا ما تصبح مزمنة ،وتؤدي إلى التهاب مستمر، وموت الخلايا المبرمج ،وانتشار الكائنات الحية الدقيقة في الانسجة تحت الجلد،وتحدث قرحة القدم السكري بسبب ارتفاع البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL ،والبروتين الدهني منخفض الكثافة جدا VLDL،وتثبيط تخليق Prostocyclin،وارتفاع مستويات fibrinogen ،وزيادة لزوجة الصفائح الدموية تؤدي إلى تصلب الشرايين الكبيرة والمتوسطة الحجم.

الفيزيولوجية المرضية تنجم أيضا عن أمراض الأوعية الدموية ونقص تركيب الميلانين ،وتناقص الصوديوم والبوتاسيوم وتناقص فعالية ATP ase ، وزيادة سكر السور بتول (Sorbitol) والفركتوز، ممّا يسبب أدمة في الأعصاب ،ويؤدي إلى فقدان الإحساس في القدم وانهيار الأنسجة ،وضعف تدفق الدم يؤدي إلى مخاطر فقدان أطراف المريض[158].

1.6المواد المؤكسدة (oxidants)

يعتبر الأكسجين عنصراً أساسياً ومهماً في إنتاج الطاقة عن طريق أكسدة الغذاء، ومع ذلك فإن اختزال هذا العنصر لا يكون كاملاً، حتى تحت الظروف الطبيعية. إذ غالباً ما تنشأ مجموعات وسطية من المواد الكيميائية النشطة الطبيعية من عمليات التحول الغذائي وهي تلك التي يطلق عليها الجذور الحرة. وتعمل الجذور الحرة على مهاجمة وتدمير مكونات الخلايا لتحدث بها أضراراً بالغة في مادتها الوراثية ووظائفها الخلوية المختلفة. ومع زيادة تراكم الجذور الحرة، تظهر أمراض عديدة مثل الأمراض الانحلالية وأمراض القلب والأوعية الدموية والسرطان والشيخوخة وغيرها . يتم إنتاج العديد من المواد المؤكسدة القوية خلال عمليات الأيض في كل من الخلايا الدموية الحمراء ومعظم خلايا الجسم الأخرى. وهذه المواد المؤكسدة هي الجذور الحرة والمواد المؤكسدة من غير الجذور الحرة مثل بيروكسيد الهيدروجين ، (N_2O_3) ثالث أوكسيد النتروجين و غاز ثاني أوكسيد النتروجين (NO_2).

1.6.1 الجذور الحرة (Free Radicals)

هي عبارة عن ذرات او جزيئات تحتوي على واحد أو اكثر من الإلكترونات المنفردة في اغلفتها الخارجية ،التي تعمل على تحفيز تلف الخلايا من خلال أكسدة مكونات الخلية مثل البروتين والدهون [33]، وهي عادة ما تكون غير مستقرة وشديدة الفعالية ،ولها عمر نصف قصير، ويمكن تصنيفها الى نوعين رئيسين: مركبات الأوكسجين الفعالة (Reactive Oxygen Species) ،ومركبات النيتروجين الفعالة (Reactive Nitrogen Species)٠

تؤدي الجذور الحرة دورا في نشأة الحياة وتطورها إذ إنَّ لها دورا رئيساً في تفعيل المسارات البيولوجية داخل الخلية مثل تنشيط Protein kinase، وتشترك عوامل خارجية وداخلية في إنتاج الجذور الحرة في الخلايا ومحيطها[34]،إذ إنها يمكن أن تنتج من العقاقير، والسجائر، والمواد المسرطنة والاشعاعات (مصادر خارجية المنشأ) وكذلك من الخلايا البطانية فعالية أنزيم NADPH oxidase، والخلايا الالتهابية مثل النيتروفيلات كمصادر داخلية المنشأ)[35]، تؤدي الجذور الحرة إلى أضرار بالأحماض النووية والنيوكليوتيدات بشكل رئيسي من لدن جذر الهيدروكسيد ($OH^{\cdot}$) الذي ينتج من تفاعل Fenton وتفاعل Haber Weiss، ويؤدي جذر الهيدروكسيد الناتج إلى مهاجمة البنكرياس ويقلل إفراز الأنسولين٠

تفاعل Fenton في هذا التفاعل يحفز بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) من الحديد (Fe^{2+}) ليتحول إلى جذر الهيدروكسيد($OH^{\cdot}$)٠

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

تفاعل Haber-Weiss في هذا التفاعل يتحول بيروكسيد الهيدروجين إلى أنواع تفاعلية أكثر نشاطا($OH^{\cdot}, OH^{-}$)[36]٠

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{-} + OH^{\cdot}$$

جدول رقم(2-1):مركبات الاوكسجين الفعالة ROS[37]٠

المركب	المصدر
Super oxide anion($O_2^{\cdot -}$)	يتكون من سلسلة نقل الالكترون في المايتوكوندريا مع انزيم xanthine oxidase

بيروكسيد الهيدروجين(H_2O_2)	من بروتينات الحديد الكبريت والفيرتين٠
جذر الهيدروكسيد($OH^{\cdot}$)	يتكون خلال تفاعل Fenton
Organic hydrperoxide(ROOH)	من تفاعل الجذور الحرة مع مكونات الخلية مثل الدهون و Nucleobases
Proxy($ROO^{\cdot}$) and alloxy radical($RO^{\cdot}$)	يتكون من مهاجمة الجذور الحرة للأوكسجين على الدهون غير المشبعة٠
HOCL(Hypochlorus)	من تفاعل الكلور مع بيروكسيد الهيدروجين

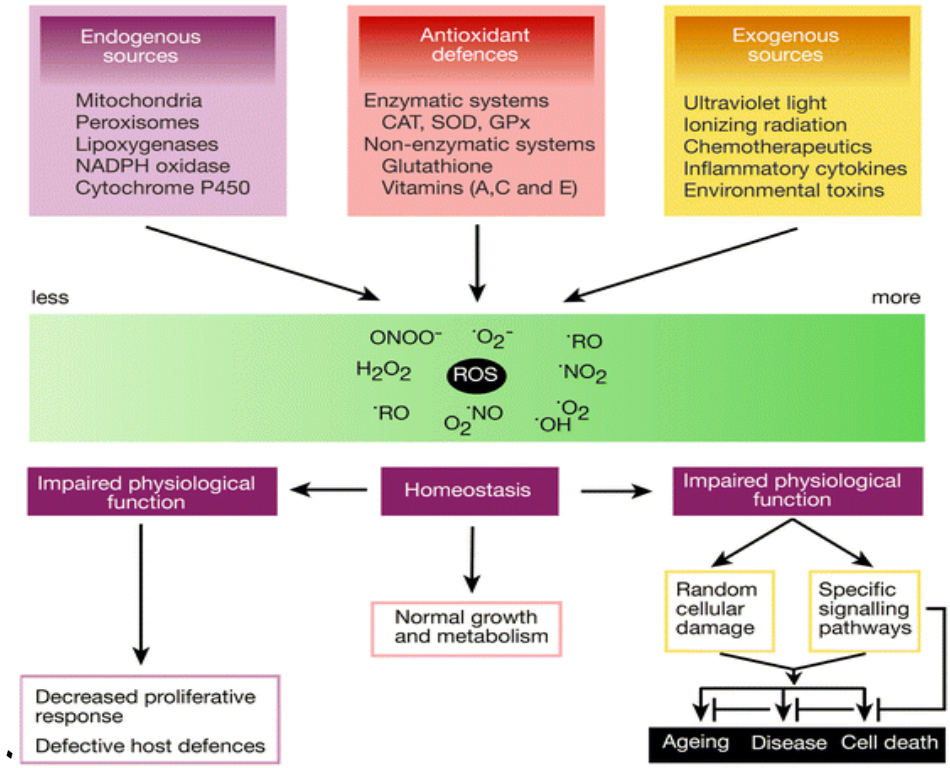
مركبات النيتروجين الفعالة (RNS) من الجزيئات المضادة للميكروبات تتكون من تفاعل أوكسيد النتريك(NO) مع السوبر أوكسيد ،ويعمل RNSجنبا إلى جنب مع ROSعلى تلف الخلايا مسببة الإجهاد التأكسدي(nitrosative stress)،وينتج RNS أيضا بشكل مستمر في النباتات خلال عملية الايض الهوائي أو الاستجابة للإجهاد[39]

$$\cdot NO + O_2^{\cdot -} \rightarrow ONOO^-$$

(nitric oxide) (superoxide) (peroxynitrite)

يتفاعل $NO^{\cdot}$ مع $O_2^{\cdot}$ بسرعة في الأوعية الدموية وينتج من هذا التفاعل $ONOO^-$،$NO^{\cdot}$ وسيط رئيسي في العديد من وظائف الأوعية الدموية بما في ذلك تنظيم العضلات الملساء ،وضغط الدم وتنشيط الصفائح الدموية ونقل الإشارة الدموية[40]٠

Peroxynitrite (بيروكسي نايتريت) يتفاعل مباشرة مع مختلف الانسجة الحيوية،بما في ذلك الدهون الأحماض الامينية،قواعد الحامض النووي (DNA)، Thiols(الثايولات) والمواد المضادة للأكسدة- منخفضة الوزن الجزيئي[41]، ومع أن هذه التفاعلات تحدث بمعدل بطيء نسبيا إلى أنَّ هذا يسمح لها بانتقائية أكثر في جميع أنحاء الخلية٠ بروكسي نتريت يتفاعل مع جزئيات أخرى لتكوين أنواع إضافية من RNS بما في ذلك غاز ثاني أوكسيد النتروجين(NO_2) وثالث أوكسيد النتروجين (N_2O_3) فضلا عن أنواع أخرى من الجذور الحرة٠



شكل رقم(3-1):مصادر مركبات الاوكسجين الفعالة(ROS)[35]

1.6.2المواد المؤكسدة من غير الجذور الحرة

وتشمل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) و غاز ثاني أوكسيد النتروجين (NO_2)وغيرها وتتميز بعدم احتواء اغلفتها الخارجية على الكترونات منفردة.

1.7مضادات الأكسدة (antioxidants)

مضادات الأكسدة هي مواد تحمي الخلايا من التلف التأكسدي[57].فخلال وظائف الايض العادية تتكون مركبات شديدة التفاعل تسمى الجذور الحرة وتكون بطبيعتها غير مستقرة، وتؤدي إلى مختلف الحالات المرضية.الأنزيمات المضادة للأكسدة قادرة على تحقيق الاستقرار وتعطيل الجذور الحرة وذلك بالحد من طاقتها بإعطائها بعض من الألكترونات.

مضادات الاكسدة تكون على نوعين: مضادات الاكسدة خارجية المنشأ (Exogenous) ومضادات الاكسدة داخلية المنشأ(Endogenous) والتي بدورها تقسم الى نوعين: مضادات الاكسدة الانزيمية و مضادات الاكسدة غير الأنزيمية .

1.7.1مضادات الاكسدة الانزيمية (Enzymatic antioxidants)

وتلعب دوراً هاماً وأساسياً في حماية الخلية من الإجهاد التأكسدي، وتنقسم هذه المجموعة إلى ثلاث فئات هي:

Superoxide dismutase(SOD)،Glutathione فوق أكسيد الديسميوتاز وانريم الكاتاليز٠ peroxidase

1.7.1.1 أنزيم الكاتاليز (Catalase)

هو أنزيم مضاد للأكسدة يوجد تقريبا في جميع الكائنات الحية ،ويؤدي دورا مهما ضد الإجهاد التأكسدي[58]،إذ يعمل انزيم الكاتاليز بوصفة منظماً اساسياً لأيض بيروكسيد الهيدروجين، التركيز المفرط لبيروكسيد الهيدروجين قد يسبب اضراراً كبيرة للبروتينات ، والحامض النووي(DNA)و(RNA)،والدهون[59]٠الكاتاليز هو أنزيم لمعالجة بيروكسيد الهيدروجين ،إذ يقوم بتحويلة إلى أوكسجين وماء، وبذلك يحمي البنكرياس وخلايا بيتا من التلف بوساطة بيروكسيد الهيدروجين[60]،إنَّ الحد من مضاعفات داء السكري ومنها القدم السكري وتعزيز إفراز الأنسولين ،والاجهاد التأكسدي لمدة طويلة يمكن أن يسهم في تطوير مجموعة متنوعة من الاضطرابات مثل تصلب الشرايين و مرض السكري النوع الثاني [60]٠

نقص أنزيم الكاتاليز يؤدي إلى زيادة إنتاج المايتوكوندريا ل ROS والاستجابة لتحرير الأحماض الدهنية الذي يتم تفعيلة من لدن N-acetyl cysteine٠وانخفاض نشاط الكاتاليز يؤدي إلى تلف الهيم بروتين بسبب موت الخلايا [61]٠وجنبا إلى جنب مع أكسدة ايونات المعادن النشطة ينتج جذر الهيدروكسيد السام[62,63] ٠

1.7.1.2 أنزيم السوبر اوكسيد دسيموتاز(SOD)

هو أنزيم مضاد للأكسدة والذي يحفز تحول أنيون السوبر اوكسيد ($O^{\cdot-}_2$) إلى بيروكسيد الهيدروجين وجزيئة الاوكسجين[64,65]٠وأنزيم SOD له أدواراً وقائية مهمة ضد الأضرار الخلوية لبيروكسيد الهيدروجين وبحضور الانزيمات الاخرى مثل الكاتاليز و GPx يتحول بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأوكسجين[66]٠إنّ جميع أنسجة الثديات تحتوي على ثلاثة أشكال من SOD(Cu-Zn-SOD)و(Mn-SOD) وخارج الخلية(Ec-SOD) ٠(Cu-Zn-SOD) أو SOD_1 يوجد في العصارة الخلوية،(Mn-SOD)اوSOD_2 يوجد في المايتوكوندريا،(SOD Ec-) أو SOD_3 يوجد في الفضاء خارج الخلية[67,68]٠السوبر أوكسيد($O_2^{\cdot-}$)يتفاعل بسرعة مع أوكسيد النتريك(NO)المنشط حيويا لإنتاج جذر

Peroxynitrie٠ SODمدافع كبير ضد السوبر أوكسيد في الكليتين خلال تطور اعتلال الكلية السكري في الفئران٠SOD(SOD_1,SOD_3) قد تؤدي دورا رئيساً في التسبب في اعتلال الكلية السكري لدى مرضى السكري[69]،و انخفاض ROS وزيادة الأنزيمات المضادة للأكسدة تمنع حدوث مرض السكري[70]٠ المستوى المرتفع ل SODيظهر للحد من الأكسدة وقلة إطلاق المايتوكوندريا لسايتو كروم سي(Cytochrome C) وموت الخلايا المبرمج في الخلايا العصبية٠

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

وهكذا نرى الدور الرئيسي ل SOD في تنظيم موت الخلايا المبرمج (apoptosis)، إذ يُعد أنزيم SOD من دفاعات الجسم وتخليصها من الجذور الحرة والحد من مضاعفات السكري(القدم السكري) من خلال حماية خلايا بيتا في البنكرياس من مركبات الأوكسجين الفعالة(ROS) وتعزيز إفراز الأنسولين ٠في دراسة قام بها Lucchesi وزملاؤه[71]٠لمراقبة التوازن التأكسدي في الجرذان المصابة بداء السكري لاحظوا تقلص نشاط SOD والأنزيمات المضادة للأكسدة الأخرى في أنسجة الكبد٠

1.7.2مضادات الاكسدة غير الانزيمية (Non- Enzymatic antioxidants)

وتشمل مضادات الأكسدة غير الأنزيمية مركبات منخفضة الوزن الجزيئي، مثل الفيتامينات (الفيتامينات C و E) و β كاروتين وحمض اليوريك و الجلوتاثيون(GSH)٠

فيتامين C (حمض الاسكوربيك)

وهو مضاد أكسدة يذوب في الماء ويعمل داخل الخلايا ويستطيع اختزال الجذور الحرة من معظم مصادرها، كما يعمل على مساندة النظام الدفاعي للجسم ويستخدم أيضاً ضمن آليات الجسم لإزالة سمية بعض المواد الكيميائية وله دور هام في عملية الأكسدة والاختزال في الجسم. كما أن لهذا الفيتامين دوراً مضاداً للموت الخلوي المبرمج ويؤثر أيضاً على بعض المواد المضادة للتكاثر. وبصفة عامة، يلعب فيتامين ـ ج دوراً هاماً في الحفاظ على الصحة العامة ومقاومة الأمراض وتقوية الأغشية الخلوية وإبطال فعل السموم والجذور الحرة. ولأن جسم الإنسان لا يستطيع إنتاج هذا الفيتامين، يجب تناول الأطعمة التي تحتوي عليه كالحمضيات وخاصة من قبل الأشخاص المدخنين[

Vitamin-E :ـ فيتامين ـ هـ

يعتبر فيتامين ـ هـ من أكثر مضادات الأكسدة ذوبانية في الدهون وتعرف مركباته بالتوكوفيرولات ومن أهمها مركب ألفاتوكوفيرول الذي يلعب دوراً Tocotrenols والتوكوترينولات Tocopherols حيوياً في حماية الأغشية الخلوية من التلف التأكسدي وبالتالي منع الكولسترول من الالتصاق بجدران الشرايين حيث إن هذا الفيتامين يقوم باقتناص الجذور البير وكسية في الأغشية الخلوية كما يعادل تأثير بعض الجذور الحرة الأخرى وبالتالي يعمل على الوقاية من بعض الأمراض. كما تعمل مركبات فيتامين – هـ على منع أكسدة بعض العناصر الغذائية وإعاقة سلسلة التفاعلات التي تؤدي إلى أكسدة الدهون والزيوت وذلك بمعادلة مركبات أنواع الأكسجين النشط.

اكتسب فيتامين ـ هـ أهمية بالغة بعد أن عرف دوره كمضاد للأكسدة وإطالة العمر الافتراضي لخلايا الجسم ومعالجة عدد من الأمراض كتقليل نسبة حدوث الإصابة بالجلطات القلبية بمعدل ٧٧ ٪ وتصلب الشرايين بنسبة ٤٧ ٪، كما أن لهذا الفيتامين دور في وقاية الجين P53 من التطفر. ومن المصادر الغنية بهذا الفيتامين زيت النخيل والذرة والفول السوداني[58].

الجلوتاثيون (GSH)

وهومن مضادات الأكسدة الرئيسية حيث يزيل سموم بيروكسيد الهيدروجين وبير وكسيدات الدهون من خلال منح الكترون الى بيروكسيد الهيدروجين ليحوله الى اوكسجين وماء .

1.8 الإجهاد التأكسدي (Oxidative stress)

الإجهاد التأكسدي يعرف بأنّه حالة عدم التوازن في نظام العوامل المؤكسدة ،والعوامل المضادة للتأكسد باتجاه إنتاج المزيد من العوامل المؤكسدة ،مثل مركبات الأوكسجين الفعالة(ROS)،وكلوتاثيون المؤكسد، والمنتجات البروتينية المؤكسدة (AOPP(Advanced Oxidation Protein Products)[42].

إنَّ الإجهاد التأكسدي يسبب فقدان وظيفة الخلايا السليمة ،وذلك من خلال الأضرار بالأحماض النووية،و البروتينات،والدهون، والسكريات ،والاحماض الامينية وتؤدي إلى تلف الخلايا إذ يعملROS على أكسدة الأحماض غير المشبعة ،وخاصة حامض الينوليك ،ومع ذلك ROSيمكن أن يكون مفيدا ،كما أنه يستخدم من قبل الجهاز المناعي لمهاجمة مسببات الامراض وقتلها[43].

الأكسدة تسبب الكثير من الأمراض ،ومن أهمها السرطان ،وأمراض القلب ،والسكري والشيخوخة المبكرة (جدول رقم 3-1).

جدول رقم(3-1):الإجهاد التأكسدي وأضراره في الجسم[44].

العضو	الضرر
الرئتين	الربو التهاب الشعب الهوائية المزمن.
الكلى	التهاب كبيبات الكلى الفشل الكلوي المزمن.
المفاصل	التهاب المفاصل والروماتيزم.
المخ	الزهايمر مرض باركنسون والاكتئاب.
العيون	امراض الشبكية.
الجنين	تسمم الحمل.
القلب	تصلب الشرايين ارتفاع ضغط الدم.
باقي الاجهزة	السرطان، السكري، الالتهابات والشيخوخة.

ترتبط الأكسدة مع زيادة إنتاج المواد المؤكسدة ،وانخفاض فعالية الدفاعات المضادة للأكسدة مثل كلوتاثيون[45]، وأنزيم السوبراوكسيددسموتيزSOD،وانزيم الكاتاليزCAT.مايتوكوندريا العضلات الهيكلية تمثل المصدر الأساس لمركبات الأوكسجين الفعالة في الأنظمة البيولوجية ،إذ إن الأكسدة تسبب موت

الخلايا المبرمج ،ونخر الخلية من خلال الإضرار بالحامض النووي البروتينات ،والأحماض الدهنية غير المشبعة وخاصة حامض الاراجيدونيك وحامض اللينيوليك هي الاهداف الرئيسة لمركبات الأوكسجين الفعالة في الأنسجة والخلايا ،وأكسدة الجذور الحرة من حامض اللينوليك ينتج مزيج رسيمي من Hydroxy octaclecodienoic ومن ثّم فقدان الخلية لفعاليتها[46].

-**الإجهاد وأمراض الكلى**/مرض اعتلال الكلية السكري يحدث نتيجة لارتفاع السكر في الدم الذي يؤدي إلى زيادة الضغط الطبيعي ،والذي يؤدي إلى تلف خلايا الكبيبة[47].

-**الإجهاد وأمراض الرئة**/ مثل الربو إذ إن الأكسدة تودي دورا في التسبب في مرض الربو[48]، من خلال التهاب الشعب الهوائية وتحفيز إفراز Aucin،وكذلك مرض التليف الرئوي الذي يعد النتيجة النهائية لمجموعة متنوعة من أمراض الرئة ،والذي تسببه السموم وإلاشعاعات، وبينت العديد من الدراسات أن عدم التوازن بين العوامل المؤكسدة/وغير المؤكسدة يؤدي دورا مهماً في التسبب في التليف الرئوي سرطان الرئة ، إذ يعمل ROSعلى تحفيز الجينات المسرطنة مثلfos, jun ،وبذلك يرتبط إفراز jun مباشرة مع سرطان الرئة[49]، الذي يرتبط مع إنتاج ROS،وغالبا ما يعمل على إحداث خلل في الخلايا المبرمج وموتها ،إذ يتراكم بروتين P_{53}في السايتوبلازم، والتعديل الذي يحصل على البروتينات والدهون قد يزيد من مخاطر الطفرات من خلال تشكيل الدهون السمية Per oxidative من المنتجات التي تتفاعل مع الحامض النووي DNA،وتعديل الأكسدة من بلمرة DNA أو تنشيط إصلاح أنزيمات الحامض النووي[50].

-**الإجهاد وأمراض العيون**/تسبب الأكسدة العديد من أمراض العيون مثل اعتام عدسة العين الضمور البقعي، واعتلال الشبكية السكري، وأمراض القرنية والتهاب الشبكية الصباغي[52]، وأن الاشعة فوق البنفسجية (UV) التي تسبب الأكسدة تؤدي دورا رئيساً في عدد من الحالات المرضية داخل العين ،وقد وجد بأن Lipid peroxidation(LPO) هو السبب في اعتام عدسة العين٠وتكون شبكية العين أكثرعرضة للأكسدة بسبب ارتفاع استهلاك الأوكسجين ،ووجود نسبة عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة التي تزيد من إنتاج ROS،وكذلك التعرض للضوء المرئي٠

مرض اعتلال الشبكية السكري (Diabetic Retinopathy): إن ROS يؤدي دورا في تطور مضاعفات مرض السكري ،وان فيتامين E يحد من تطور مضاعفات مرض السكري من خلال منع تأثير ROS وبيروكسيد الدهون [52].

