جـامعة عيـن شمس
كلية البنات للأداب و العلوم والتربية
قسـم علـم الحيـوان

# تحليل تباين التعبيرات الجينية لعدد من الجينات المثبطة للسمية فى كبد ومخ الفئران بعد معالجتها بجرعات متعددة من الإندوكسان

رسالة مقدمة من الطالبة
**نـادية أبو الفتـوح أبو المعـاطى محـمد**
مساعد باحث بقسم بيولوجيا الخلية
شعبة الهندسة الوراثية و البيوتكنولوجى
المركز القومى للبحوث

رسالة مقدمة للحصول على
درجة الماجستير فى العلوم
( علم الحيوان)

كليـة البنـات
جـامعة عيـن شمس
٢٠٠٩

**جامعة عين شمس**
**كلية البنات للاداب و العلوم والتربية**
**قسم علم الحيوان**

# رسالة ماجستير

**اسم الطالبة : نادية أبوالفتوح أبو المعاطى محمد**

**عنوان الرسالة : تحليل تباين الرسائل الوراثية لعدد من الجينات المثبطة للسمية فى كبد ومخ فئران المعمل البيضاء بعد تناولها لجرعات متعددة من الإندوكسان**

**اسم الدرجة :** ماجستير فى العلوم ( علم الحيوان)

لجنة اشراف

**أ.د/ كريمة محمد سويفى** أستاذ متفرغ الوراثة قسم علم الحيوان كلية البنات- جامعة عين شمس

**أ.د/ هناء عبد الصادق عرابى** أستاذ وراثة الخلية قسم بيولوجيا الخلية المركز القومى للبحوث

**د/امل أحمد محمد حسن**
أستاذ مساعد وراثة الخلية
قسم بيولوجيا الخلية- المركز القومى للبحوث

الدراسات العليا

**ختم الاجازة اجيزت الرسالة بتاريخ / /٢٠٠٩**

**موافقة مجلس الكلية / /٢٠٠٩**

**موافقة مجلس الجامعة / /٢٠٠٩**

**جـامعة عيـن شمس**
**كلية البنات للاداب و العلوم والتربية**
**قسـم علـم الحيـوان**

# تحليل تباين التعبيرات الجينية لعدد من الجينات المثبطة للسمية فى كبد ومخ الفئران بعد معالجتها بجرعات متعددة من الإندوكسان

رسالة مقدمة للحصول على
درجة الماجستير فى العلوم
( علم الحيوان)

**من**
**نـادية أبـو الفتـوح أبـو المـعاطى محـمد**
مساعد باحث بقسم بيولوجيا الخلية
شعبة الهندسة الوراثية و البيوتكنولوجى
**المركز القومى للبحوث**

تحت اشراف

**أ.د/ كـريمة محـمد سويـفى**
**أستاذ متفرغ الوراثة** – قسم علم الحيوان
كلية البنات
جـامعة عيـن شمس
**أ.د/ هنـاء عبـد الصـادق عـرابى**
أستاذ وراثة الخلية
قسم بيولوجيا الخلية- **المركز القومى للبحوث**
**أ.د/امل احمد محمد حسن**
أستاذ مساعد وراثة الخلية
قسم بيولوجيا الخلية- **المركز القومى للبحوث**

٢٠٠٩

**جـامعة عيـن شمس**
**كلية البنات للاداب و العلوم والتربية**
**قسـم علـم الحيـوان**

**لسم الطالبة** : نـادية أبـوالفتوح أبـو المعاطى محمـد

**الدرجـة العلمية : مساعد بـاحث**

**قسـم** : بيـولوجيا الخليـة

**اسم الكليـة** : البنات للآداب و العلوم و التربية

**قسـم** : علـم الحيـوان

**الجـامعة** : عيـن شـمس

**سنة التخرج** : ١٩٩٨

# المستخلص

يهدف هذا البحث إلى محاولة القاء الضوء على الاثار الضارة التى يسببها عقار الاندوكسان وذلك عن طريق دراسة كمية التغيرات في معدلات الاشفار الجيني للانزيمات المضادة للاكسدة (SOD& GPX) في خلايا كبد و مخ فئران التجارب البيضاء باستخدام تقنية النسخ العكسي بوساطة سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (RT-PCR) . ولتحقيق هذا الهدف تم حقن الفئران بعقار الاندوكسان (٠.٤ مليجرامات لكل حيوان ٢٠ جرام) وتم الذبح بعد ٥ أيام من الحقن للمجموعة الأولى ثم عشر أيام و خمسة عشر يوم بالنسبة للمجموعة الثانية و الثالثة ومجموعة رابعة غير معالجة للمقارنة.

وقد اثبت النتائج أنه في خلايا كبد الفئران تسبب عقار الاندوكسان في زيادة طفيفة في معدل اشفار جين (SOD) في المجموعة الأولى والثانية وانخفاض غير معنوي له في المجموعة الثالثة، و بالنسبة لإنزيم ( GPX) فقد حدث انخفاض ذو دلالة احصائية فى معدل الاشفار الجيني له في المجموعة الثالثة بمقارنته بالفئران غير المعالجة بهذا العقار.

وفى خلايا المخ حدث انخفاض ذو دلالة احصائية في معدل اشفار جين SOD في المجموعات الثلاث وقابل هذا الانخفاض زيادة معنوية في معدل اشفار جين GPX في المجموعة الثانية والثالثة . وقد تم حساب نسبة SOD/ GPX فوجد أنها زادت زيادة معنوية في الكبد وانخفضت انخفاض معنوي في المخ. وعليه يمكن القول أن عقار الاندوكسان أدى إلى حدوث تغيرات معنوية في معدلات الاشفار الجيني للإنزيمات (SOD وGPX). وأن الكبد كان الأكثر تأثرا بهذا العقار. كما أوضحت النتائج ايضا أن الانخفاض المعنوى فى نسبة SOD الى GPX يدل على حدوث تكيف إيجابى لخلايا المخ لتقليل الأثر الضار لهذا العقار عن طريق زيادة الإشفار الجينى لإنزيم GPX .

# الملخص العربي


يعتبر عقار الاندوكسان من العقاقير الأكثر استخداما في علاج العديد من الأمراض و من أهمها علاج الأورام السرطانية، على الرغم من أنه يعد من العقاقير المسرطنة حيث أنه يتحول داخل الجسم إلى مواد أكثر نشاط.

ولقد أثبتت العديد من الدراسات أن تفاعلات الأيض التي تحدث لعقار الاندوكسان داخل الجسم تكون مصحوبة بانطلاق جزيئات حرة (ROS) هذه الجزيئات تكون سالبة الشحنة وغير ثابتة كيميائيا تتفاعل بسرعة مع مكونات الخلية وتؤدى إلى حدوث تغيرات بها تؤدى في النهاية إلى موت الخلية، وهذه الجزئيات الحرة تنتج داخل الجسم بصورة طبيعية أثناء عمليات الأيض بكمية محدودة لذلك يوجد إنزيمات مضادة للأكسدة لمعادلة هذه الجزيئات ، أهم هذه الإنزيمات أنزيم الجولوتاثيون بيرأكسيداز (GPX) والسوبر أكسيد دسميوتييز (SOD).

و يهدف هذا البحث إلى محاولة القاء الضوء على الآثار الضارة التى يسببها عقار الاندوكسان وذلك عن طريق دراسة كمية التغيرات في معدلات الإشفار الجيني للإنزيمات المضادة للأكسدة (SOD& GPX) في خلايا كبد و مخ فئران التجارب البيضاء بإستخدام تقنية النسخ العكسي بوساطة سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (RT-PCR) . ولتحقيق هذا الهدف تم تقسيم الفئران عشوائيا إلى ثلاث مجموعات كل مجموعة تحتوى على ٦ فئران وتم معالجتها بعقار الاندوكسان (٠.٤ مليجرامات لكل حيوان ٢٠ جرام ) ومجموعة رابعة تحتوى على ٨ فئران غير معالجة استعملت كمجموعة ضابطة للمقارنة. وتم الذبح بعد ٥ أيام من الحقن للمجموعة الأولى ثم عشر أيام و خمسة عشر يوم بالنسبة للمجموعة الثانية و الثالثة.