مرض التهاب القرنية الذي يسبب العمى ناجم من الجذور الحرة التي تنتجها المايتوكوندريا.مرض التهاب الشبكية الصباغي(Retinitis pimentos) الذي هو مرض وراثي[54] يحدث نتيجة لمجموعة من الطفرات التي تسبب موت الخلايا ،وتؤدي إلى العمى وتؤدي الأكسدة دورا في تطور المرض.

-**الإجهاد وأمراض الجهاز التناسلي/** يؤثر الإجهاد التأكسدي على حالة الخصوبة[53] من خلال خفض عدد الحيوانات المنوية لدى الرجل.

-**الإجهاد وأمراض الدم/** مثل thalassemia الثلاسيميا (فقر دم البحر المتوسط) الذي هو مرض وراثي يتطلب نقل الدم المتكرر ،بسبب فقر الدم الشديد يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى زيادة مستويات البيرو كسيدات الدهنية وسيطة الجذور الحرة فضلا عن انخفاض مضادات الأكسدة[53].

- مرض اللوكيميا اللمفاوي(سرطان الدم اللمفاوي) يحدث نتيجة لتراكم الجذور الحرة وانخفاض مضادات الأكسدة نتيجة لحصول خلل في عملية التمثيل الغذائي لمضادات الأكسدة بسبب عملية السرطان

وزيادة إنتاج بيروكسيد الهيدروجين من الخلايا السرطانية[54]، وأظهرت دراسة ايضا انخفاضاً في مستويات الكلوتاثيون (GSH) في هذا المرض.

- **الإجهاد وأمراض المفاصل/**مثل مرض التهاب المفاصل (RA) وهو التهاب مزمن[54].يؤدي إلى تصلب الشرايين ،وتدهور النسيج الضام ،وتشوهات حول المفصل مما يؤدي إلى أمراض المناعة الذاتية ،نتيجة لزيادة إنتاج ROS الذي يلحق الضرر بالبروتينات والدهون انخفاض مضادات الأكسدة وزيادة malondialdehyde(MDA)، و التهاب المفاصل المزمن يؤدي إلى تدمير الغضاريف والعظام نتيجة الأكسدة.

-**الإجهاد وأمراض البنكرياس/**مثل مرض السكري ،إذ إنّ ارتفاع السكر في الدم يسبب إنتاج الجذور الحرة وأنواع الأوكسجين الفعالة وخاصة ROS،وانخفاض مضادات الاكسدة التي تؤثر في تطور مضاعفات السكري[55]

-**الإجهاد وأمراض الكبد/** مثل مرض Wilson's الذي هو مرض وراثي ناتج عن تراكم النحاس وزيادة

مستويات MDA وانخفاض مضادات الأكسدة وزيادة الجذور الحرة[56].

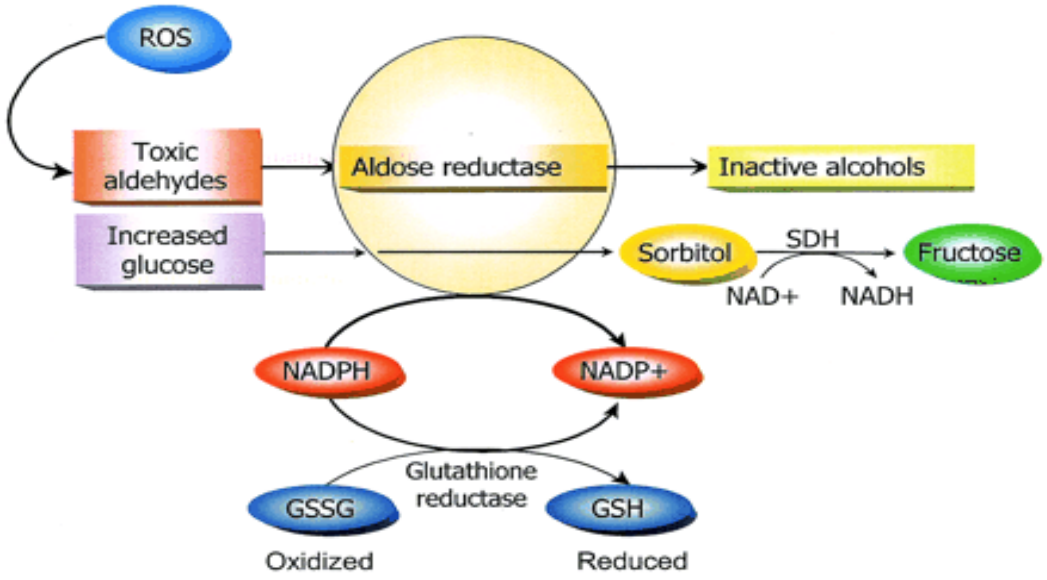
الإجهاد وأمراض الاعصاب/ مثل مرض الزهايمر(AD) ومرض باركنسون (PD) والتصلب العضلي الجانبي(ALS) ٠

1.8.1الإجهاد التأكسدي والقدم السكري (Oxidative stress and Diabetes)

تفيد الدراسات التجريبية والسريرية السابقة أن الأكسدة تؤدي دورا رئيسا في تسبب المضاعفات المرضية وحدوثها في كلا النوعين من مرض السكري[57]٠ ارتفاع السكر في الدم يسبب تولد الجذور الحرة التي تعمل على تدمير خلايا بيتا في البنكرياس ،وتؤدي الى مضاعفات السكري ومنها قرحة القدم، وكذلك إضعاف نظام الدفاع المضاد للأكسدة الذاتية في المرضى الذين يعانون من مرض السكري مثل كلوتاثيون(GSH) وانزيم الكاتاليز (CAT)،إذ يسبب الإجهاد التأكسدي زيادة إنتاج كل من ROS,RNS٠،يعد أنزيم NADPH Oxidase أيضا مصدراً داخلياً رئيساً لإنتاج ROS وتراكيز سكر الكلوكوز العالية في مرض السكري تحفز الأكسدة بسبب عملية التمثيل الغذائي داخل الخلايا التالفة

ومسار polyol (شكل رقم 4-1) الذي هو عبارة عن سلسلة من التفاعلات الكيميائية في الحالات المزمنة في جسم المريض المصاب بارتفاع السكر في الدم، وفي هذه الحالة يتم استقلاب سكر الكلوكوز في التفاعلات الايضية إلى سكر الفركتوز(سكر الفواكه)وسكر sorbitol [54]٠

مسار polyol يتضمن أكسدة NADPH إلى $NADP^+$ ومن ثمّ انخفاض مستوى NADPH وكذلك اختزال NAD^+الى NADH ومن ثمّ سوف يتراكم NADH وسكر السوربتول الذي يؤدي إلى زيادة الضغط الأوزموزي داخل الخلايا٠سكر Sorbitol يتفاعل أيضا مع ATP ase ويؤدي إلى تراكم الكالسيوم Ca^{+2} الذي يؤدي في النهاية إلى تلف المايتوكوندريا [43] وقلة إنتاج ATP٠



شكل رقم(4-1):ارتفاع مستوى الكلوكوز يحفز مسار polyol[14].

1.9أنزيم الميلوبيروكسيدز (Myeloperoxidase)

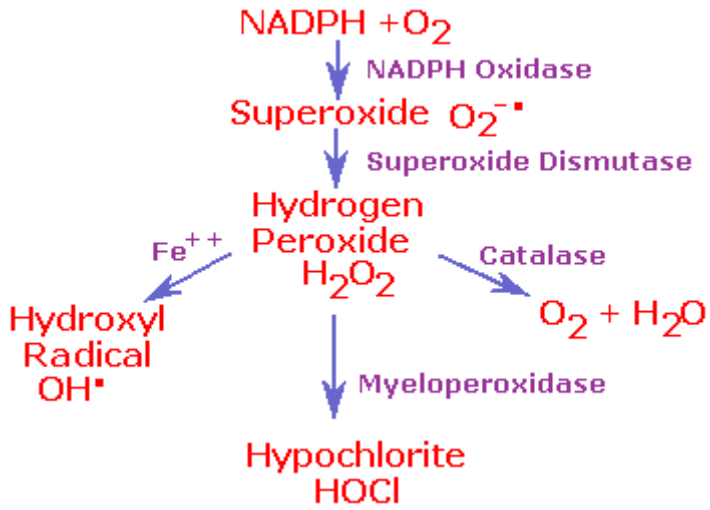
هو أنزيم الهيم في الجينات الأولية من الكريات البيض (العدلات neutrophils) وبعض الضامة (macrophages) للأنسجة[91].يفرز أنزيم الميلوبيروكسيدز MPO myeloperoxidase من الهيم خارج الخلية وهو بروتين سكري الهيم معقد مع وزن جزيئي حوالي 150كيلودالتون.يعد من الأنزيمات الموالية للأكسدة التي يتم تحريرها من حبيبات الكريات البيض النشطة الأحادية والضامة في مواقع الالتهاب،ومع ذلك فإن النشاط المضاد للميكروبات من MPO يمكن أن يؤدي أيضا إلى الضرر التأكسدي من البطانة وجدار الوعاء الدموي،ويتضح ذلك من حقيقة أن كلا من MPO والإجهاد التأكسدي يسبب تصلب الشرايين[92]، وقد وضعت عدة اليات يمكن أن تعزز دور MPO في تصلب الشرايين لأن زيادة نشاط MPO يؤدي إلى أكسدة البروتين الدهني منخفض الكثافة الكوليسترول Low Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C).مما يزيد Atherogencity لها[93,94].MPO يسبب أكسدة البروتين الدهني عالي الكثافة الكوليسترول High Density Lipoprotein(HDL)ويمكن أن يقلل من قدرتها على نقل الكوليسترول العكسي[95].وأخيرا نشاط MPO يؤدي إلى استهلاك البطانة المشتقة أوكسيد النتريك التي يمكن أن تؤدي إلى تشكيل الترسبات والخلايا البطانية[93,94].وعلى الرغم من كونه عنصرا أساسيا في نظام المناعة الفطري لكنه أيضا له دور رئيسي في عدد من الأمراض المرتبطة بالالتهاب مثل التليف

الكيسي والتهاب المفاصل وأمراض الكلى ،وتصلب الشرايين والأمراض القلبية والوعائية، والربو، ومرض السكري ،والأمراض العصبية وبعض انواع السرطان٠وهناك عدد من الدراسات تشير إلى أن MPOغير قادر على اختراق غشاء الخلية من خلال البروتينات[91] ٠ إضاقة إلى ذلك تؤثر عوامل أخرى مثل العمر والتدخين في ارتفاع مستويات MPO وزيادة الالتهاب [95,96]،إذ وجدت اثنين من عدة دراسات وجود علاقة مستقلة مع التقدم في العمر، وذكرت أيضا وجود علاقة إيجابية مع التدخين[97,98]٠إن مستويات MPOكعلامة من الخلايا البطانية وتخليق ROSيزداد في مرضى السكري،فقط عدد محدود من الدراسات التخصصية التي ركزت على العلاقة بين مستويات MPO ووجود مرض السكري ،إذ وجدت ثلاث دراسات سريرية ارتفاع مستوى

MPO (قياس MPO مرتين في مصل الدم ومرة واحدة في عينات البلازما) لدى مرضى السكري [98,99]٠في حين أن اربع دراسات سريرية أخرى بينت عدم وجود علاقة بين مستوىMPO ومرض السكري[98,100]٠هذه التناقضات الملحوظة مع الدراسات قد تفسر جزئيا على الأقل نتيجة الاختلافات في أساليب السكان وفحص الأنسجة مما يعيق تفسير هذه النتائج٠

واستنادا الى دراسة تجريبية قام بها Zhang وآخرون عن فعالية أنزيم MPO في مرضى السكري النوع الثاني[92]، بينت أن ارتفاع السكر في الدم يترافق مع التهام الكريات البيض MPOفي مرضى السكري النوع الثاني[101,102]٠هذه الدراسة تدعم بشكل واضح هذا المفهوم ،إذ إن مستويات MPOهي أعلى لدى مرضى السكري مقارنة مع الأصحاء ،إذ يعمل أنزيم MPOعلى تدمير الخلايا الميتة ومنعها من الانتشار وإغلاق الجرح في مرضى القدم السكري من خلال تدمير الحامض النووي والشحوم والبروتينات مما يزيد من سرعة شفاء الجروح٠

يعمل أنزيم MPOعلى تحفيز تحويل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وأيونات الكلور إلى حامض Hypochlorite acid والذي هو أكثر فعالية في قتل الجراثيم٠[111]



شكل رقم (5-1):ميكانيكية انزيم MPO[111]

1.10 المايتوكوندريا والقدم السكري (Mitochondria and Diabetic foot)

المايتوكوندريا أو الحبيبات الخيطية هي عضيات في داخل الخلايا الحيوانية والنباتية الحقيقية النواة (ماعدا كريات الدم الحمراء) ،طولها بضع ميكروميترآت وعرضها يتراوح من 0.5مايكرومتر الى 1 ميكرومتر،يحيط بها غشاءان متراكبان مسؤولة عن توليد الطاقة في داخل الخلية فبدونها لن تستطيع الخلية إنتاج الطاقة اللازمة لها للحفاظ على الحياة مما سيسبب توقف أنشطة الخلية الأخرى٠يكون شكل المايتوكوندريا كروي داخل النسيج العضلي والمتطاول في ما سواها[72]٠وتوجد في سايتو بلازم الخلية خارج النواة٠ تؤدي المايتوكوندريا دورا مهماً في عملية التمثيل الغذائي وتوليد الطاقة ،لأن العديد من التفاعلات الكيميائية تجري في عضيات المايتوكوندريا ،لذلك تسمى بيت الطاقة في خلايا الثديات ،لأنها تقوم بتوليد أغلبية ATP المطلوبة من قبل الخلايا حيث تتحلل معظم المواد الايضية في سيتوبلازم الخلية الى كلوكوز وهذا بدورة يتحلل عن طريق تحلل الكلوكوز مكونا حامض البير وفيك وهو ما يعادل ثمانية جزيئات من ATP حيث يستهلك منها جزيئتان وتبقى ستة جزيئات اربعة منها في صورة NADH ٠ المايتوكوندريا تحتوي على الأنزيمات الرئيسة المشاركة في دورة ثلاثي حامض الكاربوكسيلك TCA،أكسدة بيتا للأحماض الدهنية ونقل الالكترون من السلسلة التنفسية٠المركبات الايضية الناتجة عن هدم السكريات والدهون بوساطة دورة كريبس TCAوأكسدة بيتا تمنح مكافئات من(NADH،($FADH_2$) التي يتم ضخها في سلسلة نقل الالكترون والتي تتكون من سلسلة من معقدات السلسلة التنفسية والداخلة في تركيب الغشاء الداخلي

للمايتوكوندريا مثل NADH-Coenzyme-Q-oxidoreducatase,succinate-coenzyme-Q-0xidoreducatase,Reduced coenzyme-Q-cytochrome C oxidoreducatase,Cytochrome oxidase ،وذلك لدفع فسفرة ADPلإنتاج ATP في المايتوكوندريا لتلبية احتياجاتها من الطاقة للخلية[73].

المايتوكوندريا لها الجينوم الخاص بها mtDNA وهو يساوي 16.6 kbكيلوبايت من الحامض النووي الدائري المزدوج DNA٠تحتوي كل خلية من الثديات على عدة مئات إلى أكثر من ألف من المايتوكوندريا، وكل الحبيبات الخيطية تحتوي على 10-2نسخ الحامض النووي المايتوكوندري mtDNA لتلبية احتياجات الخلايا من الطاقة٠mtDNA تكون أكثر عرضة لهجوم الجذور الحرة وضرر الأكسدة، ومن ثّم المزيد من المخاطر في حصول طفرات للحامض النوويDNA٠وقد تم اكتشاف أكثر من مائة من الطفرات في الحامض النووي المايتوكوندري mtDNA لتترافق مع أمراض الإنسان[74]، وأن الأحماض النووية في المايتوكوندريا تكون أغلبها من نوع RNA وفيها القليل من DNA،وهذا معاكس لما هو علية في النواة،أن عدد المايتوكوندريا في كل خلية يعتمد على مدى مستلزمات الخلية من الطاقة٠مثلا،الخلية التي تنتج كميات كبيرة من البروتينات لتصديرها خارجا تحتاج إلى طاقة كبيرة مما يتطلب وجود عدد كبير من المايتوكوندريا [75]٠ المايتوكوندريا هي أيضا مصدرٌ رئيسيّ لمركبات الأوكسجين التفاعلية (ROS) داخل المايتوكوندريا، مركب الأوكسجين الفعال يتم إنتاجه من التفاعل الحاصل بين الأوكسجين والالكترونات المتسربة من الأنزيم المعقد 1,3 من السلسلة التنفسية٠بعد ذلك السوبر أوكسيد(O^{-}) يستطيع التحول إلى دهون قابلة للاحتراق٠بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) يتحول إلى جذر الهيدروكسيد الاكثر تفاعلا من لدن(Mn-SOD) وعبر تفاعل Fenton٠وهناك مجاميع أنزيمية مثل (SOD,CAT) لحماية الخلايا من الاعتداء من لدن ROS٠ومع ذلك الإفراط في إفراز ROSمن المايتوكوندريا قد يسبب الضرر التأكسدي للمكونات الخلية مثل الحامض النووي DNAوخاصة المايتوكوندري mtDNA والبروتينات والدهون من الأنسجة المستهدفة في الشيخوخة والأمراض المرتبطة بالعمر[76]٠وقد أثبت بأن عيوب المايتوكوندريا التي تسببها طفرات mtDNA أو الإجهاد التأكسدي أيضا تؤدي دورا في مقاومة الانسولين أو مرض السكري[77]٠ أوكسجين المايتوكوندريا يستخدم في توليد الجذور الحرة للأوكسجين ويترتب على ذلك الضرر التاكسدي،والأهمية البيولوجية لROS التي تشمل الجذر الحر للسوبر أوكسيد O^{-}_2 وبيروكسيد الهيدروجين وجذر الهيدروكسيد الحر OH^{-} تتمثل في الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي PHوالسوبر أوكسيد يحفز بوساطة SOD ليكون بيروكسيد

الهيدروجين والأوكسجين[77] والمايتوكوندريا تعد الموقع الرئيسي داخل الخلايا لإنتاج السوبر أوكسيد[78,79]،إذ إن إسهام المايتوكوندريا تعتمد على الحالة التنفسية٠

$$O_2^{\cdot -} + Fe(3) \rightarrow O_2 + Fe(2) + H_2O_2 + H^+$$

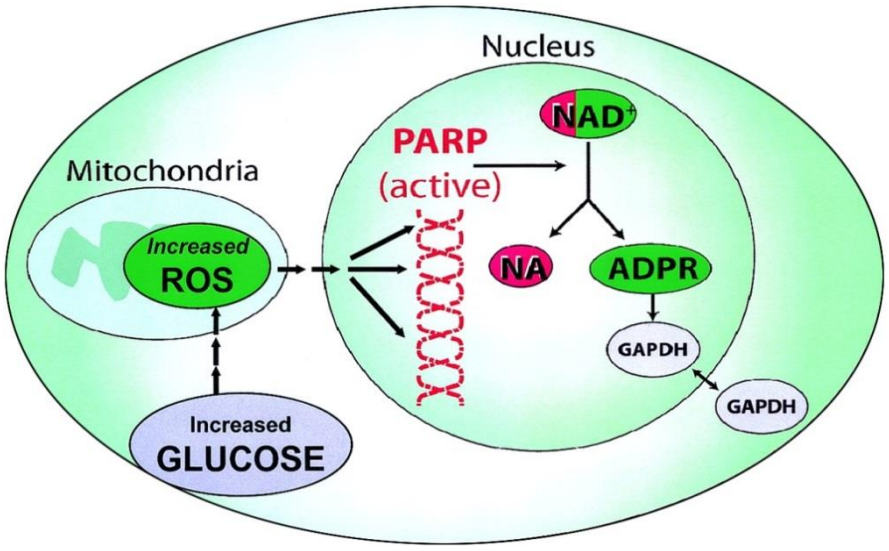
$$Fe(2) + H_2O_2 \rightarrow Fe(3) + OH^- + OH^{\cdot}$$

إنتاج ROS الزائد من المايتوكوندريا المعيبة قد يعد واحدا من العوامل[81] المؤدية إلى مقاومة الأنسولين٠وأظهرت الدراسات الأخيرة أن كمية الايونات السالبة لسوبر أوكسيد المتولدة من لدن المايتوكوندريا قد ازدادت في أربعة نماذج حيوانية مختلفة تعاني من مقاومة الأنسولين ،إضافة الى ذلك أفادت التقارير أنه من خلال إضافة أنزيم SODلاستهداف المايتوكوندريا لخفض مستوى ROSان تنخفض مقاومة الأنسولين في الحيوانات غير الحساسة للأنسولين[80] وأظهرت العديد من الدراسات حدوث اضطرابات في المايتوكوندريا في كل من نقص الأنسولين ومقاومة الأنسولين (النوع الثاني)والحالة ذات الصلة من السمنة على الرغم من أن عبارة(ضعف المايتوكوندريا) كثيرا ما تستخدم ،ويجب أن نتذكر أن وراء هذا الخلل هو وجود عيوب في نشوء حيوي المايتوكوندريا ،عدد علم التشكل وديناميةبما في ذلك الاندماج والانشطار٠وقد أصبح موضوع نقاش ما اذا كانت مقاومة الأنسولين في مرض السكري من النوع الثاني ذات صلة بوظيفة المايتوكوندريا وأمراض المايتوكوندريا تكون نتيجة للطفرات حوالي 15%تكون ،أما موروثة أو تلقائية أو قد تكون نتيجة لضعف المايتوكوندريا المكتسبة بسبب الاثار السلبية للأدوية، الالتهابات أو أسباب بيئية أخرى، التي تؤدي إلى تغيير في وظائف البروتينات أو جزيئات الحامض النووي الريبي (RNA)والذي يتواجد عادة في المايتوكوندريا[82]٠ إنّ مرض السكري النوع الثاني يحصل لحدوث تشوهات مورفولوجيا في جزر بيتا بالمايتوكوندريا،إذ يصبح شكل المايتوكوندريا دائرياً بدلا من الشكل البيضوي وأعلى كثافة مقارنة مع المايتوكوندريا الطبيعية[83] يحدث مرض السكري النوع الثاني بسبب انخفاض تدريجي في كتلة خلية بيتا بسبب المايتوكوندريا التي تحدث في حالات مرض السكري٠هذه المتغيرات سوف تقلل من NADH oxidoreductase وانخفاض نشاط citrate synthase في مايتوكوندريا السكري والسمنة مقارنة مع الأشخاص النحيفين،إلى جانب عدد المايتوكوندريا والتشكل يعتمد ايض المايتوكوندريا أيضا على حركة هذه العضيات وتوزيعها ،مثل الاندماج أو الانشطار وهو امر ضروري للحفاظ على وظيفية المايتوكوندريا لتكوين ATP٠

من المسلم به على نطاق واسع أن مسببات مرض السكري النوع الثاني تشمل كلاً من ضعف خلايا بيتا

في البنكرياس ومقاومة الأنسولين في الأنسجة الحساسة للأنسولين ،بما في ذلك الكبد والخلايا الشحمية ،اضافة إلى ذلك ،مرض السكري النوع الثاني يتميز بتدهور القدرة على إفراز الأنسولين وعمله [84] ، وعلى كل حال هناك إجماع عام على أن حساسية الأنسولين تنخفض الى حد كبير في وقت مبكر من دورة حامض الستريك ،في حين يتفاقم ارتفاع السكر في الدم مع مرور الوقت ،ويرتبط ضعف خلايا بيتا مع تضائل قدرة إفراز الأنسولين لمواكبة الطلب التي تفرضها مقاومة الانسولين٠ في المقابل مرض السكري النوع الأول لديه مسببات مختلفة تماما لتدمير المناعة الذاتية لخلايا بيتا في البنكرياس وتتطور هذه العملية على مدى أشهرأو سنوات الى النقطة التي يكون فيها إفراز الأنسولين منخفضاً بما فيه من الكفاية للحث على أعراض ارتفاع السكر في الدم،من تلك النقطة يستمر الهبوط لاستكمال نقص الأنسولين وفي غياب العلاج بالأنسولين،إذ تكون حياة الانسان مهددة٠

وقد قدمت دراسات عديدة أُجريت على الإنسان والقوارض الدلائل على ضعف الفسفرة المؤكسدة في مايتوكوندريا العضلات في حالات مقاومة الأنسولين [87]،إذ تمت دراسة المايتوكوندريا المعزولة من عينات الخزعة العضلية البشرية التي تم الحصول عليها من مرضى السكري النوع الثاني والأفراد الذين يعانون من السمنة أو الأفراد النحيفين ،إذ اظهر هؤلاء الباحثون انخفاض NADH المؤكسد –المختزل وانخفاض فعالية Citrate synthase في مايتوكوندريا السكري والأفراد الذين يعانون من السمنة مقارنة مع الأفراد النحيفين٠



شكل رقم(6-1) زيادة مستوى الكلوكوز يحفز إنتاج ROS من الميتوكوندريا الذي بدوره يحفزNAD, (poly (ADP-ribose(polymerase,PARP))[81]

1.10.1ضعف كفاءة المايتوكوندريا يسبب إعاقة عمل الأنسولين(Mitochondrial dysfunction (causes impaired insulin action

إن فرضية ضعف المايتوكوندريا هو السبب في مقاومة الأنسولين وداء السكري من النوع الثاني أو نتيجة لهذا الاضطراب يبقى مثيراً للجدل،وعمل الأنسولين ينتج من التداخل مع وحدة ثانوية- الفا[84،]٠بالاستجابة للتغيرات الوضعية لفعل الأنسولين في الجزء الداخلي أو الوحدة الثانوية – بيتا بقايا tyrosine تعاني فسفرة ذاتية لتأثير الأشعة تحت الحمراء(IR) يتطلب نشاط Tyrosine kinaseلغرض فسفرة المادة الخلوية للأنسولين من مجموعة جزيئات مستقبلات الأنسولين(IRS)،وهذا ينتج عنه انخفاض في تنشيط Phosphatidylinositol(P13K) وتنشيطAKT (Serine/threonine kinase protein kinase B) في العضلات التي تحتوي على ناقل الكلوكوز الحساس للأنسولين(GLU T4)،مما يؤدي إلى زيادة ايض الكلوكوز في الكبد ،إنَّ الأنسولين ينشط الأنزيمات التي تعيق عملية تخليق السكر ويخفض خروج الكلوكوز من الكبد في الخلايا البطانية ،الأنسولين ينشط أنزيم NOS(Nitric oxide synthase) ناتجا عنه توسع في الأوعية،وجزء من هذه التأثيرات الصادرة من الأنسولين تحفز تداخل البروتين – بروتين وتنشط Mitogen التي بدورها تنشط مسار protein kinase لمصلحة نمو الخلايا إضافة إلى ذلك ضعف المايتوكوندريا قد يؤدي إلى مقاومة الأنسولين وزيادة إنتاج أنواع الأوكسجين الفعالة[85]، وذكر العالم Houstts[86]٠ أن الخلايا الشحمية المعاملة مع عامل نخر الورم(TNF-α) أو (glucogorted) تولد زيادة من بيروكسيد الهيدروجين والجينات المرتبطة مع الإجهاد التأكسدي وأيضا مستويات عالية من السكريات والبروتين، وهذا الأخير يمثل علامة على الإجهاد التأكسدي التراكمي ٠لقد اقترح العلماء مشاركة المايتوكوندريا وذلك بسبب أن كُلاّ من TNF-α,dexamethasoneيمكن أن تحدث في المايتوكوندريا من خلال تشكيل السير أميد، AKT يحث على تغيرات موضعية لناقل الكلوكوز الحساس للأنسولين (GLU T4) في غشاء الخلية[87]٠

على العكس تماما ،الأدلة السريرية أظهرت فعلا الدور الرئيسي للمايتوكوندريا في مقاومة الأنسولين، ومن ثم فإنه من الصعب التأكد ممّا اذا كانت العيوب في المايتوكوندريا تحدث قبل أو بعد حدوث مقاومة الانسولين،واقترحت الأدلة أن اشارات الأنسولين تكون مطلوبة من أجل وظيفة سليمة للمايتوكوندريا،وضخ الانسولين لمدة طويلة يؤدي إلى زيادة إنتاج المايتوكوندريا ل ATPفي العضلات للأصحاء[88]٠في حين أن الأشخاص المصابين بداء السكري النوع الثاني كانت لديهم مقاومة لمثل هذا التأثير،وأشارت دراسات أُجريت على أقارب الأشخاص الذين يعانون من داء السكري النوع الثاني

باستخدام تقنية التحليل الطيفي بالرنين المغناطيسي إلى ضعف الفسفرة التأكسدية ،وضعف تخليق ATP وزيادة الدهون مع قلة امتصاص الكلوكوز انخفاض كثافة المايتوكوندريا ،وانخفاض عملية الاكسدة[89]في TCA٠ومن ثم فأنّ هذه الدراساتُربما تشير عن استعداد وراثي لمرض السكري من النوع الثاني التي تتضمن جينات مهمة في وظيفة المايتوكوندريا٠

ارتفاع السكر في الدم يؤثر على المايتوكوندريا ويسبب موت الخلايا المبرمج [65]٠ومن المعروف جيدا ان المايتوكوندريا تلعب دورا محوريا في تنظيم موت الخلايا المبرمج ومنها اطلاق cytochrome c من المايتوكوندريا الى السايتوبلازم والذي يشارك في تكوين apoptosome والذي يستطيع أجراء سلسلة من ردود الفعل اللاحقة ثم موت الخلايا المبرمج٠

1.11الالتهاب(Inflammation)

الالتهاب هو محاولة الجسم للحماية الذاتية من الخلايا التالفة ،مسببات الأمراض والمواد المهيجة [105]، وهو استجابة وقائية تشمل الخلايا التالفة والأوعية الدموية،إنَّ وظيفة الالتهاب هو القضاء على كل من يسبب تلف الخلية والشروع في إصلاح الأنسجة٠وهو استجابة عامة ومن ثم يعد ذلك بمثابة آلية المناعة الذاتية بالمقارنة مع الحصانة[106]،والالتهاب الحاد قد يؤدي إلى تحطم في الأنسجة،في المقابل الالتهاب المزمن قد يؤدي إلى مجموعة من الامراض مثل الحمى ،والتهاب اللثة ،وتصلب الشرايين،والتهاب المفاصل السرطان (سرطان المثانة)،والالتهاب يسهم في تطور مرض السكري النوع الثاني[108]٠

الالتهاب يمكن أن يصنف الى التهاب حاد وآخر مزمن ،والالتهاب الحاد هو رد الفعل الأولي من الجسم للمؤثرات الضارة ويتحقق من خلال زيادة حركة البلازما وكريات الدم البيض (خاصة الحبيبية) من الدم إلى انسجة المصابين ،وتوجد سلسلة من الأحداث الكيموحيوية تؤدي إلى نضوج الاستجابة الالتهابية، التي تتضمن نظام الأوعية الدموية والجهاز المناعي والخلايا المختلفة داخل الأنسجة المصابة،والالتهاب الحاد هو عملية قصيرة الأجل ،وعادة ما تظهر خلال بضع دقائق أو ساعات[106]، ويتوقف بناء على إزالة الحوافز الضارة ويتضمن استجابة منسقة ومنهجية من مختلف المناعة والغدد الصماء والجهاز العصبي ،وهو استجابة طبيعية صحية ويتميز بخمس علامات رئيسة [107]٠هي الألم،والاحمرار،والتورم،والحرارة وفقدان الوظيفة،وقد وضعت العلامات الأربعة الأولى (العلامات الكلاسيكية) من لدن سيليسوس حوالي 30 قبل الميلاد الى 38 بعد الميلاد[108]٠في حين تمت إضافة فقدان الوظائف في وقت لاحق من لدن جالينوس[109]٠ تبدأ عمليات الالتهاب الحاد من خلايا المناعة الموجودة في الأنسجة المعنية ،وخاصة الضامة الخلايا الجذعية خلايا kupffer والخلايا البدينة في بداية الإصابة

بالحرق أو اصابات أخرى،هذه الخلايا تجتمع لأطلاق وسطاء الالتهابات (TNF-α,IL-6) المسؤولة عن العلامات السريرية للالتهاب ،وتوسع الأوعية الدموية يؤدي إلى زيادة تدفق الدم مسببة الاحمرار وزيادة الحرارة[106].

الالتهاب لمدة طويلة والمعروفة باسم الالتهاب المزمن يؤدي إلى تحول تدريجي في نوع من الخلايا الموجودة في موقع الالتهاب مثل الخلايا وحيدة النواة[110]،ومن الصعوبة تحديد منشأ الالتهابات المزمنة بسبب إسهام عدة ظروف بذلك، ومع مرور الوقت يتحول الالتهاب الحاد إلى مزمن ،إذ ان تراكيز علامات الالتهاب تكون منخفضة باستمرار إلى معتدلة مقارنة مع الالتهاب الحاد فتكون تراكيز علامات الالتهاب عالية[109].

1.12 السايتوكينات (cytokines)

بروتينات صغيرة منخفضة الوزن الجزيئي(20-5كيلو دالتون) تشارك في إشارات الخلايا ،وتعد وسائط مهمة في الاستجابة المناعية قبل الالتهاب وبعدة، وتنتج من خلايا الدم البيض وغير البيض، ويكون عملها إما ذاتيا(على الخلية ذاتها) أو باقي خلايا الهدف المجاورة أو يكون عملها هرمونيا(على الأنسجة بمسافات بعيدة). إنَّ الحركيات الخلوية ترتبط بمستقبلات معينة على الخلايا المستهدفة وكانت تسمى سابقا المفوكينات(almphokine) ،لأنهم في البداية كانوا يعتقدون أنها تنتج عن طريق الخلايا اللمفاوية،وتشمل السايتوكينات:

chemokine,interferons,interlukine,lymphokine وعوامل نخر الورم ويتم إنتاجها من الخلايا اللمفاوية T،والخلايا البدينة ،والخلايا البطانية والخلايا الليفية[108].

تعمل السايتوكينات من خلال المستقبلات وهي مهمة خصوصا في الجهاز المناعي، وتعدل التوازن بين الاستجابات المناعية وخلية القاعدة وتنظيم النضج والنمو،وبعض السايتوكينات تعزز أو تثبط عمل السايتوكينات الأخرى بطرق معقدة[112].

1.12.1 عامل نخر الورم (Tumor Necrosis Factor TNF-α)

السايتوكينات الموالية للالتهابات مثل عامل نخر الورم الفا (TNF-α) الذي تم تشخيصه لأول مرة عام 1968م من قبل الطبيب William coly [113]. يفرز هذا العامل من لدن الضامة والعدلات ويزيد من تنظيم جزيئات الالتصاق على خلايا بطانة الأوعية الدموية ويعمل على زيادة (c-Reactive protein)

من الكبد ،ويمكن أن يؤثر أيضا في الغدة تحت المهاد ويسبب الحمى[114]، ويعمل على تنظيم خلايا المناعة ،وتنشيط مسارات نقل الإشارات للخلية ،وموت الخلايا المبرمج ،والاستجابة الالتهابية وتمايزالخلايا٠ويسبب الحمى من خلال العمل المباشر أو عن طريق تحفيز إفراز(interleukin -1 IL-1) ،تحريض الاستجابة الخلوية لعامل نخر الورم يحدث من خلال اثنين من مستقبلات TNF-α وهي(مستقبلات١ TNF-R1او D120a) ومستقبلات ٢(TNF-R2او D120b)٠يتم تنشيط TNF-α في معظم الأنسجة البشرية بوساطة ربط TNF-αمع TNF-R2٠[108]. ويعتقد أن الخلل في إنتاج TNF-α له علاقة بنشأة مرض الزهايمر[115]والسرطان[116]،و يسهم في تطور مرض السكري النوع الثاني أيضا، وقد تبين أن TNF-α يؤدي دوراً رئيساً في هذه العمليات ،وقد لوحظ زيادة تركيز TNF-αفي الحالات الحادة والمزمنة للالتهابات٠

1.12.2 انترلوكين-٦(IL-6)interlukine-6

انترلوكين-٦ هو من السايتوكينات الموالية للالتهابات[117]٠يفرز من الخلايا التائية T- cells والضامة(macrophages) لتحفيز الاستجابة المناعية ،ويؤدي دورا في مكافحة العدوى[117]٠ IL-6 يحفز العمليات الالتهابية والمناعة الذاتية في العديد من الأمراض مثل داء السكري[118]،وتصلب الشرايين[119]،والاكتئاب[120]،ومرض الزهايمر وسرطان البروستات، والتهاب المفاصل[117].

IL-6 يعمل على التواصل بين الخلايا ومقاومة الالتهاب[119]٠وعمليات أخرى في نظام المناعة مثل رفع درجة الحرارة ،وتنشيط الدورة الدموية ،وزيادة نفاذية الدم،ويوجد بمعدل صغير جدا في الدم ويزداد بمقدار1000 مرة خلال المرض أو العدوى ويرجع انتشاره إلى أنه ينتج في خلايا موزعة في الجسم كُلّه وخاصة الخلايا الضامة (macrophages)على عكس الهرمونات[121].

1.12.3 السايتوكينات ومرض القدم السكري (Cytokines and diabetic foot)

مستويات سكر الكلوكوز المرتفعة تحفز الخلايا الضامة على إنتاج السايتوكينات الالتهابية (M_1) مثل IL-6,IL-12,TNF-αالتي تساعد في إزالة مسببات الأمراض والأنسجة التالفة[122]الخلايا الضامة تؤدي إلى مستويات عالية من السايتوكينات المضادة للالتهابات (M_2) التي تعمل على تعزيز التئام الجروح من خلال تدمير الخلايا الميتة ومنعها من الانتشار وإغلاق الجرح[123] ،ويسهم TNF-α في مرضية القدم السكري ،أذ تكون مستوياته مرتفعة بعد الجروح ،ويكون له دفاع مضاد للجراثيم مما يسبب سرعة التئام الجرح ،ولوحظ انخفاض مستويات السايتوكينات المضادة للالتهابات مثل IL-10 في مرضى السكري

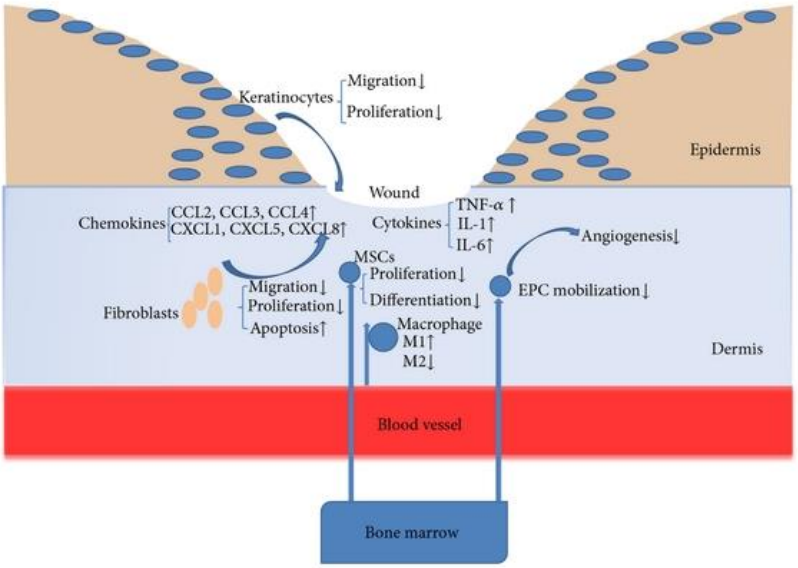
مقارنة مع غير المصابين بمرض السكري[132] . تكون مستويات TNF-α,IL-6مرتفعة بعد مرور 12-24ساعة من الإصابة بالجروح[133]،إذ يسهم TNF-αفي تحفيز الخلايا الليفية والكيراتينية على إنتاج السايتوكينات المضادة للالتهاب التي تساعد في التئام الجروح لمرضى القدم السكري فتكون مستويات TNF-αمرتفعة في مرضى السكري من خلال زيادة الأكسدة التي تعزز الالتهابات[124] (شكل رقم 7-1)

تؤدي السايتوكينات الالتهابية دوراً رئيساً في تطور مرض السكري من خلال تعزيز مقاومة الانسولين في مرض السكري النوع الثاني،إذ إن ارتفاع السكر في الدم يحفز الخلايا الضامة (macrophages) على إنتاج السايتوكينات الالتهابية مثل IL-6،IL-1،– IL-18,TNF-α[123].

تكون مستويات TNF-αمرتفعة بمقدار 3 أضعاف في مرضى القدم السكري من الأفراد العاديين ،وذلك من خلال الأكسدة التي تحفز الالتهابات[124].إنَّ زيادة تولد السايتوكينات تعزز إنتاج السوبر أوكسيد($O_2^{\cdot-}$)[125] المسؤول عن الإجهاد التاكسدي،وفي دراسة جديدة تركز على عدد من السايتوكينات وإشارات البروتين التي تربط لمستقبلات معينة على الخلايا وانطلاق سلسلة من التفاعلات الكيميائية الحيوية داخل الخلية المحفزة (الانترلوكين)،interferous،عوامل نخر الورم(TNF-α)وبعض عوامل النمو من بين الحركيات الخلوية التي توجه العديد من جوانب الاستجابة المناعية ،إذ تفرز هذه السايتوكينات من لدن العديد من الخلايا بما في ذلك الخلايا المعروفة باسم الضامة.وفي دراسات سابقة قام بها استاذ علم الأمراض Gregory freund أظهر الباحثون أن الخلايا الضامة في الفئران المصابة بالسكري والسمنة تفرز فيها السايتوكينات المضادة للالتهابات أكبر من الموالية للالتهابات وأقل من تلك للفئران غير المصابة بالسكري، وقد أظهرت أيضا أن monocytes(وحيدة الخلية) في الإنسان تحت ظروف السكري النوع الثاني ضعف في إشارات (IL-4) الموالي للالتهاب الذي يكون مهما في الاستجابة المناعية ،إذ يوجه الضامة نحو إنتاج السايتوكينات الأخرى المضادة للالتهابات (M_2b) ،ويمنع إفراز السايتوكينات الموالية للالتهابات ،عندما يرتبط IL-4 إلى مستقبلة على الخلية المستهدفة فإنّه ينطلق واحدة من مجموعتين من الأحداث داخل الخلية وقد أثبت Freund أن الالتهاب هو جزء رئيسي في أمراض السكري وذلك بزيادة السايتوكينات الموالية للالتهاب (IL-6،TNF-α) في مرض السكري النوع الثاني ،ولكن تضعف أيضا الاليات المضادة للالتهابات ،مما يؤدي إلى العديد من المشاكل الصحية الرئيسة والثانوية في مرض السكري بما فيها ضعف التئام الجروح لمرضى السكري .تكون مستويات TNF-α،IL-6مرتفعة في مرضى السكري النوع الثاني التي تكون مشجعة لإنتاج معظم بروتينات المرحلة الحادة مثل بروتين سي التفاعلي[126].إنّ الانسولين يؤثر في الخلايا من خلال ملزمة مستقبلات على سطح الخلايا المشجعة لفعل الأنسولين،ومستقبلات الأنسولين تحفز الفسفرة وعدة ركائز، بما في ذلك أفراد من عائلة مستقبلات

الأنسولين الركيزة(IRS)[127]،وتعرض الخلايا ل TNF-α أو مستويات مرتفعة من الأحماض الدهنية الحرة يحفز الفسفرة المثبطة لمخلفاتserine من IRS٠هذه الفسفرة تقلل كلا من فسفرة Tyrosine من IRS-1في الاستجابة للأنسولين وقدرة IRS-1 للربط مع مستقبلات الأنسولين ،ومن ثمّ تمنع عمل الأنسولين[128,129]٠

مؤخرا أصبح من الواضح أن مسارات إشارة الالتهابات يمكن تفعيلها من خلال إجهاد التمثيل الغذائي التي تنشا داخل الخلية وجزيئات الاشارات خارج الخلية٠وقد ثبت أن السمنة الزائدة تؤدي إلى التوتر في الشبكة الاندوبلازمية (Endoplasmic Reticulum) ،الذي يؤدي إلى تفعيل مسارات إشارات الالتهابات ومن ثم يسهم في مقاومة الأنسولين[130]٠بالاضافة إلى ذلك فإنَّ ايض الكلوكوز يؤدي إلى زيادة إنتاج المايتوكوندريا لمركبات الاوكسجين الفعالة ROS،الأمر الذي ينشط ويعزز مسارات الالتهابات خصوصا في حالة السمنة[131]٠ ويتم تنشيط عدة تحركات Serine/threonine التي تنشط الالتهابات وتسهم في تثبيط إشارات الأنسولين٠



شكل رقم(7-1):ميكانيكية ضعف التئام الجروح لمرضى القدم السكري[157] تبدأ عملية التئام الجروح العادية من خلال تكامل إشارات متعددة الخلايا(السايتوكينات وchemokines)الصادرة عن الخلايا الكيراتينية،هجرة broblasts،الخلايا البطانية،الضامة،الصفائح الدموية.ومالى ذلك في مرض السكري،ارتفاع الحركيات الخلوية الالتهابية و chemokinesمثل(TNF-α,IL-1,IL-6,CCL2,CCL3,CCL4,CXCL1,CXCL5)وcxcl8.تشمل العمليات الخلوية في مرض السكري الخلايا الكيراتينة الغير طبيعية وهجرة broblastوالانتشار وتعزيز موت الخلايا المبرمج استقطاب الغير طبيعي للضامة(زيادة الحركيات الخلوية الموالية للالتهاب M1الضامة وانخفاض الحركيات الخلوية المضادة للالتهاب M2الضامة) تجنيد ضعاف الخلايا الجذعية الوسطية(MSCs)والخلايا الاصلية البطانية(EPCs) وانخفاض الاوعية الدموية .