**ويمكن ايجاز النتائج على النحو التالى:**

**في خلايا الكبد:**

تسبب عقار الإندوكسان في زيادة طفيفة في معدل اشفار جين (SOD) في المجموعة الأولى والثانية(1.197±0.185) ,(1.219±0.238) وانخفاض غير معنوي له في المجموعة الثالثة (1.023±0.286) **مقارنة بالمجموعة الضابطة** (1.095±0.069) **و** بالنسبة لإنزيم ( GPX) **فقد حدث** انخفاض غير معنوى فى المجموعة الاولى و الثانية بينما كان هذا الانخفاض ذو دلالة احصائية فى معدل الإشفار الجيني له في المجموعة الثالثة ± 0.393) (0.112 بمقارنته بالمجموعة الغيرمعالجة و كذلك بالمجموعة الاولى.

**وفى خلايا المخ:**

**حدث انخفاض** ذو دلالة احصائية في معدل إشفار جين SOD **بالثلاث** مجموعات المجموعة الاولى (0.071 ± 0.118) و الثانية (0.061 ± 0.173)**والثالثة** (0.064±0.190) مقارنة بالمجموعة الضابطة (0.477 ±0.021 ) **وقابل** هذا الانخفاض زيادة معنوية في معدل إشفار جين GPX في الثانية (0.151±0.658) **والثالثة** (0.076 ± 0.845) **مقارنة بالمجموعة الاولى** (0.064± 0.329) **التي** حدث فيها انخفاض معنوى مقارنة بالمجموعة **الضابطة** (0.037±0.781). كما تم حساب **نسبة** SOD/ GPX فوجد أنها زادت زيادة معنوية في الكبد وانخفضت انخفاض معنوي**في المخ**. وعليه يمكن **القول أن** عقار الإندوكسان أدى إلى حدوث تغيرات معنوية في معدلات الإشفار الجيني للإنزيمات (SOD وGPX) وأن الكبد هوالأكثر تأثرا بهذا **العقار. كما أوضحت** النتائج أيضا **ان الإنخفاض المعنوى فى نسبة** SOD **إلى** GPX يدل على حدوث تكيف إيجابى لخلايا المخ لتقليل الأثر الضارلهذا العقار عن طريق زيادة الإشفار الجينى لإنزيم GPX .

**Ain Shams University,**
**Women's Collage for Arts, Science& Education,**
**Department of Zoology.**

# Analysis of Variation of the Expression of Detoxifying Genes in Mice Liver and Brain Cells after Chronic Administration of Cyclophosphamide (Endoxan)

***THESIS***

Submitted to Women's Collage,
Ain Shams University
For M. Sc. Degree in Science

***BY***

**Nadia Abo Elfotoh Abo El Maty**
Associate researcher
**National Research Centre.**
(B.Sc. 1998)

***TO***

Zoology Department,
Women's Collage,
Ain Shams University.

**2009**

*APPROVAL SHEET*

***Name***: **Nadia Abo Elfotoh Abo El Maty**

***Title***: Analysis of Variation of the Expression of Detoxifying Genes in mice Liver and Brain cells after Chronic Administration of Cyclophosphamide.

***Scientific Degree***: M.Sc.

## *Supervisors*

**Prof. Dr. Karima Mohammad Sweify**
Prof.of Cytogenetics Zoology Department,
Women's Collage for Arts, Science& Education,
Ain Shams University.

**Prof. Dr. Hanaa Abdel Sadek Oraby**
Prof.of Genetics, Cell Biology Department,
Genetic Engineering and BiotechnologyDivision,
National Research Centre.

**Prof. Dr. Amal Ahmed Mohamed Hassan**
Associate Prof. of Genetics, Cell Biology
Department, Genetic Engineering and
Biotechnology Division,
National Research Centre.