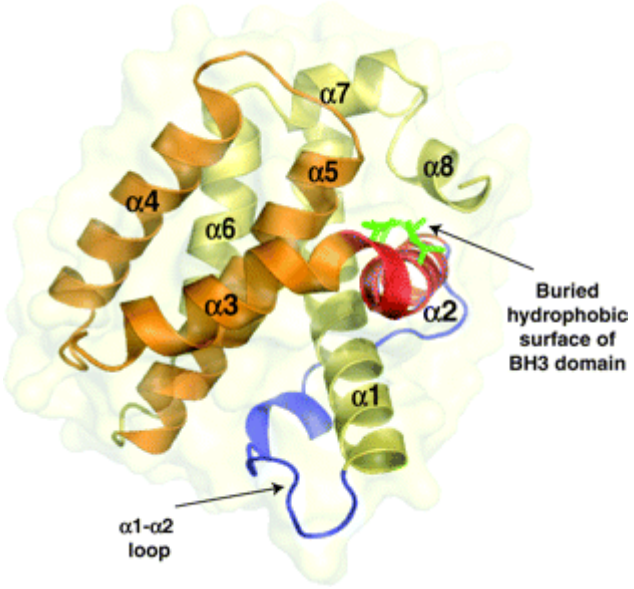
BCL-2(B-Cell lymphoma-2) 1.13

هو من عائلة البروتينات المناهضة والمؤيدة لموت الخلايا المبرمج ،إذ يعمل على تعزيز بقاء الخلية عن طريق قمع موت الخلايا المبرمج الناتج من المؤثرات التي تتعرض لها الخلايا مثل الاشعاع والعلاج الكيمياوي[90].ويقع في الغشاء الخارجي للمايتوكوندريا،الغلاف النووي والشبكة الاندوبلازمية ويؤثر في وظيفة المايتوكوندريا ويشارك في تنظيم الانصهار والانشطار للمايتوكوندريا والسيطرة على

النشاطات الأيضية وقد تم تحديد أكثر من خمسة وعشرين عضوا في أسرة Bcl-2،ويمكن أن تنقسم إلى ثلاث مجموعات وظيفية[103].أعضاء المجموعة الأولى تشمل Bcl-2,Bcl-XL وتتميز بوجود أربعة من Bcl-2 تسمى التماثل (BH) التي تشمل المجالات (BH1-BH4) وهي مضادة لموت الخلايا

المبرمج(anti-apoptotic)،أما المجموعة الثانية فتشملBax,Bak ولها نفس تركيب المجموعة الأولى وينقصها وجود النطاق BH-4 وتكون محفزة لموت الخلايا المبرمج(Pro-apoptotic)،أمّا المجموعة الثالثة فتضم مجموعة متنوعة من البروتينات المؤيدة لموت الخلايا المبرمج مثل Bid٠

يتكونBcl-2 من ثمانية لوالب الفا(α-helices)متصلة بوساطة حلقات متفاوتة بالطول[104]٠اثنين من اللوالب المركزية يشكل جوهر البروتين(α-5 ، α-6)،ويحيط اللوالب من جانب واحد من قبل (α-3،α-4) ومن الجانب الاخر من قبل(α-1،α-2) وتوجد حلقة بين اللوالب(α-1,α-2)٠ المجالات(BH1,BH2,BH3)هي الأقرب إلى بعضها وتشكل الجزء العلوي من الأخدود(الشكل 7-1) ويتكون الجزء السفلي من هذا الأخدود من اللوالب (α-3،α-4) [138]٠



شكل رقم(8-1):تركيب Bcl-2[104]

1.13.1 دور Bcl-2 في مرض القدم السكري(Role of Bcl-2 in Diabetic Foot)

يعمل Bcl-2على منع إطلاق cytochrome C من المايتوكوندريا إلى العصارة الخلوية الذي يعمل على موت الخلايا المبرمج المؤدي إلى الالتهابات المستمرة ،بسبب الفشل بالقضاء على البكتريا وعند ضعف المايتوكوندريا في مرض السكري يتحرر cytochrome C من الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا إلى العصارة الخلوية ويسبب موت الخلايا٠يسيطرBcl-2على إفراز الأنسولين وتنظيم ايض الكلوكوز ويحافظ على المايتوكوندريا من الإجهاد التأكسدي الناجم من ارتفاع السكر في الدم ،إذ يعمل على حماية خلايا بيتا في البنكرياس من الإجهاد التأكسدي ومنع استجابة خلايا بيتا إلى ارتفاع سكر الكلوكوز وانخفاضه يؤثر في وظيفة خلية بيتا وإفراز الأنسولين، ينخفض BCL-2 في مرضى القدم السكري مقارنة مع السيطرة أي أن هناك مؤشراً عالياً لموت الخلايا المبرمج المؤدي إلى الالتهاب المستمر٠

1.14 أهداف الدراسة Aims of the study

الدراسة ركزت على الجوانب التالية في كل من الأفراد الأصحاء والمرضى:

1- دراسة السايتوكينات (IL-6,TNF-α) بوصفها مؤشرات على الالتهاب والاستجابة المناعية لدى مرضى السكري.

2- التحري عن دور الإجهاد التأكسدي ومضادات الأكسدة (SOD,CAT) ودورها في حث الالتهاب لدى مرضى القدم السكري.

3- التحري عن دور أنزيم الميلوبيروكسيدز(MPO) كمؤشر كيما حيوي في تحديد الاستجابة المناعية عند الانسان.

4- التحري عن قصور وظيفة المايتوكوندريا ودورها في مرضية القدم السكري.

5- دراسة بعض الجينات على سبيل المثال (BCl_2) ذات الأهمية في وظيفة المايتوكوندريا واستقراريتها ودورها في توليد ROS.

الفصل الثاني

المواد وطرق العمل

Material and Methods

2.المواد وطرائق العمل

2.1المواد الكيمياوية

جدول رقم (2-1):المواد الكيمياوية والعدد kits المستعملة في الدراسة

المواد الكيمياوية (chemicals)	المصدر (source)
لمفوبريت	Bioneer-korea
Mitospy green	U.S.A-prolenged
MPO Kit	U.S.A-Cloud-clone corp.
TNF-α kit	Bioneer-korea
IL-6 Kit	Bioneer-korea
Real time PCR(Sybr green)	Bioneer-korea
RNA Kit extraction	Favorgen –Taiwan
SOD Kit	Bioneer-korea
CAT Kit	Bioneer-korea
Primers(BCL-2 and Human –beta Actin)	Bioneer-korea
Mllv-Cdna	INtRON-Korea
Random nonamer	INtRON-Korea
Dimethyl sulfoxide(DMSO)	BDH-England
β-mercaptoethanol	Scharlau-spain
زايلول(xylene)	BDH-England
ماء مقطر(D.W)	

2.2المعدات (Equipment)

جدول رقم (2-2):الأدوات المستخدمة في الدراسة

الاداة	الشركة	المنشأ
Micropipette(10-100 µL)	CBPP	U.K
Micropipette(100-1000 µL)	GWP	U.S.A

Micropipette(5-50 µL)	GWP	U.S.A
Syringe(5 ml)	Xiang-Jiang	China
Multichannel pipette(50-300µL)	BIOHIT	U.K
96-Well plate	Bioneer	Korea
جهاز الطرد المركزي(centrifuge)	HeNirH,model EBA 20	Germany
حجرة التجميد(freezer)	CONCORD	U.K
حاضنة(incubator)	Memmert	Germany
Plate reader	Bio Teck	U.S.A
هزاز(Maxior shaker)	STUART	U.K
انابيب بلاستيكية مغطاة لحفظ الدم(capped plastic tubes)		China
micro centrifuge	Lab Tach,model GMC-361	U.S.A
جهاز Thermocycler	Eppendort	Germany
Fluorescence microscope	Leica	U.S.A
Thermal Cycler	Analytikjena	Germany

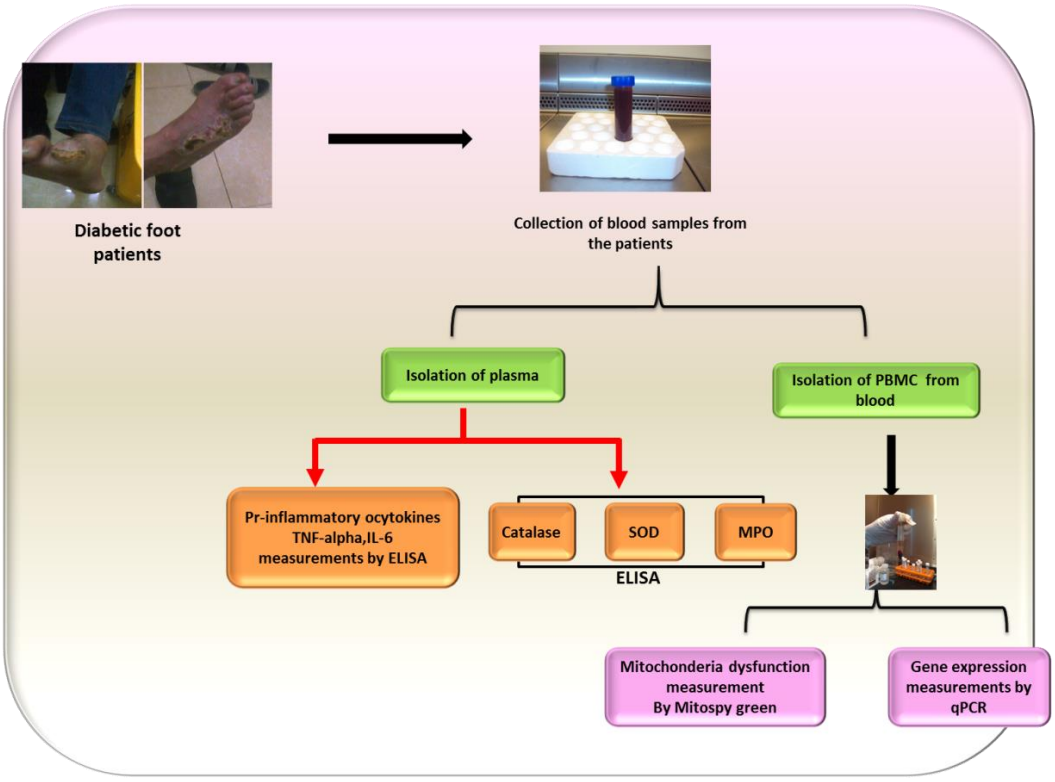
2.3 مكونات العدة (kit components)

جدول رقم (2-3):مكونات العدة(ELISA Kit components)

الفقرة (Item)	المواصفات	التخزين
صفيحة ELISA	12في 8 wells strips	4/-20 درجة مئوية
Reference standard	2 vials	4/-20 درجة مئوية
Reference standard and sample Diluent	1vials في 20 ml	4 درجة مئوية
Biotinylated Detection Abالمركز	1vials في 120µL	4/-20 درجة مئوية

Biotinylated Detection Abالمخفف	1 vials في 10 ml	4 درجة مئوية
HRP Conjugate المركز	1 vials في 120µL	4 درجة مئوية(بعيدا عن الضوء)
HRP Conjugate المخفف	1 vials في 10 ml	4 درجة مئوية
محلول غسيل منظم مركز	1 Vials في 30 ml	4 درجة مئوية
محلول المادة الاساس(standard reagent)	1 vials في 10 ml	4 درجة مئوية(بعيدا عن الضوء)
حامض الكبريتيك(H_2SO_4)	1 vials في 10 ml	4 درجة مئوية
غطاء صفيحة ELISA	5 قطع	
كتيب بطريقة العمل(manual)	1نسخة	
شهادة تحليل (certificate of analysis)	1نسخة	

2.4 تصميم الدراسة (study design) اجريت الدراسة للفترة من شباط لغاية شهر تشرين الأول 2016 لمرضى القدم السكري الذين تم اختيارهم في مستشفى الديوانية التعليمي ووحدة قدم السكري في مستشفى السماوة التعليمي ،وتم إجراء كافة التحاليل المختبرية في مختبرات كلية الطب جامعة القادسية. شكل(2.1)



شكل رقم2.1 تصميم الدراسة

2.4.1 اعتبارات أخلاقيات العلوم الحيوي (Bioethical considerations)

تم الحصول على الموافقات الشفوية والكتابية من مرضى القدم السكري والأصحاء المشاركين في الدراسة.

2.4.2 اختيار المرضى

تم دراسة 30 شخص مصاب بالقدم السكري تتراوح أعمارهم بين(41-75) شاركوا في الدراسة بينهم (13 ذكور و17 اناث) ،وكذلك 30شخصاً سليم تتراوح أعمارهم بين (40-71) بينهم 15 ذكور 15 اناث (مجموعة سيطرة) بعد أخذ الموافقة،وتم استبعاد المرضى الذين يعانون من أمراض أخرى مثل أمراض القلب ،وارتفاع ضغط الدم ،واضطراب شحوم الدم من الدراسة.

2.5جمع عينات الدم (sample collection)

بعد أخذ الموافقة المسبقة من مرضى القدم السكري والسيطرة (15ذكور،15اناث) ،تم أخذ 5 ml من الدم الوريدي ووضعة في أنابيب نظيفة تحتوي على EDTA(Ethylene Diamine Tetra Acetic

(acid كمضاد للتخثر ،ثم تم فصل البلازما بوساطة جهاز الطرد المركزي (centrifuge) بسرعة 3000 rpm لمدة 15-10 دقيقة ،وتم خزن البلازما في انابيب بلاستيكية مغطاة بدرجة حرارة - 20 درجة مئوية لحين إجراء التحاليل ،والنماذج التي فيها تحلل دموي(Hemolysis) قد استبعدت لأنها تؤثر في النتائج.

جدول رقم (4-2): النماذج والمجاميع المستخدمة في التجربة

المجموعة	السيطرة	المرضى
عدد العينات	30	30
معدل العمر	48.5 ± 0.253	53.33 ± 0.261
مستوى الكلوكوز mg/dl	105.10 ± 1.228	265.1053 ± 0.628
مستوى الكولسترول mg/dl	123 ± 0.852	161 ± 0.455
مستوى اليوريا mg/dl	19.370 ± 0.43	40.47059 ± 0.253
Body Mass Index(BMI) kg/m^2	20.5 ± 2.3	23.8 ± 3.5

2.6 قياس فعالية انزيم السوبراوكسيددسمويتز(SOD) في بلازما الدم باستخدام طريقة ELISA من Elabscienc

جدول رقم(5-2): محتويات العدة (Kit contents)

الكواشف (Reagents)	الكمية (Quantity)
صفيحة ELISA (96 Well)	1
محلول القياسي (standard)	2
Detection Reagent A	1 في 120 µL
Detection Reagent B	1 في 120 µL
TMB(Tetra Methyl Benzedine)substrate	1 في 9 ml
محلول غسيل (wash Buffer)	1 في 20 ml

غطاء صفيحة ELISA	4
Standard Diluent	1 في 20 ml
Assay Diluent A	1 في 12 ml
Assay Diluent B	1 في 12 ml
Stop solution	1 في 6 ml
كتيب بطريقة العمل(manual)	1

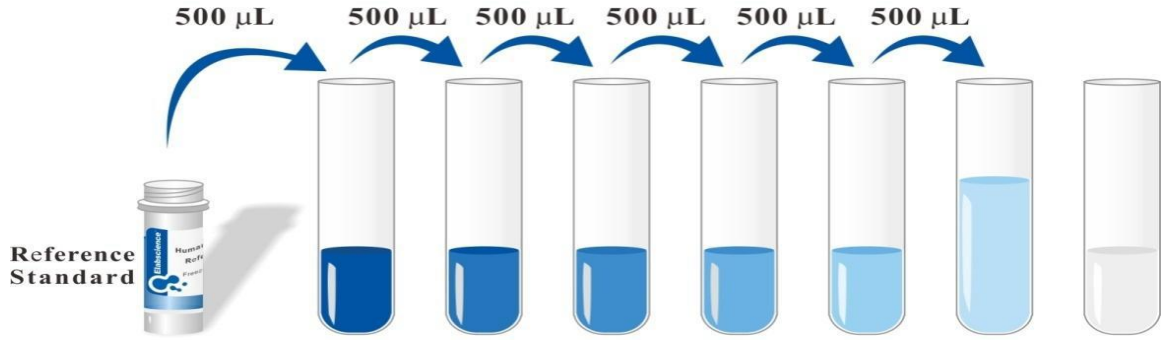
2.6.1 مبدأ الاختبار (Test principle)

تضاف المحاليل القياسية أو العينات إلى الصفيحة المغطاة مسبقا بالأجسام المضادة المحددة لأنزيم SOD(Superoxide dismutase) ،فتقوم الأجسام المضادة الموجودة على جدران الصفيحة بالارتباط بالانتيجين الخاص بأنزيم SOD لتكون معقداً اولياً لانتيجين-الجسم المضاد بعدها يضاف Biotinylated Detection Ab إلى الصفيحة ،ليكون معقد ثانوي ،بعدها يضاف أنزيم هوردج بيروكسايدزالمقترن (Avidin-Horseradish Peroxidase HRP) إلى الصفيحة وتحضن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ومن ثم يضاف محلول المادة الأساس (Tetra Methyl Benzedine TMB)٠تفاعل الانزيم –المادة الاساس يقدر بإضافة حامض الكبريتيك (H_2SO_4) إلى الصفيحة ويقاس تغير اللون (من الأزرق الى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA٠إنَّ تركيز انزيم SOD في النماذج يقدر بوساطة مقارنة الكثافة الضوئية(O.D) للعينات إلى المنحني القياسي[141]

2.6.2تحضير الكواشف (Reagents preparation)

1-تحضير المحلول القياسي(standard solution): يحضر قبل 15 دقيقة من الاستعمال ،وذلك بإضافة 1 ml من محلول التخفيف الخاص للعينة أو القياسي(Reference standard&sample diluent) إلى المحلول القياسي (Reference Standard) ،وتم مزج المحلول باستخدام الهزاز (mixor shaker) للحصول على محلول التركيز الاساس(stock solution) بتركيز 4000 pg/ml بعدها تم سحب 500 µL من محلول Stock solution ويضاف له 500 µL من

محلول(Reference stsndard&sample Diluent) للحصول على محلول قياسي بتركيز 2000 pg/ml وهكذا بالنسبة لباقي التراكيز(0,62.5,125,250,500,1000 pg/ml)٠



شكل رقم (2-2):تحضير المحلول القياسي لقياس انزيم SOD

2- محلول الغسيل (wash Buffer):يحضر بإضافة 30 ml من concentrated wash Bufferالى 750 ml من الماء المقطر٠

3- محلول Biotinylated Detection Ab: يحضر بنسبة تخفيف(1:100)، وذلك بإضافة 500µL من concentrated Biotinylated Detection Ab إلى 4.950 µL من محلول التخفيف الخاص(Biotinylated Detection Ab)٠

4- محلول HRP Conjugate: يحضر بنسبة تخفيف(1:100) وذلك بإضافة يحضر 100 µL من (Concentrated HRP Conjugate إلى 9.900 µL من HRP Conjugate Diluent)٠

2.6.3 طريقة العمل (procedure)

1- إضافة 50 µL من المحلول القياسي أوالنموذج إلى كل حفرة في الصفيحة٠

2- إضافة 50 µL من Biotinylated Detection Ab إلى كل حفرة في الصفيحة٠

3- حضن الصفيحة لمدة 45 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

4- إزالة السوائل من الصفيحة وغسلها بمحلول الغسيل ثلاث مرات٠

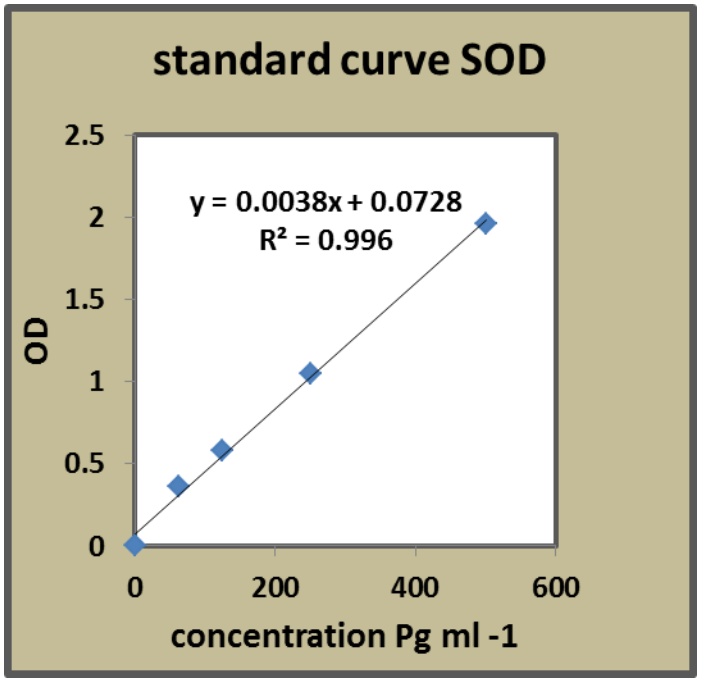
5- إضافة 100µL من HRP Conjugate إلى كل حفرة في الصفيحة،ثم حضن الصفيحة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

6- تم إزالة السوائل من الصفيحة وغسلها 5 مرات.

7- إضافة 90µL من محلول المادة الأساس(TMB) ،وحضن الصفيحة بدرجة حرارة37 درجة مئوية.

8- إضافة 50 µL من محلول حامض الكبريتيك(Stop solution) وقراءة التغير باللون (من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm.

9- حساب النتائج.



شكل رقم (3-2):المنحى القياسي لأنزيم SOD

2.7 قياس فعالية أنزيم كاتليز Catalase في البلازما باستخدام بطريقة ELISA من Elabscience

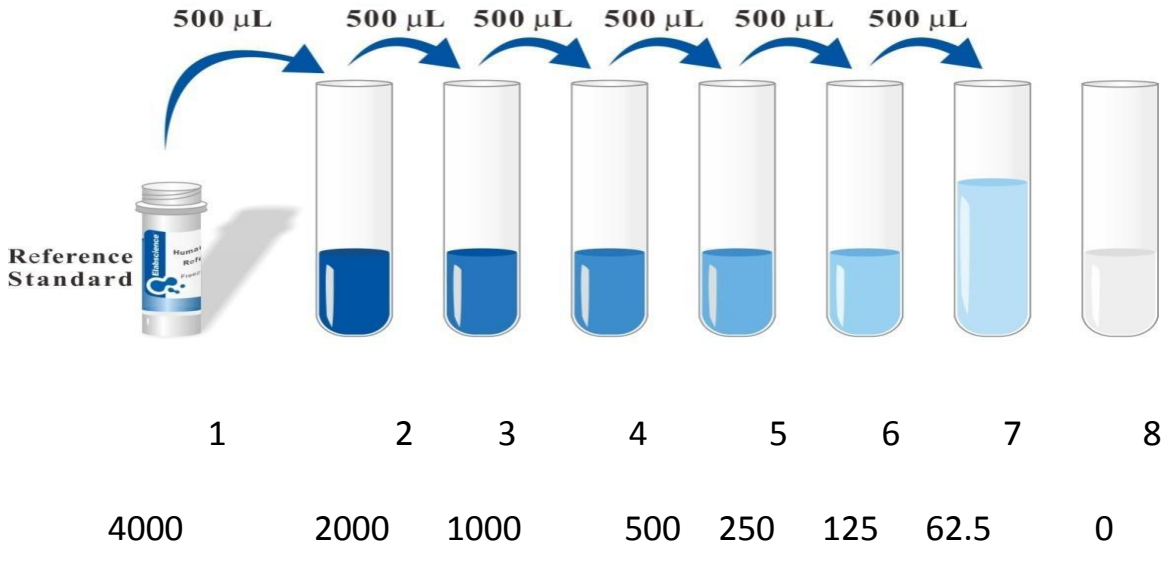
2.7.1 مبدأ الاختبار(Test principle)

تضاف المحاليل القياسية أو العينات إلى الصفيحة المغطاة مسبقا بالأجسام المضادة المحددة لأنزيم Catalase ،فتقوم الأجسام المضادة الموجودة على جدران الصفيحة بالارتباط بالانتيجين الخاص بأنزيم

catalase ،لتكون معقداً اولياً لانتيجين-الجسم المضاد بعدها يضاف Biotinylated Detection Ab الى الصفيحة ،ليكون معقد ثانوي بعدها يضاف أنزيم بيروكسايدز الفجل الحار(HRP) إلى الصفيحة وتحضن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ، ومن ثم يضاف محلول المادة الأساس TMB(Tetra Methyl Benzedine)٠تفاعل الانزيم –المادة الأساس يقدر بإضافة حامض الكبريتيك (H_2SO_4) إلى الصفيحة ويقاس تغير اللون(من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA٠إنَّ تركيز انزيم CAT في النماذج يقدر بوساطة مقارنة الكثافة الضوئية (O.D) للعينات إلى المنحني القياسي[141]

2.7.2 تحضير الكواشف (Reagents preparation)

1- المحلول القياسي (standard solution): يحضر قبل 15 دقيقة من الاستعمال وذلك بإضافة 1 ml من محلول التخفيف الخاص للعينة أو القياسي (Reference standard&sample diluent) إلى المحلول القياسي (Reference Standard) ،وتم مزج المحلول باستخدام الهزاز(maxior shaker) للحصول على محلول التركيز الأساس(stock solution) بتركيز 4000 pg/ml ،بعدها تم سحب 500 µL من محلول Stock solution ويضاف له 500µL من محلول (Reference standard&sample Diluent) للحصول على محلول قياسي بتركيز 2000 pg/ml وهكذا بالنسبة لباقي التراكيز(0,62.5,125,250,500,1000 pg/ml)



شكل رقم -(2.4):تحضير المحلول القياسي لقياس انزيم CAT

2- محلول الغسيل (wash Buffer):يحضر بإضافة 30 ml منconcentrated wash Buffer الى 750 mlمن الماء المقطر٠

3- محلول Biotinylated Detection Ab: يحضر بنسبة تخفيف(1:100) ،وذلك بإضافة500 µL منconcentrated Biotinylated Detection Ab إلى 4.950 µL من محلول التخفيف الخاص (Biotinylated Detection Ab)٠

4- محلول HRP Conjugate: يحضر بنسبة تخفيف (1:100) ،وذلك بإضافة 100 µL من(Concentrated HRP Conjugate) إلى 9.900 µL من (HRP Conjugate Diluent)٠

شكل رقم (5-2): صفيحة ELISA انزيم Catalase

2.7.3 طريقة العمل (procedure)

1- إضافة 100 µL من المحلول القياسي أو النموذج إلى كل حفرة في الصفيحة٠

2- حضن الصفيحة لمدة 90 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

3- إزالة السائل من الصفيحة وإضافة 100 µLمن Biotinylated Detection Ab وحضن الصفيحة لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

4- إزالة السوائل وغسل الصفيحة 3مرات (لتخلص من الأجسام المضادة غير المرتبطة مع الانتيجين في العينة)٠

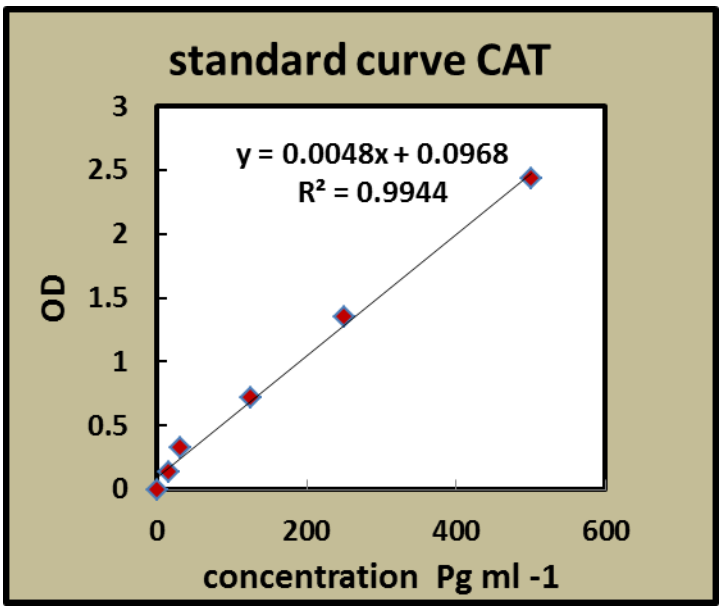
5- *إضافة* 100µL من HRP Conjugate إلى كل حفرة في الصفيحة،وتم حضن الصفيحة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

6- إزالة السوائل من الصفيحة وغسلها 5 مرات٠

7-إضافة 90 µL من محلول المادة الأساس(TMB) وحضن الصفيحة لمدة 15دقيقة بدرجة حرارة 37درجة مئوية٠

8- إضافة 50 µL من محلول حامض الكبريتيك (Stop solution)لأنهاء التفاعل وقراءة التغير(من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA٠

9- حساب النتائج٠



شكل رقم (6-2):المنحى القياسي لأنزيم CAT

2.8 قياس فعالية عامل نخر الورم(TNF-α))باستخدام طريقة ELISA

2.8. 1 مبدا الاختبار(Test principle)

تضاف المحاليل القياسية أو العينات إلى الصفيحة المغطاة مسبقا بالأجسام المضادة المحددة لعامل

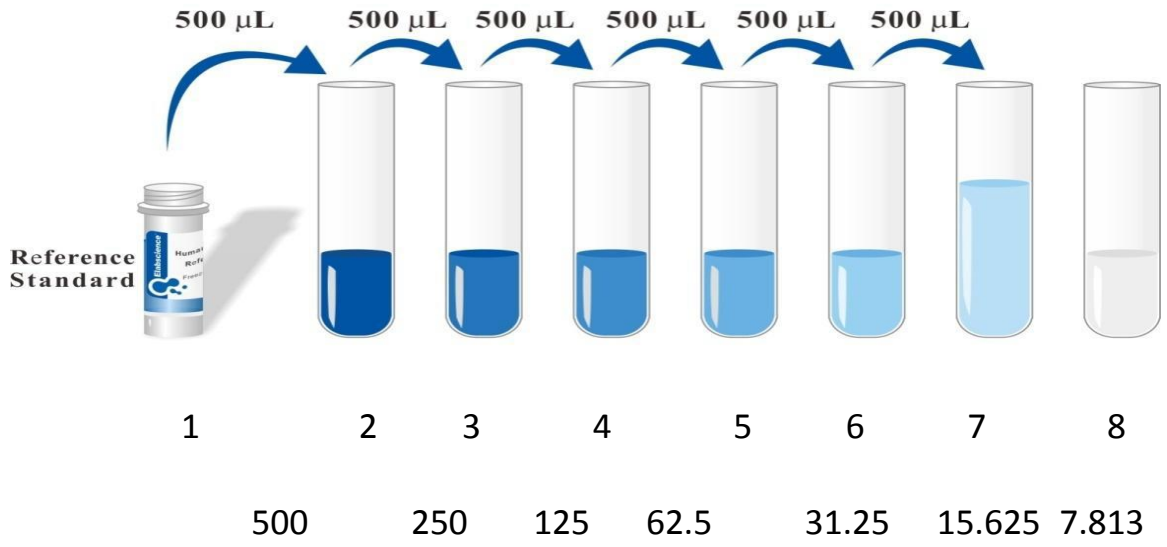
نخر الورم (TNF-α) ،فتقوم الأجسام المضادة الموجودة على جدران الصفيحة بالارتباط بالانتيجين الخاص بعامل نخر الورم لتكون معقداً اولياً لانتيجين-الجسم المضاد بعدها يضاف Biotinylated Detection Ab إلى الصفيحة ليكون معقد ثانوي بعدها يضاف أنزيم هوردج بيروكسايدزالمقترن(HRP) إلى الصفيحة وتحضن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ، ومن ثم يضاف محلول المادة الأساس (Tetra Methyl Benzedine)TMB٠تفاعل الأنزيم –المادة الأساس يقدر بإضافة حامض الكبريتيك (H_2SO_4) إلى الصفيحة ويقاس تغير اللون(من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA٠ إنَّ تركيز عامل نخر الورم في النماذج يقدر بوساطة مقارنة الكثافة الضوئية(O.D) للعينات إلى المنحني القياسي[142]٠

2.8.2 تحضير الكواشف (Reagents preparation)

1محلول الغسيل (wash Buffer):يحضر بإضافة 30 mlمنconcentrated wash Buffer الى750 mlمن الماء المقطر٠

2-محلول المادة الأساس(substrate reagent): يحضر بمزج كميات متساوية من (substrate reagent A) مع (substrate reagent B)٠

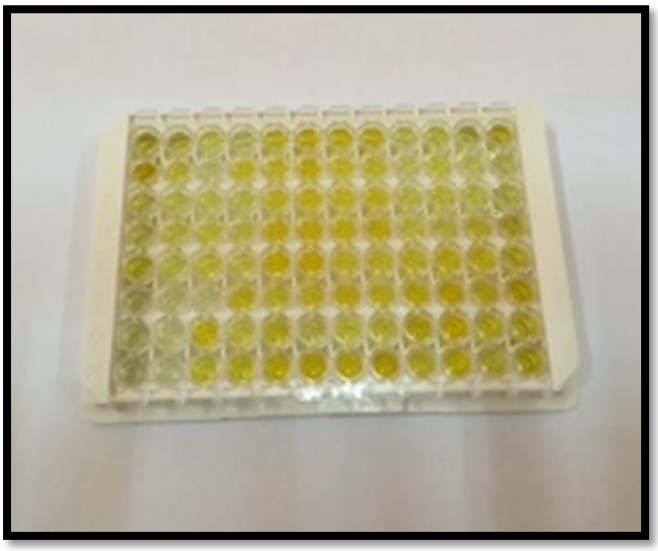
3-المحلول القياسي (standard solution): يحضر قبل 15دقيقة من الاستعمال ،وذلك بإضافة1 mlمن محلول التخفيف الخاص للعينة أو القياسي(Reference standard&sample diluent) إلى المحلول القياسي(Reference Standard) ،وتم مزج المحلول باستخدام الهزاز(maxior shaker) للحصول على محلول التركيز الاساس(stock solution) بتركيز500 pg/ml ،بعدها تم سحب 500 µL من محلول Stock solution ويضاف له 500µL من محلول (Reference standard&sample Diluent للحصول على محلول قياسي بتركيز250 pg/ml وهكذا بالنسبة لباقي التراكيز(0,7.813,15.625,62.5,125pg/ml)٠



شكل رقم (2-7):تحضير المحلول القياسي لقياس عامل نخر الورم(TNF-α)

4-محلول Biotinylated Detection Ab: يحضر بنسبة تخفيف(1:100) ،وذلك بإضافةµL 500 من concentrated Biotinylated Detection Ab إلى µL 4.950 من محلول التخفيف الخاص (Biotinylated Detection Ab)٠

5- محلول HRP Conjugate: يحضر بنسبة تخفيف (1:100) ،وذلك بإضافة µL 100 من(Concentrated HRP Conjugate) إلى µL 9.900 من (HRP Conjugate Diluent٠



شكل رقم (8-2): صفيحة ELISA عامل نخر الورم TNF-α

2.8.3 طريقة العمل (procedure)

1- إضافة 100µL من المحلول القياسي أو النموذج إلى كل حفرة في الصفيحة والحضن لمدة 90 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

2- إزالة السائل من الصفيحة وإضافة 100µL من Biotinylated Detection Ab وحضن الصفيحة لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

3- إزالة السوائل وغسل الصفيحة 3مرات بمحلول الغسيل.

4- *إضافة* 100µL من HRP Conjugate إلى كل حفرة في الصفيحة،وتم حضن الصفيحة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

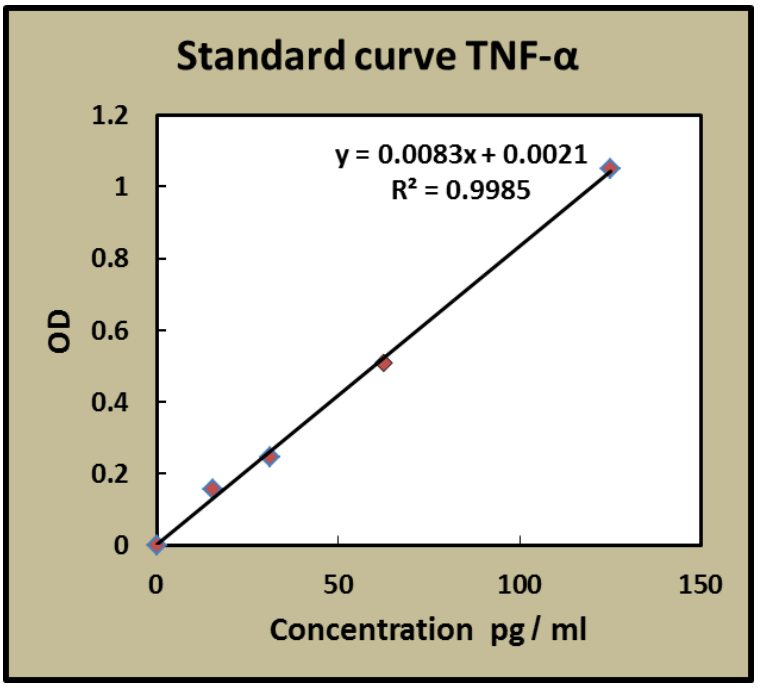
5- إزالة السوائل من الصفيحة وغسلها 5 مرات.

6- إضافة 90 µL من محلول المادة الأساس(TMB) وحضن الصفيحة لمدة 15 دقي

قة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

7- إضافة 50 µL من محلول حامض الكبريتيك(Stop solution) لأنهاء التفاعل وقراءة التغير(من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA

8- حساب النتائج.



شكل رقم (2-9):المنحى القياسي لأنزيم TNF-α

2.9 قياس انترلوكين-٦(Interlukin-6 IL-6) في بلازما الدم بطريقة ELISA من Elabscience

2.9.1 مبدأ الاختبار(Test principle)

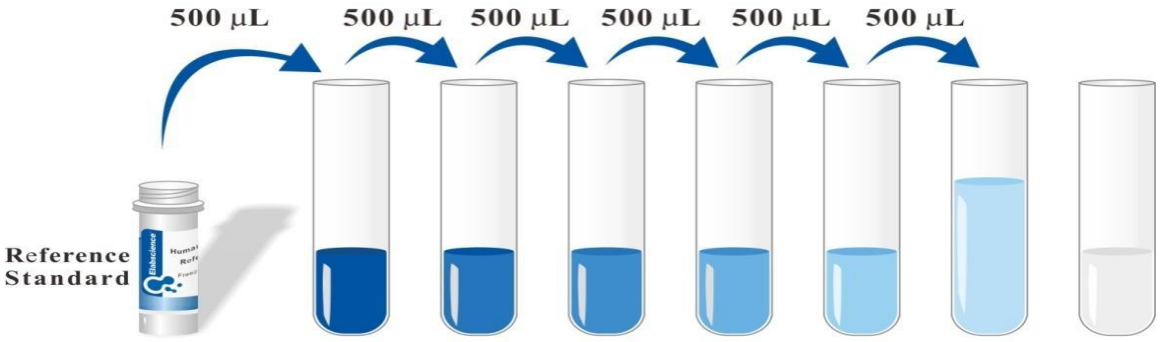
تضاف المحاليل القياسية أو العينات إلى الصفيحة المغطاة مسبقا بالأجسام المضادة المحددة لأنزيم **(Interlukin-6 IL-6)**فتقوم الأجسام المضادة الموجودة على جدران الصفيحة بالارتباط بالانتيجين الخاص باترلوكين -٦ لتكون معقداً اولياً لانتيجين-الجسم المضاد بعدها يضاف Biotinylated Detection Ab إلى الصفيحة ليكون معقد ثانوي بعدها يضاف أنزيم هوردج بيروكسايدز المقترن(HRP) إلى الصفيحة وتحضن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ، ومن ثم يضاف محلول المادة الأساس TMB(Tetra Methyl Benzedine)٠تفاعل الانزيم –المادة الأساس يقدر بإضافة حامض الكبريتيك(H_2SO_4) إلى الصفيحة ويقاس تغير اللون(من الأزرق إلى الأصفر) بطول

موجي 450 nm بجهاز ELISA٠إنَّ تركيز انترلوكين -٦في النماذج يقدر بوساطة مقارنة الكثافة الضوئية(O.D) للعينات إلى المنحني القياسي[142]٠

2.9.2 تحضير الكواشف(Reagents preparation)

1-محلول الغسيل (wash Buffer):يحضر بإضافة 30 ml من concentrated wash Bufferالى750 ml من الماء المقطر٠

2-المحلول القياسي(standard solution): يحضر قبل 15 دقيقة من الاستعمال وذلك بإضافة1ml من محلول التخفيف الخاص للعينة أو القياسي(Reference standard&sample diluent) إلى المحلول القياسي(Reference Standard) ،وتم مزج المحلول باستخدام الهزاز(maxior shaker) للحصول على محلول التركيز الأساس(stock solution) بتركيز500 pg/ml ،بعدها تم سحب 500 µL من محلول Stock solution ويضاف له 500 µL من محلول(Reference standard&sample Diluent) للحصول على محلول قياسي بتركيز250 pg/ml وهكذا بالنسبة لباقي التراكيز(0,7.813,15.625,62.5,125pg/ml)٠



شكل رقم (2-10):تحضير المحلول القياسي لقياس انترلوكين-٦

3-محلول Biotinylated Detection Ab: يحضر بنسبة تخفيف(1:100) ،وذلك بإضافة500 µL من concentrated Biotinylated Detection Ab إلى 4.950 µL من محلول التخفيف الخاص(Biotinylated Detection Ab)٠

4-محلول HRP Conjugate: يحضر بنسبة تخفيف(1:100) ،وذلك بإضافة 100 µL من(Concentrated HRP Conjugate) إلى 9.900 µL من (HRP Conjugate Diluent٠

2.9.3 طريقة العمل (procedure)

1 - إضافة 100µL من المحلول القياسي أو النموذج إلى كل حفرة في الصفيحة والحضن لمدة 90 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

2- إزالة السائل من الصفيحة وإضافة 100µL من Biotinylated Detection Ab وحضن الصفيحة لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

3- إزالة السوائل وغسل الصفيحة 3مرات بمحلول الغسيل٠

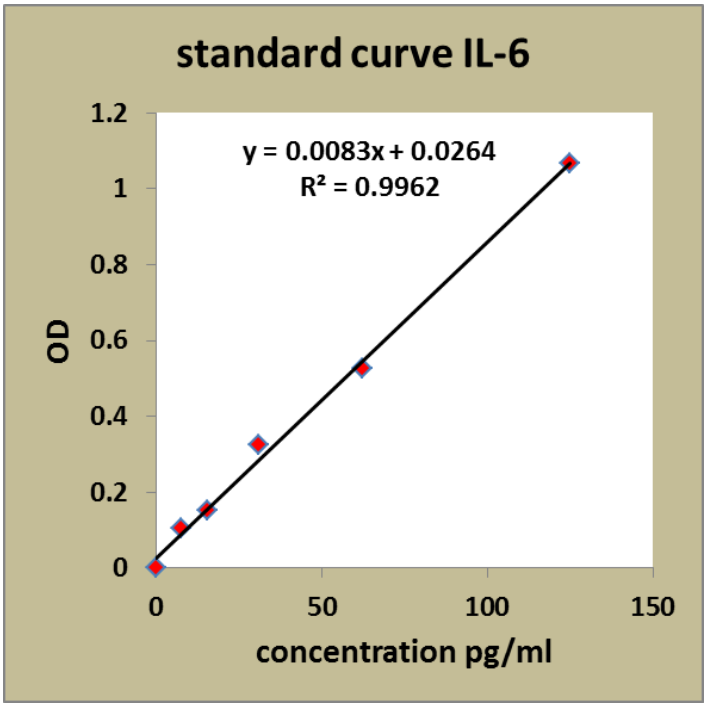
4- *إضافة* 100µL من HRP Conjugate إلى كل حفرة في الصفيحة،وتم حضن الصفيحة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

5- إزالة السوائل من الصفيحة وغسلها 5 مرات٠

6- إضافة 90µL من محلول المادة الأساس(TMB) وحضن الصفيحة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 37درجة مئوية٠

7-تم إضافة 50 µL من محلول حامض الكبريتيك(Stop solution)لأنهاء التفاعل وقراءة التغير(من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA٠

8- حساب النتائج٠



شكل رقم (11-2):المنحى القياسي لأنزيم IL-6

2.10 قياس فعالية انزيم(Myeloperoxidase MPO) في بلازما الدم باستخدام طريقة ELISA

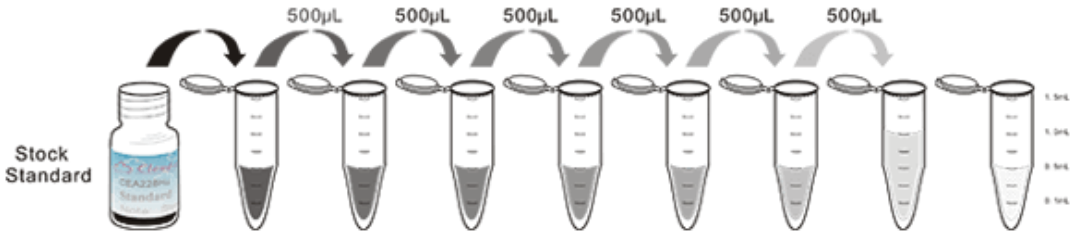
2.10.1 مبدأ الاختبار(Test principle)

تضاف المحاليل القياسية أو العينات إلى الصفيحة المغطاة مسبقا بالأجسام المضادة المحددة لأنزيم **(Myloperoxidase MPO)**،فتقوم الأجسام المضادة الموجودة على جدران الصفيحة بالارتباط بالانتيجين الخاص بأنزيم MPO لتكون معقداً اولياً لانتيجين-الجسم المضاد بعدها يضاف Biotinylated Detection Ab إلى الصفيحة ليكون معقداً ثانوياً بعدها يضاف أنزيم هوردج بيروكسايدز المقترن(HRP) إلى الصفيحة وتحضن بدرجة حرارة 37درجة مئوية ومن ثم يضاف محلول المادة الأساس TMB(Tetra Methyl Benzedine)،تفاعل الأنزيم –المادة الأساس يقدر بإضافة حامض الكبريتيك(H_2SO_4) إلى الصفيحة ويقاس تغير اللون(من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA، إنَّ تركيز انزيم MPOفي النماذج يقدر بوساطة مقارنة الكثافة الضوئية(O.D) للعينات إلى المنحني القياسي[143].