**Head of Zoology Department**
**Prof. Dr.**

## *Qualification*

***Name*** : Nadia Abo Elftoh Abo El Maty

***Scientific Degree*** : M.Sc. (Cytogenetics)

***Department*** : Zoology

***College*** : Women's College for Arts, Science & Education

***University*** : Ain Shams University

***B.SC. Graduation Year***: May 1998

# The Premaster studies

- **Ecology**
- **English language**
- **Histology**
- **Histopathology**
- **Physiology**
- **Statistics**

# ABSTRACT

Cyclophosphamide (CP) is a widely used antineoplastic drug, which causes toxicity of the normal cells due to its metabolites. The present work studied the induced cell damage in liver and brain cells of mice after chronic administration of CP (0.4mg/20 g mice) for 5, 10 or 15 consecutive days. Semi-quantification for the expression of genes encoding for the antioxidant enzymes {Glutathione peroxidase (GPX) and Superoxide dismutase (SOD)} were measured, using the reverse transcriptase polymerase chain reaction ( RT- PCR) technology. Results indicated that chronic cyclophosphamide administration resulted in a substantial variation in the expression of genes involved in the antioxidant defence mechanism in liver and brain cells of treated mice. In liver cells, SOD gene expression was slightly activated after CP treatment for five and ten days. After fifteen days of CP treatment SOD mRNA was slightly decreased, compared to the control. However, these changes were not statistically significant. In the mean time, GPX expression has been declined in 5 and 10 days groups to reach significant decreased levels after15 days of the treatment, compared to the control and compared to that of 5 days. In brain cells, there was a significant decrease in the

levels of expression of SOD in the three treated groups, compared to the control. A statistically decreased GPX expression in the 5 days group, compared to the control was also recorded . However, there was a significant increase in the gene expression of GPX in 10 days and 15 days groups compared to the 5 days group. Results also revealed that linearly statistically significant increase in the SOD/GPX expression ratios in liver cells, possibly implying oxidative stress increase was induced by CP treatment. SOD/GPX expression ratios in the brain cells showed a linearly statistically significant decrease prolonging CP treatment for 15 days. These decreased ratios suggest a possible reduced oxidative stress in brain cells. The results obtained from the present study suggest that the liver was injured by chronic treatment with CP and confirm the development of an adaptive response in the brain cells by up regulating GPX gene expression.

# *List of Abbreviation*

**A** : Adenine

**ANOVA** : Analysis of Variance test.

**C** : Cytosine

**CA** : Centromic attenuation

**CAT** : Catalase

**cDNA** : Complementary DNA

**CO** : Corn oil.

**CP** : Cyclophosphamide

**CPG** : Regions of DNA where a cytosine nucleotide is followed by a guanine nucleotide and separated by a phosphate group.

**Cu/ZnSOD** : Copper/zinc Superoxide dismutase

**$CYP_{11}B_2$** : Aldosterone synthase.

**DCM** : Dilated cardiopathy.

**DEPC** : Diethyl pyrocarbonate treated water.

**dNTP** : Deoxynucleotide triphosphate.

**DOX** : Doxorubicin.

**DR** : Dietary restriction.

**EDTA** : Ethylenediamine tetra acetic acid

**FO** : Fish oil.

**FR** : Food restriction.

**G** : Guanine

**GPX** : Glutathione peroxidase

**GPXGI** : Gastrointestinal glutathione peroxidase

**GR** : Glutathione reductase

**GSH** : Glutathione

**GSSG** : Glutathione disulphide

**GST** : Glutathione-S-transferase

**GTP** : Guanosine-5'-triphosphate

**HO** : Hydroxyl radicals.

**ICM** : Ischemic cardiophathy.

**Max. OD** : Maximum optical density

**M-Mul V** : Moloney Murine Leukemia Virus.

**MN** : Micronuclei

**MnSOD** : Manganese Superoxide dismutase

**NF** : Nonfailing.

**PCR** : Polymerase chain reaction

**Pd (N) 6** : Hexadeoxyribonucleotide

**PUFAs** : Polyunsaturated fatty acids

**ROS** : Reactive oxygen species

**RT- PCR** : Reverse transcriptase polymerase chain reaction

**SCE** : Sister Chromatide extection

**SE** : Standard error