2.10.2 تحضير الكواشف (Reagents preparation)

١-محلول الغسيل (wash Buffer):يحضر بإضافة 10 ml من (wash solution concentrate)الى290mlمن الماء المقطر٠

2-المحلول القياسي(standard)ويحضر بإضافة 1mlمن محلول standard Diluent إلى محلول standardويحفظ لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال ،وبذلك يتم الحصول على محلول stockبتركيز10000 pg/mlبعدها يتم سحب 500µL من محلول Stock solution ويُضاف له 500µL من محلول(التخفيف)للحصول على محلول قياسي بتركيز5000 هكذا لباقي التراكيز(2500,1250,625,312,156,78,0 pg/ml)٠

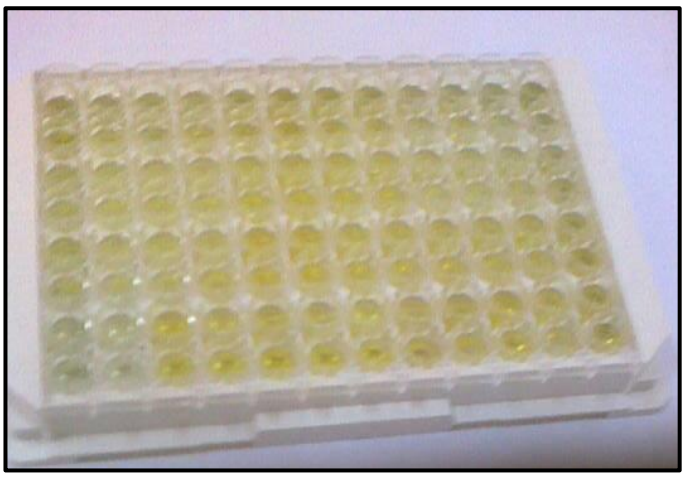


1 2 3 4 5 6 7 8 9

10000 5000 2500 1250 625 312 156 78 0

شكل رقم (12-2):تحضير المحلول القياسي لقياس انزيم MPO

3- محلول Detection Reagent A&Detection Reagent B ويحضر بنسبة تخفيف (1:100) بإضافة 100 µLمن محلول Concentrated Detection Reagent إلى 9.900µL من الماء المقطر٠



شكل رقم (13-2):صفيحة ELISA أنزيم MPO

2.10.3 طريقة العمل (procedure)

1- إضافة 100µL من المحلول القياسي أو النموذج إلى كل حفرة في الصفيحة والحضن لمدة 2ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

2- إزالة السائل من الصفيحة وإضافة 100µL من Detection Reagent A إلى كل حفرة في الصفيحة وحضن الصفيحة لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

3- إزالة السوائل وغسل الصفيحة 3مرات بمحلول الغسيل٠

4- *إضافة* 100µL من Detection Reagent B إلى كل حفرة في الصفيحة٠وحضنت الصفيحة

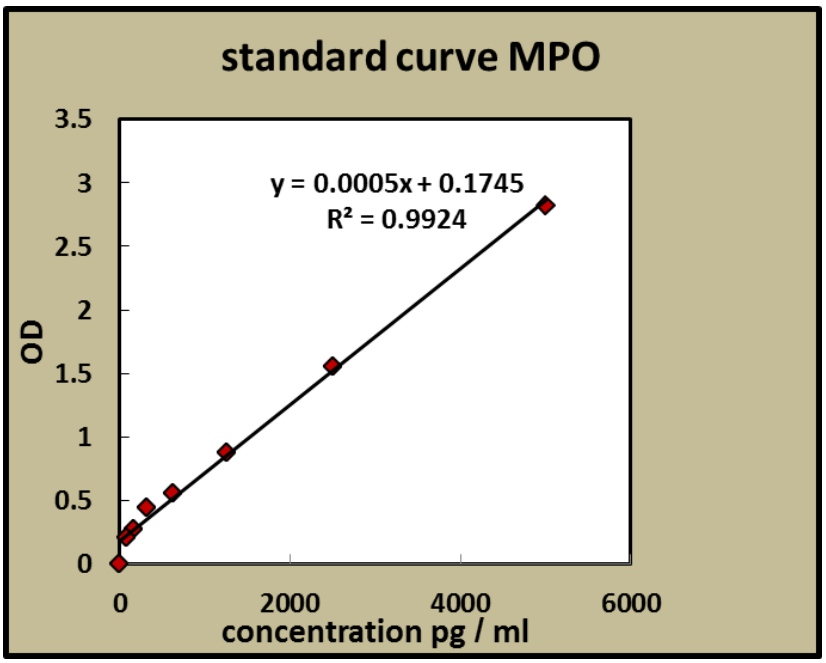
لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية

5- إزالة السوائل من الصفيحة وغسلها 5 مرات

6- إضافة 90 µL من محلول المادة الأساس(TMB) وحضن الصفيحة لمدة 25-15 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية٠

7 - إضافة 50 µL من محلول حامض الكبريتيك(Stop solution) لأنهاء التفاعل وقراءة التغير(من الأزرق إلى الأصفر) بطول موجي 450 nm بجهاز ELISA٠

8- حساب النتائج٠



شكل رقم (14-2):المنحى القياسي لأنزيم MPO

2.11 حساب النتائج (calculation of results)

تم حساب متوسط القراءات لكل من العينة والمحلول القياسي.وتم إنشاء منحي قياسي بأخذ متوسط قيمة OD للمحلول القياسي على المحور yمقابل التركيز على المحور x وتم رسم أفضل منحنٍ يمر بمعظم النقاط على الرسم البياني ،وقد تم استخدام برنامج Professional Microsoft Excel لعمل الحسابات،وسيتم حساب أفضل معادلة مناسبة في المنحني القياسي باستخدام قيم OD وتراكيز العينات ،إذ يقوم البرنامج بحساب تركيز العينات بعد إدخال قيم OD للعينات في معادلة المنحني القياسي.

2.12عزل خلايا الوحيدة النواة من الدم المحيطي peripheral blood mononuclear cell

2.12.1 مبدأ ا لاختبا ر(Test principle)

تستند هذه الطريقة على عزل الخلايا وحيدة النواة (كريات الدم البيض) القليلة الكثافة باستخدام تقنية الطرد المركزي لمدة 25 دقيقة بسرعة 3000 rpm،التي تؤدي إلى تكوين عدة طبقات السائل العلوي(البلازما)في أعلى الأنبوبة وخلايا الدم البيض في وسط الأنبوبة وخلايا الدم الحمر والحبيبية تتكون

في الجزء الأسفل من الأنبوبة بعدها يتم إضافة صبغة mitospy green إلى خلايا الدم البيض وتصوير الخلايا بجهاز fluorescence microscope.[144,146]

2.12.2طريقة العمل(procedure)

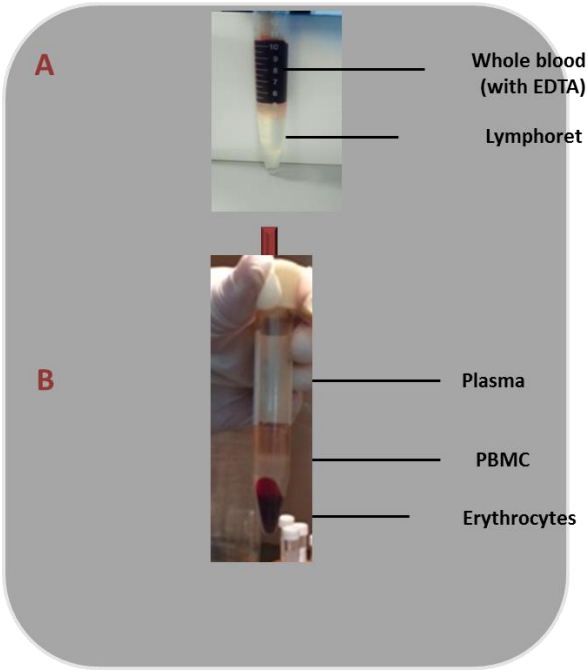
1- إضافة 3 ml من مادة الفصل (lymphret) ثم 3 ml من الدم الكلي(بعد تخفيفه مع PBS 1:1) في أنبوبة اختبار حجم 15 ml.

2- يتم وضع الأُنبوبة في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge)بسرعة (3000 rpm) لمدة 25 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.

3- يتم عزل البلازما(السائل العلوي) من الأنبوبة ،بعدها عزل الخلايا(كريات الدم البيض) ونقلها إلى أنبوبة اختبار نظيفة أخرى.

4- تم إضافة 5 ml من محلول الغسيل PBS(Phosphate Buffer Saline) إلى الأنبوبة وتم وضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي(400-500 x g)بسرعة لمدة 10 دقائق ،ومن ثم إزالة السائل العلوي(الراشح) والاحتفاظ بالراسب (الخلايا).

5- تكرر الخطوة 4 من 3-2مرات لغرض تنقية الخلايا.



شكل (2.15) عزل خلايا PBMC من الدم

2.13 قياس فعالية المايتوكوندريا في الخلايا المناعية

1-تم تحضير صبغة Mitospy green™ بإذابة lyophilized في ثنائي مثيل سلفوكسيد(DMSO) حتى يصبح التركيز النهائي 1mMبوساطة اضافة 74µlمن DMSO إلى كل Vial واحد من الصبغة٠

2-تم خزن الصبغة بدرجة حرارة -20 درجة مئوية٠

3-يتم إضافة صبغة Mitospy green إلى الخلايا الحية في PBS وبتركيز 50-250 nM٠ وضعها بالحاضنة بدرجة حرارة 37درجة مئوية لمدة 30-20دقيقة٠

4- تغسل الخلايا مرتين بمحلول PBSx1٠

5-تم إضافة 2-4%من محلول PFA(Paraformalehye) لتثبيت الخلايا لمدة15-10 دقيقة ومن ثم غسل الخلايا مرتين بمحلول .PBS٠

6-تم تصوير الخلايا بوساطة المجهر,(Fluorescence microscope, Leica, USA) .

2.14 قياس التعبير الجيني Bcl-2 بوساطة تقنية PCR

جدول رقم (6-2):محتويات العدة (Kit contents)

المحاليل	الكمية
RL Buffer	120 ml
FARB Buffer	25 ml
Wash Buffer 1	30 ml
Wash Buffer 2 (مركز)	15 ml
RNase-free water	6 ml
انابيب ترشيح (filter column)	50 انبوبة
FARB Mini columnانابيب صغيرة	50 انبوبة
انابيب تجميع (collection tube)	100 انبوبة
انابيب شطف (Elution tube)	50 انبوبة
دليل المستخدم (User manual)	1

2.14.1 استخلاص RNA من خلايا PBMC

مبدأ الاختبار (test principle)

يتم في هذه الطريقة استخلاص الحامض النووي الريبي RNAمن الدم الكلي ، ومن ثم غسل RNA بالإيثانول المحتوي على محلول غسيل ،ثم تنقية RNA بوساطة RNase –free water [145]

2.14.2 طريقة العمل(Procedure)

1 - إضافة 1500 µLمن محلول Lysis buffer(LB)الى 300 µLمن الدم في أنبوبة تحتوي على EDTA بوصفة مضاداً للتخثر ٠

2- تم حضن الأنبوبة على الثلج لمدة دقيقة واحدة ومزج الأنبوبة مرتين خلال عملية الحضن٠

3- توضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي(Centrifuge) لمدة دقيقة واحدة بسرعة 4500 rpm لحين تحولها إلى راسب ابيض ثم إزالة السائل العلوي تماماً٠

4-حفظ الأنبوبة بدرجة حرارة -35 درجة مئوية٠

5- إضافة 600µL من محلول RL Buffer إلى خلية الكرية ومن ثم مزج الأنبوبة٠

6- توضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي(Centrifuge) لمدة دقيقة واحدة بسرعة 4500 rpm لحين تحولها الى خلية الكرية مرة اخرى وإزالة السائل العلوي تماماً٠

7-تم إضافة 350µl من FARB Buffer(β-mercaptoethanol) إلى خلية الكرية ومزج الأنبوبة بجهاز vortex٠ثم حضن الأنبوبة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ٠

8- نقل مزيج العينة إلى أنبوبة ترشيح(filter column) ووضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة (12000 rpm or 10000 g) لمدة دقيقتين٠

9-تم نقل السائل العلوي الرائق من أنبوبة الجمع إلى أنبوبة أخرى دقيقة (microcentrifuge)٠

10- إضافة حجم واحد من الايثانول(70%) إلى الأنبوبة ثم مزج الأنبوبة بجهاز vortex٠

11-نقل محتويات الأنبوبة إلى أنبوبة عمود صغير(mini column set) ووضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة (12000 rpm or 10000 g) لمدة دقيقة وإزالة السائل العلوي٠

12- إضافة 500µL من محلول الغسيل(Wash Buffer 1 إلى الأنبوبة ،ثم وضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة (12000 rpm or 10000 g) لمدة دقيقة وإزالة السائل العلوي٠

13- تغسل الأنبوبة مرتين بإضافة 700µLمن محلول الغسيل (Wash Buffer 2) إلى الأنبوبة ،ثم وضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة (12000 rpm or 10000 g) لمدة دقيقة وإزالة السائل العلوي٠

14- توضع الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة (12000 rpm or 10000 g) لمدة 3دقائق إضافية حتى يجف العمود٠

15- إضافة 50 µL من (RNase-free Water) إلى الأنبوبة ووضعها بجهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة (12000 rpm or 100 00 g) لمدة دقيقتين واستخلاص RNA٠

16 -خزن أنبوبة RNA بدرجة – 70درجة مئوية٠

2.14.3تحويل RNA الى cDNA

جدول رقم (7-2):محتويات العدة (Kit contents)

المحتويات(contents)	الكمية(amount)
محلول التفاعل(2*RTreaction solution)	0.5 ml*1 vial
Enzyme mix solution	50µL*1 vial
DNase RNase free water	1ml*1 vial
كتيب التعليمات(instruction manual)	العدد 1

2.14.3.1 طريقة العمل (Procedure)

1- تحضير عدد مناسب من أنابيب PCR٠

2- إضافة µL 10من محلول التفاعل(RT Reaction solution)و µL1من محلول Enzyme mix solution إلى أنابيبPCR ٠

3- إضافة µL5-1من قالب RNA إلى أعلى الأنابيب٠

4–إضافة DNase RNase free water(µL8-4) إلى الأنابيب،ليصبح الحجم الكلي µL20٠

5–مزج الخليط جيدا بوساطة جهاز الطرد المركزي٠

6-تشكيل نماذج RT٠

7- خزن cDNA المتكون بدرجة حرارة -20درجة مئوية أو استخدامه بصورة مباشرة للتحليل بجهاز PCR٠

2.14.4 تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي (Polymerase Chain Reaction. PCR)

2.14.4.1 مبدأ الاختبار (test principle)

PCR هي تقنية تستخدم في الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية من خلال توليد ملايين النسخ من الحامض النووي DNAخارج النظام الحيوي، وهناك ثلاث خطوات رئيسة من تفاعل البلمرة المتسلسل تحدث عند درجات حرارية مختلفة التي تتكرر لمدة 30او 45 دورة٠أولا خطوة التفكيك(Denaturation) للحامض النووي التي تحدث بدرجة حرارية 95 درجة مئوية ،الخطوة الثانية هي الالتصاق (annealing) للبرايمر مع الحامض النووي الأصل وتحدث بدرجة حرارة متوسطة حوالى 60-55 درجة مئوية ،الخطوة الثالثة هي الامتداد(extension) وتحدث بدرجة حرارة 75 درجة مئوية لبناء حامض نووي جديد بمساعدة انزيم DNA Polymerase[110]٠

2.14.4.2 طريقة العمل (Procedure)

1-تم إضافة المحاليل التالية إلى sybr green ومزج الأنبوبة٠

2- ختم لاصقة الفيلم البصرية في الوقت الحقيقي لPCRعلى الأنبوب أو اللوحة٠

3- مزج الأنابيب تماما بجهاز Vortexلإعادة تعليق الكريات٠

4-تم وضع الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 rpmلمدة دقيقتين٠

5-بدء الوقت الحقيقي بجهاز PCR وتحميلة٠

6- ضبط جهاز PCR وبرمجته٠

7-بعد اكتمال التفاعل تم تحليل البيانات٠

جدول رقم (2-8):طريقة العمل PCR

	20µL R*N	50µL R*N
PCR F-Primer(10 pmole)	1-2 µL	1-2 µL
PCR R-Primer(10 pmole)	1-2 µL	1-2 µL
Templateقالب	5-10 µL	5-10 µL
DEPC-distilled water	Adjust to 20 µL	Adjust to 50 µL

2.14.4.3 تصميم البرايمرت (Primer design)

البرايمرات صممت باستخدام التسلسل الجيني ل mRNA والذي تم الحصول علية من NCBI (National Centre for Biotechnology Information) *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)*.

وكما هو موضح في الجدول رقم(2-9)٠

جدول رقم (2-9):اسم وتسلسل البرايمرات

اسم البرايمر	تسلسل القواعد النيتروجينية
Bcl-2F	TGGATGACTTGAGTACCTGAAC
Bcl-2R	ACAGCCAGGAGAAATCAAAC
B-actin F	GCGCGGCTACAGCTTCACCA
B-actin R	TGGCCGTCAGGCAGCTCGTA

2.15التحاليل الاحصائية (Statistical Analysis)

تم التعبير عن البيانات بوساطة المتوسط التركيز ± نسبة الخطأ (mean± S.E) الفرق المعنوي بين مجموعتي المرضى والاصحاء قد تم تعيينه بوساطة Student's T-Test باستخدام برنامج SSPS ،وقيمة ,($P<0.05$) قد اعتبرت ذات اهمية معنوية.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

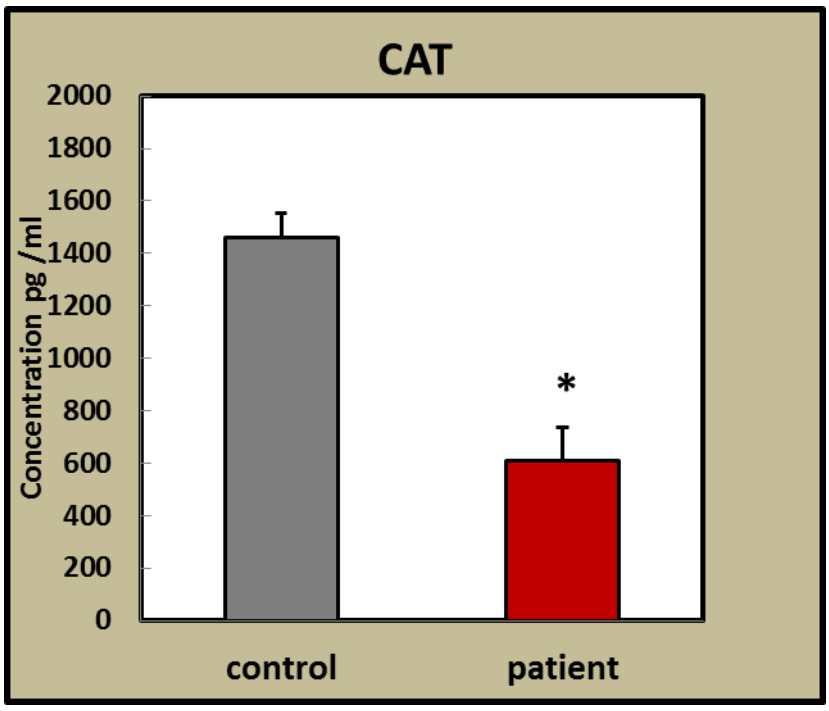
Results and discussion

3.النتائج والمناقشة

3.1 مستويات الانزيمات المضادة للأكسدة في مرضى قدم السكري

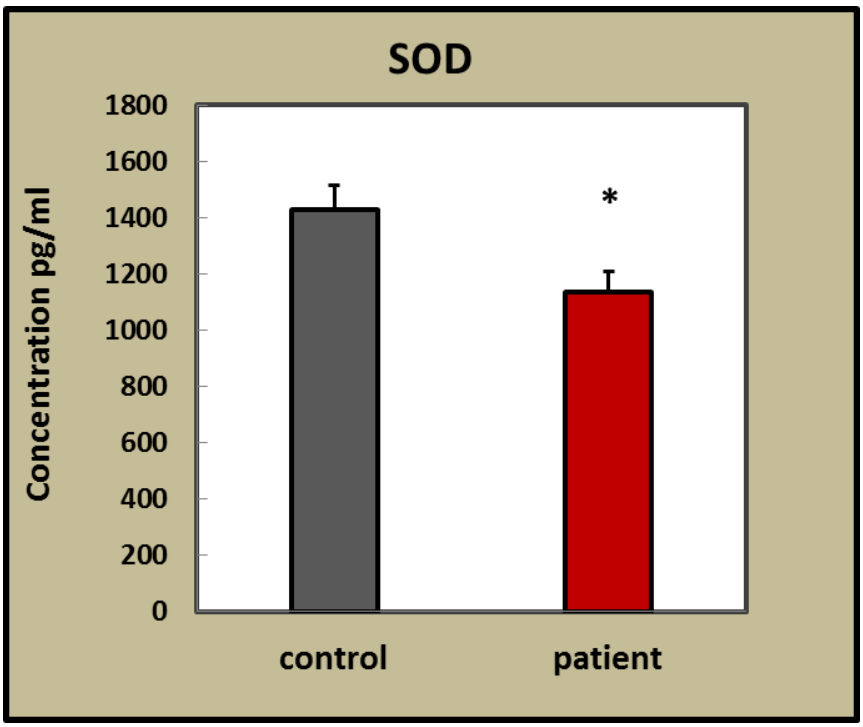
Levels of antioxidant enzymes in diabetic foot ulcers

أظهرت النتائج انخفاض مستوى انزيمات المضادة للأكسدة SODوCAT في مجموعة مرضى القدم السكري بالمقارنة مع مجموعة السيطرة(مجموعة الاصحاء)، هذه النتائج مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها من الدراسات السابقة[150,151,147,99] ،وهذا الانخفاض يعزى إلى أن ارتفاع معدل السكر في الدم يؤدي إلى إضعاف دفاعات الأكسدة ويصبح الجسم عرضة للأمراض بسبب الجذور الحرة ،إذ إن الإجهاد التأكسدي يؤدي دورا محوريا في التسبب بمرض السكري،ارتفاع مستوى السكر في الدم يحفز إنتاج الجذور الحرة ،ويضعف النظام المضاد للأكسدة ،ويصبح الجسم غير قادر على مواجهة مركبات الأوكسجين الفعالة(ROS)ومن ثم زيادة مقاومة الأنسولين من الأنسجة[148]،وارتفاع مستوى السكر في الدم يسبب تلف الأنسجة من خلال ميكانيكيات متعددة مثل زيادة تدفق سكر الكلوكوز وسكريات أخرى من خلال مسار Polyol،زيادة تكوين المنتجات النهائية المتقدمة ل glycation (AGEs)،تفعيل protein kinase C وزيادة تدفق مسار hexosamine[138]،إذ إن (AGEs) يؤدي دورا في اعتلال الأعصاب وضعف التئام الجروح التي تؤدي إلى تطور تقرحات القدم وتلف الانسجة ،وان ارتفاع السكر في الدم يؤدي إلى ضعف التئام الجروح لدى مرضى السكري ،وهناك كمية معينة من الإجهاد التأكسدي ضرورية لعمليات الايض الطبيعية في الجسم ،إذ إن ROS ينتج من الخلايا المناعية العدلات (neutrophils) والخلايا الضامة (macrophages) خلال عملية التنفس من أجل القضاء على المستضدات.



شكل رقم(1-3):تركيز انزيم CAT لدى مرضى قدم السكري ٠ عينات البلازما قد عزلت من دم كل من مجموعتي المرضى والاصحاء ٠مستوى CAT قد تم قياسه بوساطة تقنية ELISA ٠النتائج تم التعبير عنها mean±SEM

(n=30) ٠ *تشير إلى الأهمية المعنوية بالمقارنة مع الأصحاء ٠($P < 0.05$ .Student s t-test) ٠



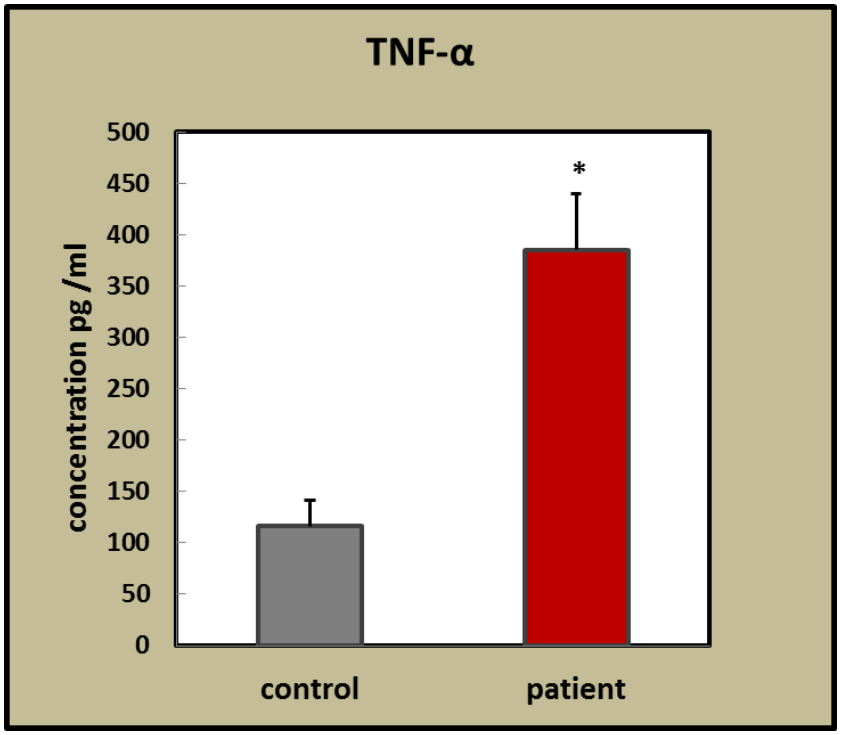
شكل رقم(2-3):مستوى انزيم SOD لدى مرضى قدم السكري٠عينات البلازما قد عزلت من دم كل من مجموعتي المرضى ولأصحاء٠مستوى SOD قد تم قياسه بوساطة تقنية ELISA٠النتائج تم التعبير عنها mean±SEM القياسي(n=30)٠* تشير الى الأهمية المعنوية بالمقارنة مع الأصحاء٠($P < 0.05$ .Student s t-test)

3.2مستوى السايتوكينات المسببة للالتهاب في مرضى قدم السكري

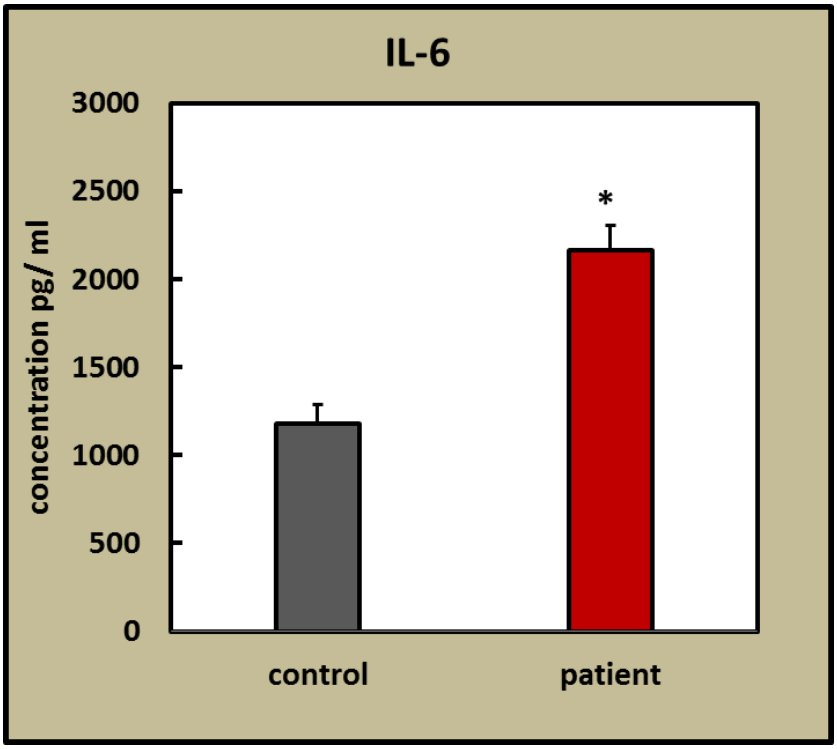
Levels of proinflammatory cytokines in diabetic foot ulcers

أظهرت النتائج ارتفاعاً في مستوى عامل نخر الورم(TNF-α) وIL-6 في مجموعة مرضى القدم السكري بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء٠هذه النتائج مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها من الدراسات السابقة [132,152,153,133,]، ومنها الدراسة التي قام بها استاذ علم الأمراض Gregory freund والتي أظهرت أن الخلايا وحيدة النواة (monocytes) في مرض السكري تعطي ضعفاً في إشارات (IL-4) والذي له دور مهم في الاستجابة المناعية ،إذ انه يوجه الضامة نحو إنتاج السايتوكينات المضادة للالتهابات ويمنع إفراز السايتوكينات الموالية للالتهابات ،وهذا الارتفاع يعزى إلى أن مستويات السكر المرتفعة تحفز الضامة على إنتاج السايتوكينات مثل IL-6,TNF-α التي تعزز التئام الجروح[133]، من خلال تحفيز الخلايا الليفية على تنظيم الدفاعات المضادة للميكروبات ،وكذلك تكون المستويات مرتفعة من خلال زيادة الأكسدة التي تعزز الالتهابات وزيادة مقاومة الانسولين [123]،إذ إن الالتهاب المزمن يؤدي دورا مهماً في تطور مرض السكري من النوع الثاني ،إذ يلاحظ ارتفاع السايتوكينات (IL-6,TNF-α) في بلازما مرضى القدم السكري التي تعزز إنتاج السوبر أوكسيد الذي يزيد من مستوى موت الخلايا المبرمج ٠و السايتوكينات بروتينات سكرية صغيرة تفرز من خلايا لها تأثير خاص في التفاعلات والاتصالات بين الخلايا ،إذ يتم

إنتاج السايتوكينات الالتهابية في الغالب عن طريق تفعيل الضامة (macrophages) في اث ناء عمليات الالتهاب والعدوى وارتفاع السكر في الدم ينشط جهاز المناعة ويزيد من افراز السايتوكينات التي تعزز من مقاومة الانسولين ومرض السكري النوع الثاني ،إذ إن تعرض الخلايا لعامل نخر الورم (TNF-α) أو مستويات مرتفعة من الأحماض الدهنية الحرة يحفز الفسفرة المثبطة لمخلفات السيرين (Serine) ومن ثم يمنع عمل الانسولين وزيادة ايض الكلوكوز يؤدي إلى إنتاج المايتوكوندريا لمركبات الأوكسجين الفعالة (ROS) والذي يسبب تنشيط مسارات الالتهاب ٠



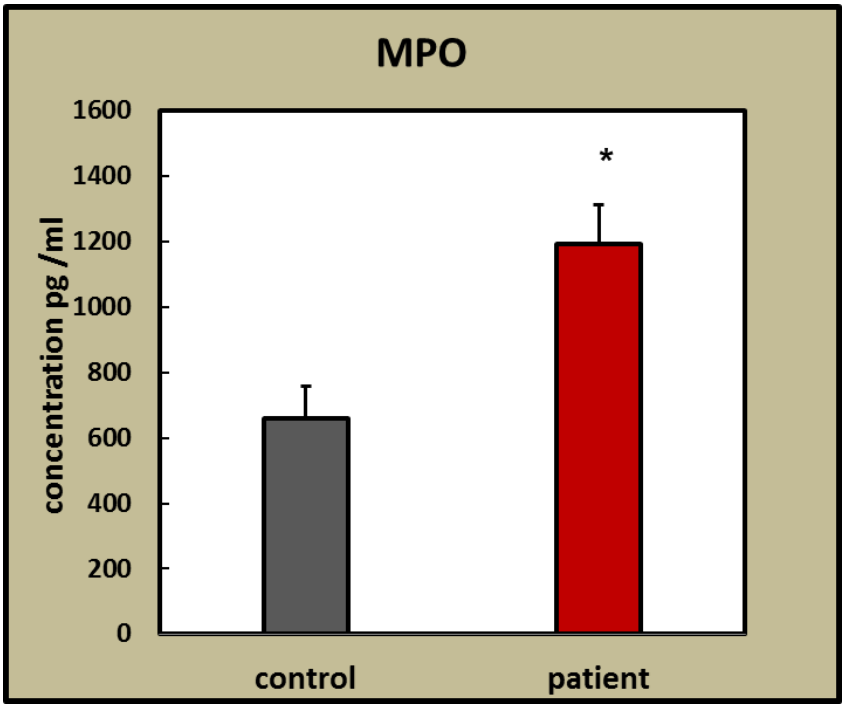
شكل رقم(3-3):مستوى TNF-α لدى مرضى قدم السكري ٠عينات البلازما قد عزلت من دم كل من مجموعتي المرضى والأصحاء٠مستوى TNF-α قد تم قياسه بوساطة تقنية ELISA٠ النتائج تم التعبير عنها mean±SEM (n=30)٠*تشير إلى الأهمية المعنوية بالمقارنة مع الأصحاء٠(Student s t-test. $P < 0.05$)٠



شكل رقم(4-3):مستوى IL-6 لدى مرضى قدم السكري٠عينات البلازما قد عزلت من دم كل من مجموعتي المرضى والأصحاء٠مستوى TNF-α قد تم قياسه بوساطة تقنية ELISA٠النتائج تم التعبير عنها mean±SEM (n=30)٠*تشير إلى الأهمية المعنوية بالمقارنة مع الأصحاء٠(Student s t-test. $P < 0.05$)٠

3.3 مستويات انزيم MPO (Levels of MPO)

أظهرت النتائج ارتفاعاً في مستوى انزيم MPO في مجموعة مرضى القدم السكري بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء٠هذه النتائج مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها من الدراسات السابقة[154,155,157] ٠ومنها الدراسة التي قام بها Zhang وآخرون والتي أُثبت فيها زيادة فعالية انزيمMPO في مرضى السكري، وهذا الارتفاع يعزى إلى أن مستويات السكر المرتفعة تؤدي إلى تفعيل خلايا العدلات (نوع من خلايا الدم البيض) والضامة (macrophages) لإفراز انزيم MPO الذي يعمل في المساعدة على قتل الجراثيم والبكتريا ،ويعمل على تحفيز تحويل بيروكسيد الهيدروجين وايونات الكلور إلى حامض Hypochlorous acid الذي هوأكثر فعالية بمقدار 50مرة من بيروكسيد الهيدروجين في قتل الجراثيم في حالات الالتهابات٠أنزيم MPOهو من الانزيمات الموالية للأكسدة يتم تحريره من الخلايا البيض، ولاسيما الضامة في مواقع الالتهابات بوصفة جزءا من دفاع المضيف الفطرية ،إذ يعمل انزيم MPO على توليد الجذور الحرة ومركبات الأوكسجين الفعالة(ROS)ومع ذلك فإنّ النشاط المضاد للميكروبات يمكن أن يؤدي إلى الضرر التأكسدي وتلف الأنسجة [155]٠

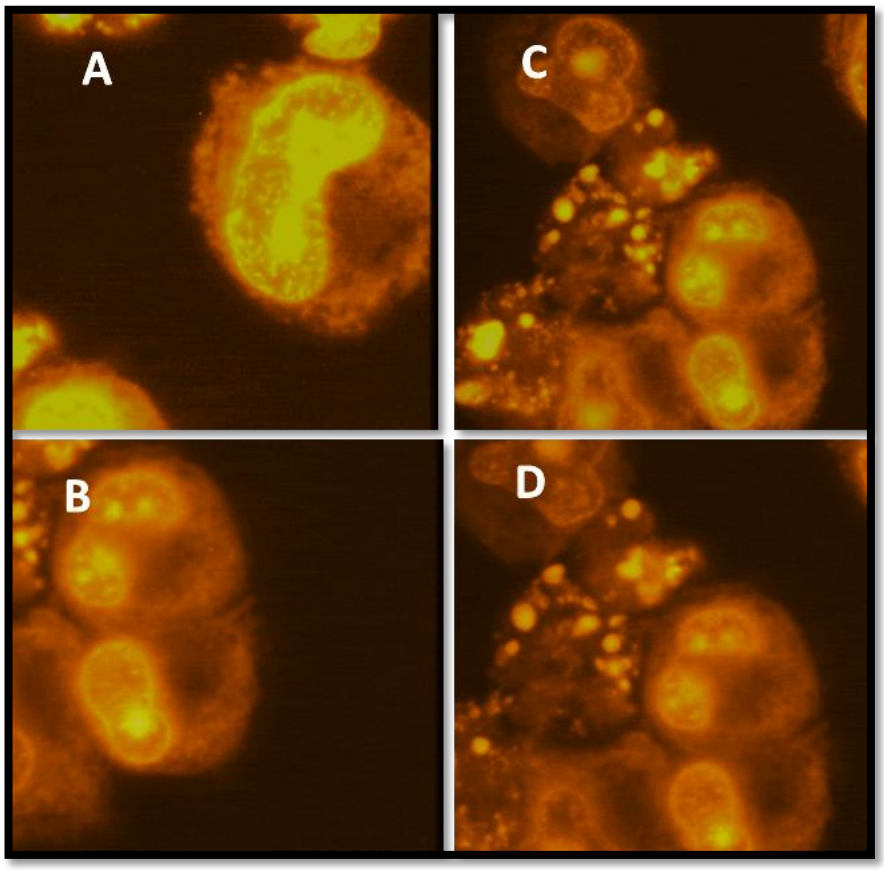


شكل رقم (3-5):مستوى انزيم MPO لدى مرضى قدم السكري٠عينات البلازما قد عزلت من دم كل من مجموعتي المرضى والأصحاء٠مستوى انزيم MPO قد تم قياسه بوساطة تقنية ELISA٠النتائج تم التعبير عنها mean±SEM (n=30)٠*تشير إلى الأهمية المعنوية بالمقارنة مع الأصحاء٠($P < 0.05$ .Student s t-test)٠

3.4 فعالية المايتوكوندريا Mitochondrial Function

قد استخدمت في هذه الدراسة صبغة MitoTracker الحمراء لدراسة فعالية المايتوكوندريا ،وأظهرت النتائج خللاً في وظيفة المايتوكوندريا في مجموعة مرضى القدم السكري بالمقارنة مع مجموعة الأصحاء ،إذ كانت الميتوكوندريا مجزئة أو مشرذمة إلى أجسام مستديرة ،نتيجة لتحطم DNAالميتوكوندريا والموت المبرمج للخلايا apoptosis(خلايا PBMC) لدى مرضى القدم السكري شكل (3-6 A)بالمقارنة مع الميتوكوندريا لدى الأصحاء ،إذ تكون مستديرة موصولة شكل (3-6 B)هذه النتائج افترضت أن زيادة إنتاج ROS لدى مرضى القدم السكري مما أدى إلى إجهاد تأكسدي ،وتحطم DNAالمايتوكوندريا ،وتجزؤها وفقدان في المحصلة النهائية لعملها مشيرا إلى ضعف المايتوكوندريا ٠هذه النتائج مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها من الدراسات السابقة [80,87] ٠وهذا يعزى إلى أن المايتوكوندريا في مرض السكري النوع الثاني تتعرض إلى إرتفاع نسبة سكر الكلوكوز وتركيز الأحماض الدهنية ،فتقوم بإنتاج المزيد من مركبات الأوكسجين الفعالة(ROS) الذي يعد واحداً من العوامل المؤدية إلى مقاومة الأنسولين[81]٠وتضاؤل قدرة الخلايا أو الأنسجة في الاستجابة لفعل

الأنسولين٠المواقع الرئيسة لمقاومة الأنسولين من الأنسجة المستهدفة هي الكبد،والعضلات،والهيكل العظمي، والانسجة الدهنية ،إذ إن الالية المحتملة التي تفسر ضعف وظيفة المايتوكوندريا والتي تسهم في مقاومة الأنسولين تحدث بسبب التغيرات في التمثيل الغذائي للأحماض الدهنية غير المشبعة وزيادة دهون الأنسجة تؤدي إلى تراكم Fatty acyl co enzyme A(COA),Diacylglycerol(DG),Ceramide،ومنتجات الأكسدة غير المكتملة التي تسبب عمليا نقص إشارات الأنسولين وعملها٠هناك اليات أخرى تربط بين ضعف وظيفة الأكسدة للمايتوكوندريا ومقاومة الأنسولين،وتضاءل تركيب ATPيكون غير كافٍ للقيام بالوظائف التي تتطلب طاقة ،مثل تحفيز امتصاص الكلوكوز ومن ثم فانّ الأنسولين لا يمكنه أن يؤدي وظائف عملة ،وكذلك يصبح حجم المايتوكوندريا أصغر وأعلى كثافة في العضلات الهيكلية[83]٠لمرضى القدم السكري مقارنة مع الأصحاء٠هذه المتغيرات المورفولوجيا في شكل المايتوكوندريا قد تعزز من مقاومة الأنسولين في الكبد والعضلات والهيكل العظمي وبطانة الأوعية الدموية ،مما يؤدي إلى الإصابة بمرض السكري وتثبيط إشارات الأنسولين٠

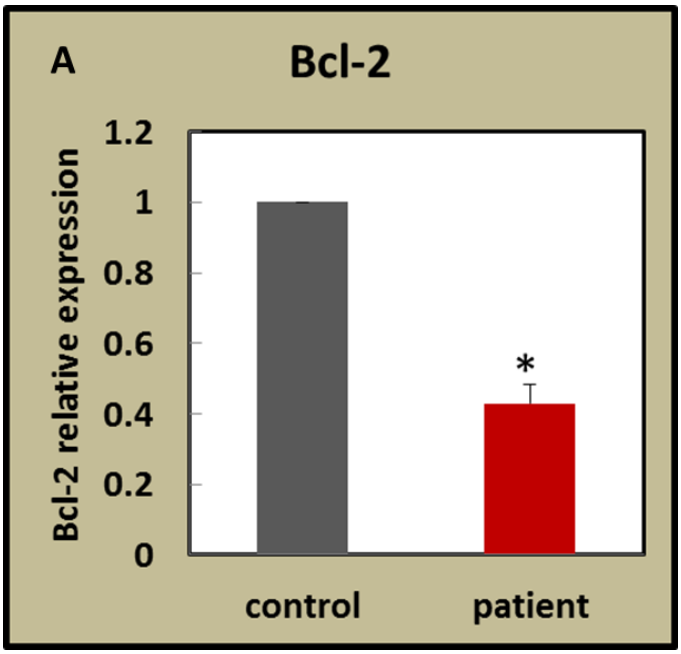


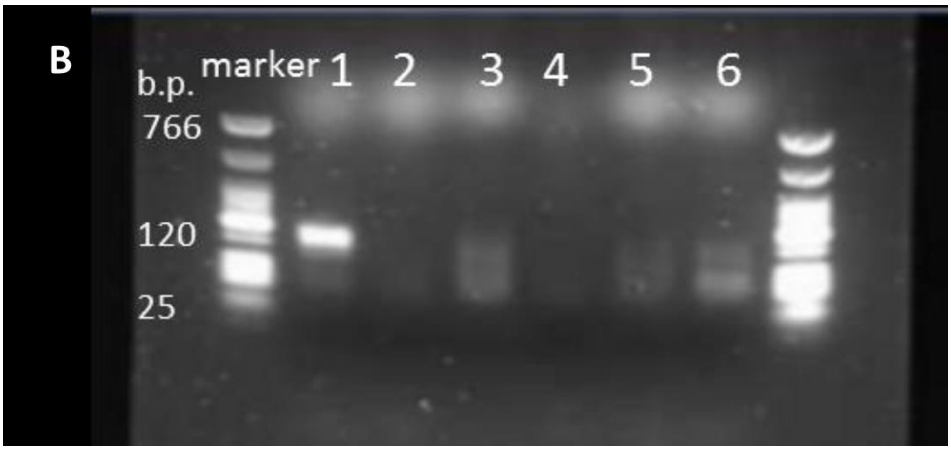
شكل رقم (6-3شكل رقم (7-3):فعاليةالميتوكوندريا باستخدام Mitospy green™ في خلايا PBMC لدى مرضى قدم السكري٠خلايا PBMC قد عزلت من دم كل من مجموعتي المرضى والاصحاء٠cDNA تم تصبيغها بصبغة Mitospy ٠ ومن ثم استخدام Flurscence microscop (A) صور المايتوكوندريا في خلايا PBMC في مجموعة السيطرة بينما D,C.B في مجموعة المرضى DFU

3.5التعبير الجيني ل BCL-2 (BCL-2 gene expression)

أظهرت النتائج انخفاض مستوى BCL-2 في مجموعة مرضى القدم السكري بالمقارنة مع مجموعة الأصحاء شكل (7-3)٠هذه النتائج مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها من الدراسات السابقة[137,134]٠ وهذا يعزى إلى أن فرط سكر الدم لمدة طويلة يستحث موت الخلايا المبرمج في الخلايا البطانية لقروح مرضى السكري ،وإنتاج كميات كبيرة من lactate،إذ إن BCL-2 يعمل على تعزيز بقاء الخلية عن طريق قمع موت الخلايا المبرمج الناتج من المؤثرات التي تتعرض لها الخلايا مثل الاشعاع والعلاج الكيمياوي[90٠]، ويؤثر في وظيفة المايتوكوندريا وإفراز الأنسولين ،إذ يعمل على حماية خلايا بيتا في البنكرياس من الاجهاد التأكسدي الذي يسببه بيروكسيد الهيدروجين والذي يسبب تلف الخلايا ،ومن ثم

يمنع موت الخلايا ،ومنع استجابة خلايا بيتا إلى ارتفاع سكر الكلوكوز وانخفاضه يؤثر في وظيفة خلية بيتا وإفراز الأنسولين ٠





شكل رقم (3-7):مستوى التعبير الجيني ل Bcl-2 في خلايا PBMC لدى مرضى قدم السكري(A)٠خلايا PBMC قد عزلت من دم كل من مجموعتي المرضى والأصحاء٠cDNA تم تخليقه من RNA بعد استخلاصه ٠qPCR قد استخدم لقياس مستوى التعبير الجيني Bcl-2٠النتائج تم التعبير عنها mean±SEM (n=30)٠*تشير إلى الأهمية المعنوية بالمقارنة مع الأصحاء٠(Student s t-test. $P < 0.05$)٠ (B) صور ناتج PCR في جل Agarose 1% رقم ١ يمثل مجموعة السيطرة بينما 2,3,4,5.6 مجموعة المرضى DFU٠

3.6 الاستنتاجات (conclusions)

1-المرضى الذين يعانون من مرض السكري (النوع الثاني) يكونون أكثر عرضة للإصابة بقرحة القدم السكري٠

2-الالتهاب المزمن يؤدي دورا مهماً في تطور مرض قدم السكري ،إذ إن زيادة مستوى السايتوكينات التي تعزز مقاومة الأنسولين في الكبد والعضلات والهيكل العظمي وبطانة الاوعية الدموية تؤدي إلى مضاعفات مرض السكري٠

3- إن الاكسدة لها دور مهم في تطور مضاعفات مرض قدم السكري ،إذ أظهرت النتائج انخفاض الدفاعات المضادة للأكسدة في المرضى الذين يعانون من قرحة القدم٠

4- إن الخلل في وظيفة المايتوكوندريا يؤدي ايضاً دوراً مهماً في تطور مضاعفات مرض القدم السكري٠

5- ارتفاع السكر في الدم لدى مرضى قدم السكري يترافق مع زيادة موت الخلايا وقلة إنتاج البروتين Bcl-2٠

6- زيادة فعالية انزيم MPO لدى مرضى القدم السكري يؤدي إلى الضرر التأكسدي وتلف الأنسجة٠

3.7التوصيات(Recommendations)

1-معالجة الالتهابات بسرعة في مرضى القدم السكري ،لاستعادة تدفق الدم الشرياني وزيادة فرصة انقاذ المريض من بتر القدم٠

2-السيطرة على مستوى السكر في الدم ،وذلك لتجنب مضاعفات داء السكري٠

3- عزل خلايا مناعية مثل الضامة أو العدلات الدم من مرضى القدم السكري وزراعتها ودراسة بعض المؤشرات الخلوية ذات العلاقة بالالتهاب٠

4-دراسة مؤشرات الموت المبرمج للخلايا لدى مرضى القدم السكري مثل انزيم Caspase,annexin V٠

5-إجراء دراسة جينية لبعض الجينات ذات العلاقة في تنظيم السايتوكينات لدى مرضى القدم السكري مثل NF-KB٠

6-دراسة مستويات السايتوكينات المضادة للالتهاب لدى مرضى القدم السكري مثل IL-10٠

المصادر

References

References

1-ALBERTI, G., ZIMMET, P., SHAW, J., BLOOMGARDEN, Z., KAUFMAN, F. & SILINK, M.(2004). Type 2 Diabetes in the Young: The Evolving Epidemic The International Diabetes Federation Consensus Workshop. Diabetes care, 27, 1798-1811.

2-Wild S,Roglic G,Green A and et al (2004) Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030.Diabetes Care,27,1047-1053.

3-Whiting D.R,Guariguata L,Weit C and et al(2011) IDF diabetes atlas:global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030.Diabetes Research and Clinical Practice ,94,311-321.

4-Shaw J,Sicree R and Zimmet P (2010) Global estimates of the diabetes for 2010 and 2030.Diabetes Research and Clinical Practice .87,4-14.

5-Jhon W(2012) Use of A_{1C} in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK.The implementation of Word Health Organization guidance,291,711.

6-M.Jaganjac,O.Tirosh,G.Coben and et al(2013)Reactive aldehydes-second messengers of free radicals in diabetes mellitus ,free Radical Research,vol.47,no.1,pp.39-48.

7-P.E English and G.Williams(2004)Hyperglycemic crises and lactic acidosis in diabetes mellitus ,Medical Journal,vol.80,no.943,pp.253-261.

8-G.U.Umpierrez,M.B.Murphy,and A.E.Kitabchi (2002)Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar syndrome ,Diaketes spectrum ,vol.15,no.1,pp.28-36.

9- Kitabachi A.E,Umpierres G.E,Murphy M.B and et al (2006) Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. Diabetes care,29,2739.

10-Skyler JS,Bakris G,Bonifacio E and et al(2016).Differention of diabetes by pathophysiology.natural history and progenosis diabetes(Epube ahead of print).Dol:10.2337/db 16-0806.

11-ALBERTI, K. G. M. M. & ZIMMET, P(1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine, 15, 539-553.

12- Williams Gand Pickup J.C (2004) Handbook of diabetes. Wiley Blackwell

13 –Park,C.H,Volore E.V and Waring,A.J(2001).Hepcidin aurinary antimicrobial peptide synthesized in the liver.Journal of Biological chemistry,276,7806-7810.

14- Brownlee M(2001).Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.*Nature* 414:813-820..

15-Nagaya T,Yashida H,Kawai M et al(2005) Increases in the body mass index within non obese level

16-Lea J.W,Drancati F and Yeh H (2011) Trends in the women of type 2 diabetes in Asians.Diabetes Care ,pp,34,353-357.

17- Ferrara A (2007) Increasing prevalent of gestational diabetes mellitus a public health perspective Diabetes care,30,S141-S146.

18-Casauuera E and Viteri F.E(2003).Iron on oxidative stress in pregnancy. The journal of nutrition,133,1700-1708.

19-Ryan J.C (2009) Cost and policy implications from the increasing prevalence of obesity and diabetes mellitus. Gender Medicine ,6,86-108.

20-A DA (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus.Diabetes Care:34(Suppl.1):511-561.

21-Wada T,Hari,S,Sugyama M and et al(2010)Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin sigualing.American journal of physiology-Endocrinology and Metabolism ,pp,298,E881-E888.

22-Patil S,Kodliwadmath M and Kodliwadmath ,S.M(2007).Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy.Indian Journal of Clinical Biochemistry ,22,135-137

23-Zhu,Z,Wang,X,Shen,Z,Lu,Y and et al(2013).Risk of bladder cancer patients with diabetes mellitus: an updated metaanalysis of 36 observational studies.BMC cancer,13,310

24-Gallego,P.H,Wiltshire,E and Donaghue,K.C(2007).Identifying children at particular risk of long-term diabetes complications. Pediatric diabetes,8,40-48.
25-Singer AJ and Clark RAF(1999)Cutaneous wound healing:738-746.

26-Blakytuy R and Jude E (2006).The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes,RevEspcarcial:60(9):594-608.

27- المجلة الدورية الطبية العربية،د٠جرجس عوض،المركز الطبي- بوسطن Arab medical magazine

28-Bowering CK (2001) Diabetic foot ulcers.phathophysioloy,assement and therapy,Can Fam Physican .,47:1007-1016.

29-Dyck PJ,Daries JL,Wilson DM and et al (1999).Risk factors for severity of diabetic poly neurophathy.Diabetic Care 22:1497-1486.

30-Zochondone DW(2008)Diabetic polyneurophathy,21:527-583.

31- Boultin A.J.M(2004)The diabetic foot from art to science,pp.1343-1353

32-Lavery LA, Armstrong PG,Wendel CS and et al(2006)Risk factors for foot infections in individual with diabetes. Diabetes 20:1288-1293.

33-Bansal and Bilaspuri(,2011) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions (review article.

34-Butterfiel et al(,1998).Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone and vitamin E.PP.448-462.

35--Giugliano et al(,1995).Diabetes mellitus,hypertension,and cardiovascular disease: which role for oxidative stress.Metabolism,44(3),pp.363-368.

36-Gutterige MC(1994),Hydroxyl radical,iron,O.S and neuron degeneration 738:201-213.

37-Avery ,S,(2001).Molecular targets of oxidative stress.Biochem.J,434,201-210.

38- P.Leung(2007).Diabetic foot ulcers –a comprehensive review,vol.5,no.4,pp.219-231.

39-Pouly N(2006):React oxygen and gluthathione,57(8):1769-76.

40-Guzik TJ et al (2012):nitric oxide modulates superoxide release and *peroxynitrat* formation in human blood vessel 39(6):1088-94.

41--Iorine NM.et al(2008).RNScontribute to innate host defense against infection and immunity ,76(3):986-93.

42-Brovnlee M(2004),The pathobiology of diabetic complicans:54.1615-1625.

43-segal.AW(2005):How neutrophils kit microbes"9(5):197-223

44-Nosratola,D and et al(2003)Oxidative stress and dysregulation of superoxide and NADPH oxidase in renal insufficiency,pp.179-185.

45-Weseler A.R and Bast A(2010)Oxidative stress and vascular function:implications for pharmacologic treatments,pp.145-161.

46-Widad Hamid Ali,Saad Al fallouji ,Ragaa Ali (2013).comparative study of oxidative stress in diabetes mellitus"Baghdad science Journal"Vol.10(1).

47-Anderson S and Breener B.M(1980)Pathogenesis of diabetic glormerulopathy:4,163-177.

48-Murata Y,Shimamura T and Hamuro J(2002)The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophage,14,201-212.

49-Szabo E,Riffe M.E ,Steinberg S.M and et al (1996)Altered Cajun expression 56,305-315.

50-Robert L.J and Morrow J.D(1995)The isoprostones:Novel markers of lipid peroxidation ,23,219-224.

51-Vinson J.A(2006)Oxidative stress in cataraci,pathophysiol,13,151-162.

52-Chalam KV,Khetpalr(2011)Role of UV radiation in age related macular degeneration ,37,225-232.

53-Komemia K,Roger BS and Campochiaro P.A(2007)Antioxidant slow photoreceptor cell death in mose,213,809-815.

54-Battisti V,Maders LD(2008)Measumat of oxidative stress in acute lymphoblastic leukemia patients,35.

55-Lipinski B(2001)Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus 15,203-210.

56-Bianchi G,Marchesini G and Fahbri A(1997)Lip peroxide plasma levels in patient with liver cirrhosis,44,784-788.

57-Maritim A.C,Sanders J.B and Watkins(2003)Diabetes, Oxidative stress and antioxidants: a review,pp.24-38.

58-Pouly N(2006):React oxygen and gluthathione,57(8):1769-76.

59-Baydaa Ahmmad Abed (2013) Relation of oxidant-Antioxidant status with Glycemic control in type 2 diabetic patients "National Diabetes Center Al-Mustansiria University"AJPS,Vol.14,No.2.

60--.Chelikani,I.Fita and P.C.Loewen,(2004)"Diversity of structures and properties among catalases "Cellular and Molecular life Sciences,vol.61,no.2,pp.192-208.

61-K.Takemoto,M.Tanaka,H.Iwata et al(2009),"Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan"Clinica Chimica Acta,vol.407,no.1-2,pp.43-46.

62--M.Tiedge,S.Lortz,R.Monday,and S.Lenzen(1998),"Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species"Diabetes,vol.47,no.10,pp.1578-1585

63--I.Hwang,J.Lee,J.Y.Hub et al(2012), "Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through paroxysmal dysfunction"Diabetes,vol.61,no.3,pp..728-738

64-I.Goth and N.W.Bigler(2007),"Catalase deficiency may complicate uprate oxidase(rasburicase)therapy", Free radical Research,vol.41,no.9,pp.953-955.

65-I.Goth,Z.Toth,I.Tarnai,M.Berces,P.Torok,and W.N Bigler(2005),"Blood catalase activity in gestational diabetes is decreased but not associated with pregnancy complications "Clinical chemistry,vol.51,no.12,pp.2401-2404.

66-F.M.Faraci and S.P.Didion(2004),"vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall,"Arteriosclerosis,Thrombosis,and Vascular Biology,vol.24,no 8,pp.1367-1373.

67--X.Wang,I.Tao,and C.X.Hai(2012),"Redox regulating role of insulin: the essence of insulin effect", Molecular and Cellular Endocrinology,vol.349,no.2,pp.111-127.

68--S.Davari,S.A.Talaei,H.Alaei,and M.Salami(2013),"Probiotics treatment improves diabetes –induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for Micro biome-gut-brain axis,"Neuroscience,vol.240,pp.287-296.

69-T.D.Oury,B.J.Day and J.D.Crapo(1996),"Extracellular superoxide dismutase a regulator of nitric oxide bioavailability, "laboratory Investigation,vol.75,no.5,pp.617-636.

70-I.N.Zelko,T.J.Mariani,and R,J.Folz(2002),superoxide dismutase multigene family a comparison of the CuZn-SOD1,Mn-SOD(SOD2),and EC-SOS(SOD3)gene structures,evolution,and expression, "FREE Radical Biology and Medicine,vol.33,no.3,pp.337-349.

71-H.Fujita,H.Fujishima,S.Chida et al(2009), "Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy,: Journal of the American Society of Nephrology,vol.20,no.6,pp.1303-1313.

72-C.Wang,S.Li,D.J.Shang,X.L.Wang,Z.L.You,and H.B.Li(2011),"Ant hyperglycemic and neuroprotective effects of one novel Cu-Zn SOD mimetic, "bioorganic and Medicinal chemistry letters,vol.21,no.14,pp.4320-4324.

73---A.N.Lucchesi,N.T.Freitas,I.L.Cassettari,S.F.Marques,and C.T Spadella(2013),"diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan –treated rats a mechanism for diabetic chronic liver disease ,"Acts Chirurgical Brasileira,vol.28,no.7,pp.502-508.

74-Henze Martin W William (2003) Evolutionary biology: essence of mitochondria .Nature.426(6963):127-8.

75-Wallace DC(2005) a mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases,aging,and cancer:aDawn for Evolutionary Medicine.Annu.Rev.Genet.39:359-407.

76--Wiesner RJ,Ruegg JC,Morano I(1992)Counting Target Molecules by Exponential polymerase chain Reaction: copy number of mitochondrial DNA in Rat Tissues Biochem.Biophys.Res.Commun.183:553-559.

77-- مدخل الى الكيمياء الحياتية(٢٠٠٠)دكتورة خولة احمد ال فليح الطبعة الثانية جامعة الموصل ٠صفحة ١٤

78-Turrens JF(2003)Mitochondrial formation of reactive oxygen species.J.Physiol.552:335-344.

79--Fridovich I(1997), Superoxide anion radical($O2^{\cdot-}$),Superoxide dismutase ,and related matters .J Biol Chem 272:18515-18517.

80-Chance B,Sies H,and Boveris A(1979).Hydro peroxide metabolism in mammalian organs.Physiol Rev 59:527-605.

81-Green K,Brand MD,and Murphy MP(2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. Diabetes 53:5110-5118.

82-Hoehn KL,Salmon AB,Hohnen Cet al(2009).Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:17787-17792.

83–Errol A (2007)Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress .Bioassay 29:811-818.

84-Molina AJ,Wikstrom JD,Stiles L and et al(2009)Mitochondrial networking protects of beta cell from nutrient-induced apoptosis .Diabetes,58,2303-15

85--Group UKPPS(1998)Intensive blood-glucose control with phonylureas or insulin compared with conventional and risk of complicate of patients with type 2 diabetes,352,837-853.

86-Gautier JE,Wilson C,Mott D and et al(2001)Low acute insulin secretory responses in adult offspring of people with early onset type 2 diabetes.Diabetes,50:1828-1833.

87-Gulli G,Ferrannini E,Stern M and et al (1992)The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose –tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents.Diabetes,41:1575-1586.

88--Kelley DE,He J,Menshikova EV,and Ritov VB(2002).Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes 51:2944-2950.

89-Talior I,Yarkoni M,Bashan N ,et al(2003).Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC-delta Activation in Adipocytes of obese, Insulin resistance mice.Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab .283:E295-E302.

90-Rosse T,Olivier R,Monney L and et al(1998)Bcl-2 prolongs cell survival after Bax –induced release of cytochrome C.Nature,391:486-9.

91-klebanoff S.J(2005).Myeloperoxidase :friend and foe.Jleukoc Biol:77:598-625.

92-Daugherty A,Duun JL,Rateri DL,Heineck JW(1994).Myloperoxidase,acatalyst for lipoprotein oxidation ,is expressed in human atherosclerotic lesions Clin Invest,pp.94:437-44.

93-Podrez EA,Schmitt D,Hoff HF,Hazen SL(1999).Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL in an atherogenic from in vitro,J Clin Invest 103:1547-60.

94- Elserich JP,Baldus S,Brennah ML,et al(2002).Myeloperoxidase a leukocyte-derived-vascular No oxidase. Science:296:2391-4.

95-Vita JA,Brennan ML,Gokce N et al(2004):serum myeloperoxidase level independently predict endothelial dysfunction in human. Circulation:110:1134-9.

96-Brandes RP,Flemming I,Busse R(2005).Endothial aging. Cardiovascular Res:66:286-94.

97-H.Fujita,H.Fujishima,S.Chida et al(2009), "Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy,: Journal of the American Society of Nephrology,vol.20,no.6,pp.1303-1313.

98--Baldus S,Heeschen C,Meinertz T et al(2003).MPO serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes.Circulation,108:1440-5.

99-Schindhelm RK,Alssema M,Diarmant M et al(2008).Comparison of two consecutive fat-rich and carbohydrate-rich meals on postprandial MPO response in women with and without type 2 diabetes mellitus.Metabolism,57:262-7.

100-Daugherty A,Duun JL,Rateri DL,Heineck JW(1994).Myloperoxidase,acatalyst for lipoprotein oxidation ,is expressed in human atherosclerotic lesions Clin Invest,pp.94:437-44.

101--Zhang R,Brennan ML,Fu X et al (2001).Association between MPO levels and risk of coronary artery disease.JAMA,286:2136-42..

102-Elserich JP,Baldus S,Brennah ML,et al(2002).Myeloperoxidase a leukocyte-derived-vascular No oxidase. Science :296:2391-4.

103-Adams J.M and Cory S(1998).The Bcl-2 protein family.arbiters of cell survival.*secience*,281:1322-1326.

104-Petors A.M,Oleiniczak E.T and Fesik S.W(2004).Structural biology of the Bcl-2 family of proteins,1644:83-94.

105- May Y Saour,Eman M Salah ,Zena T Mall-Allal(2011).serum levels cytokines (TNF-α,IFN-γ&IL-10) in type 2 diabetic patients with HCV infection"fax hed Baghdad,Vol 53,No 2.

106-. Dr.Najlaa Ali and Dr.Hawraa Ali(2015) .Evaluation of ADA,IL-6 and TNF-α level in type 2 diabetes mellitus :with and without hypoglycemic drug."Journal of Natural Sciences Research",Vol 5,No17.

107- Asmaa Mohammed Saud(2014) .Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukine-12 in Some Iraqi Diabetic Patients Type1 "Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 3(4): 260-268.

108- Ikhlas K. Hammed , Nada F.Rashid , Baydaa A. Abed (2012).Serum Interleukin-6 level in children with type 1 diabetes mellitus ,Vol 54,No.3

109-porth,carol(2007):Essentials of pathophysiology concepts of altered health states p.270

110-Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE(1990)Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro *Nucl Acids Res.*18(21):6409-6412

111- Heinecke JW,Francis GA,Goldstein JA(1993)Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. The Journal of Clinical Investigation.91(6):2866-72

112-Martine F,Sica A,Mantovari A and et al(2008).Macrophages activation and polarization,432-461.

113-Kolb WP, Granger(1968)Lymphocyte in vitro cyto toxicity characterization of human lymph toxin 61(4):1250-5.

114-Wawd PA,Leutsch AB(1999),The acute inflammatory response and its regulation 134(6):666-669.

115-Hermann N(2012) A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease 68(10):930-941.

116-Lenardo M.J(2001)The TNF and TNF receptor super families in to grating mammalian biology.104(4):487-501.

117-Fergnson-simth AC et al(1988)Regional localization of the interferon-beta cell stimulatory factor 2(3):203-8.

118-Kirstiansen OP,Mandrap-poulsen(2003).IL- and diabetes 114-24.

119-Dubinski A,Zdrojewicz Z(2007)The role of IL-6 in development and progression of atherosclerosis.

120-Nishimoto M(2005)IL-6 and new strategies for the treatment of cancer 9(4):737-52.

121-Boyle J(2005)Macrophage activation in atherosclerosis pathogenesis 3(1):63-8.

122-Feldman EL,Russel JW and Sullivan KA(1999)New in sight in to the pathogenesis of diabetic neuropathy ,5:553-563.

123-y.wen,J.Gu,R.Natarajan and J.L Nadler(2006)Elevated glucose and diabetes promote interlukin-12.vol.147.no,5,pp.2518-2525.

124-B.Ponugoti,G.Dong and D.T Grares(2012) Role of fork head transcription factors in diabetes-induced oxidative stress.Aricle 9397751,7 pages.

125-Ding,A.kantarci and et al (2007)Activation of RAGE induces elevated O_2 generation by mononuclear phagocytes in diabetes no.2,pp.520-527.

126-White ,MF(1997)The insulin signaling system and IRS protein.Diabetologia,40:S2-S17.

127-Saltiel ,AR,Pessin,JE(2000)Insulin signaling pathways in time and space .Trend Cell Biol,12:65-71.

128-yin MJ,Yamamoto,Y,Gaynor PK(1998)The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity ,396:77-80.

129-Aguirre,vetal(2002)Phosphorylate of Ser 307 in insulin receptor substrate -1 blocks interaction with the in receptor and inhibit action of insulin.Biol.Chem,277:1531-1537.

130-Ozawa K and et al(2005)The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type diabetes.Diabetes,45:657-663.

131-Furakawa S and et al(2004)Increased oxidative stress in obesity and the impact on metabolic syndrome,114,1752-1761.

132-Khanna S,Biswas S Shang Y and et al(2010)Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice,5(3)-9539.

133-Wamch BC,Yager DR ,Chonen IL(1998)Physiology of the chronic wound:25(3):341-356.

134- Galkowska H ,Olszewsk WL,Mijal J and et al(2003)Expression of apoptosis and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers,134:213-20

135-. Daugherty A,Duun JL,Rateri DL,Heineck JW. Myloperoxidase,acatalyst for lipoprotein oxidation ,is expressed in human atherosclerotic lesions Clin Invest 1994,pp.94:437-44.

136-klebanoff SJ,kettle AJ,RosenH,Winterboum CC and et al(2012)Myloperoxidase:a front-line defender against phagocytosis microorganisms,pp.7

137- Podrez EA ,Schmitt D,Hoff HF,Hazen SL .Myloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL in an atherogenic from in vitro,J Clin Invest 1999:103:1547-60

138-Hunter J.J,Bond B.L and Parslow T.G(1996)Functional dissection of the human Bcl-2 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis.Molecular and cellular Biology,16:877-883.

139- G.G.Korkmaz,D.Konukoglu,E.M and H.Uzun(2013).Total antioxidant status and markers of oxidative stress in subjects with normal or impaired glucose regulation in diabetes patients,vol.73,no.8,pp.641-649.

140--Zhang C,Yang J,Jennings LK(2004).Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose-induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose-stimulated,vascular non.leukocyte-derived reactive oxygen species.Diabetes,pp.53:2950-9.

141- Dobrovolskaia,E,Gam,A,and Slater,J.E(2006)Competition enzyme-linked immunosorbant assay(ELISA)can be a sensitive method for the specific detection of small quantities of allergen in a complex mixture ,*clinical &Experimental Allergy*,36(4),pp.525-530.

142-Yamawaki H,Hirohata S,Miyoshi T and et al(2009)Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes.pp.19:83-92.

143-Schmidt SD,Mazzella MJ,Nixon RA and et al(2012)measurement by enzyme-linked immunosorbent assay"Methods in MolecularBiology".849:507-27.

144-Arkin,S et al(1991).Expression of intracellular adhesion molecule-1(CD54)on hematopoietic progenitors.Blood,77,948

145-Burgmann H,Pesaro F,Widmer and et al(2001)A strategy for optimizing quantity of DNA extracted fromsoil.pp.45:7-20.

146-Boyum A et al(1991).Scand J Immuol. Separation of leuocytes:improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality ,34:697-712.

147-Kim C.H(2013)Expression of extracellular superoxide dismutase protein in diabetes,vol.40,no.5,pp.517-521.

148-Lodovicia M,Giovanneillia I,Pitozzia V and et al(2008)Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control,vol.638,no.1-2,pp.98-102.

149-. Tomic-Canic M,Brem H(2004).Gene array technology and pathogenesis of chronic wounds.*Am J Surg*,pp.188:67-72.

150--H.Patel,J.Chen,K.C.Das,and M.Kavdia(2013),"hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional level in HUVEC AND HMVEC,"*Cardiovascular Dialectology*,vol.12,no.1,pp.142-146.

151-Goth K and Eaton W(2000)Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes ,The Lancet,vol.356,no.9244,pp.1820-1821.

152-sherry,C.L,Kim,S.S,Freund,G.G(2009)Accelerated recovery from acute hypoxia in obese mice due to obesity-associated up-regulation of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA).Endocrinology,150,2660-67.

153-Reilly MP,Lehrke M,Wolfe ML and et al(2005)Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in human,pp.111:932—939.

.

The results of present study concluded that ROS generated in DFU with MPO activity induced proinflammatory cytokines which in turn enhanced apoptosis and mitochondria dysfunction.

Summary

Diabetes is of metabolic diseases in which high levels of sugar found in the blood over a long period of time and if left diabetes untreated can cause many complications, such as diabetic foot ulcer, which is a disease of patients with diabetes type 2 through the emergence of some of the symptoms of the disease sick in the foot, such as swelling and wounds and sores as a result of neuropathy or session as a result of sugar. The role of oxidative stress in DFU is well documented but its effect on inflammatory response are not understood particularly with respect to myeloperoxidase enzyme (MPO) and mitochondria dysfunction .The hypothesis presented in this study is that increased MPO activity, ROS levels with mitochondria dysfunction assist acute inflammatory response in DFU through enhanced non-inflammatory immune cell defenses and cell death through apoptosis. Blood sample were collected from patients with diabetic foot ulcers(n=30)as well as 30 blood samples from healthy persons as controls. Antioxidant enzyme such catalase(CAT)and superoxide dismutase(SOD),the dynamics of cellular such as tumor necrosis factor(TNF-α),interleukin-6(IL-6)and myeloperoxidase (MPO) were analyzed by ELISA technique ,while mitochondria function were measured by florescence microscope and BCL-2 by qPCR. The results have been show on a decrease in levels of antioxidant enzyme (SOD and CAT)in patients with DFU compared to control.while levels of proinflammatory cytokines (TNF-α and IL-6)as well as MPO were increased in DFU compared to control ($P < 0.05$). However levels of BCL-2 gene expression is decreased with mitochondria dysfunction as showed by Mitotracker green staining in DFU compared to control.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
University of Al-Qadisiyah
College of Education
Department of Chemistry

Increased Meloperoxidase activity (MPO) and Mitochondrial Dysfunction prolonged acute inflammatory response in diabetic foot patients

A Thesis

Submitted to the Council of the College of the education/ University of Alqadisiyah in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biochemistry

By:

Ashwaq Audah Abass

B.sc chemistry /university of Baghdad/1992

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Anwar Jasib Thaaban

2017A.C. **1438 A.H.**