تأثير إزالة المبايض في موجات القلب الكهربائية Electrocardiogram لإناث الأرانب المحلية .

ريم عبد الرحيم السعدي

جامعة بابل,كلية الطب

وفاق جبوري البازي , حسين علي عبد اللطيف

جامعة كربلاء , كلية التربية

الخلاصة

هدف هذه الدراسة إلى معرفة تأثير إزالة المبايض في موجات القلب الكهربائية وبالأخص في زوال وعودة استقطاب البطين وبعض التغيرات الحاصلة في المادة الوراثية الخاصة بقنوات الصوديوم – بوتاسيوم الأيونية في إناث الأرانب المحلية المعرضة لإزالة المبايض .

شملت الدراسة عشرة إناث من الأرانب المحلية البالغة بشكل عشوائي إلى مجموعتين وبواقع (5/مجموعة) . ولمدة ثلاثة شهور, المجموعة الأولى حقنت بـ 20 مل /كغم من المحلول الفسلجي ولمدة ثلاثة أشهر واعتبرت كمجموعة سيطرة و المجموعة الثانية تم إزالة المبايض منها فقط وتم قياس أطوال موجات القلب الكهربائية . جاءت نتائج الدراسة الحالية كما يلي :-

– حدوث حالة تسارع في ضربات القلب (Tachycardia) من خلال قصر المسافة في موجات القلب الـ (R–R) G2 مقارنة مع مجموعة G1 وحصول قصر Shortening في المدة الفاصلة لانبساط عضلة البطين QT interval و قصر في الفترة الفاصلة لـ PR–interval وقصر في قيمة الموجة المركبة QRS complex مقارنة مع مجموعة G1 .

أما الدراسة الوراثية في الاكسونين I و II لجينات بروتين التليثونين باستخدام تقنية الـ PCR فقد أشارت إلى عدم وجود تغيرات في بروتينات قنوات الصوديوم – بوتاسيوم في خلايا العضلة القلبية في مجموعة الأرانب مزالة المبايض مقارنة مع مجموعة السيطرة

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of the ovaries removal on electrocardiogram , specially on ventricle repolarization, depolarization and some changes in the specific genetic material which are occurs in the sodium /potassium ion channels on adult female rabbits which are exposed overctomized

Ten adult females of rabbits were randomly divided into two groups (5/group) for three months , the first group was injected with (20ml/kg)normal saline served as control group , second group was exposed to ovaries removal only electrocardiogram estimated the results of this study are :-

- Tachycardia cleared by shortening in R-R wave in group(G2) where compared with group G1 and short in period QT interval ,short in PR-interval and short in QRS complex which compared with control group .

The genetic study in Exon I and II of protein Telethonin genes using the PCR technique has pointed to the absence of changes in the channel proteins sodium - potassium in heart muscle cells in a rabbit Ovarectomized compared with the control group

المقدمة

إن سن اليأس هو تلك النقطة الحرجة من حياة المرأة عندما تتوقف الدورة الطمثية بشكل كامل منهيةً قدرة المرأة على الإنجاب وتعتبر المرحلة النهائية لعملية حيوية تتجلى بنقص في إفراز الهرمونات الأنثوية من المبيض , و أن إزالة المبايض تؤدي إلى حصول حالة تدعى سن اليأس الجراحي نتيجة للاختلال في مستوى هرمون الاستروجين, و تؤدي عملية استئصال المبايض إلى انخفاض مستوى هرمون الاستروجين وفقدان الدورة الحيضية وبالتالي إلى زيادة مستويات هرمونات مغذيات المناسل في الدم نتيجة للتغذية الراجعة السالبة (Christian & Moenter ,2010) حيث ان انخفاض هرمون الاستروجين بعد سن اليأس الطبيعي أو الجراحي في الإنسان أو المستحدث في الحيوانات المختبرية يعتبر عامل خطورة لأمراض الجهاز القلبي

الوعائي Cardiovascular system diseases وإمراض القلب التاجية Coronary heart diseasesمثل ارتفاع الضغط الشرياني Arterial hypertension واحتشاء العضلة القلبية Cardiac infraction (Braunwald , 1997)

المواد وطرائق العمل Materials & Methods

استخدمت في هذه الدراسة 10 من إناث الأرانب المحلية يتراوح معدل أوزانها بين (1500 – 2000) غرام ووضعت في أقفاص معدة لهذا الغرض في البيت الحيواني في جامعة بابل / كلية العلوم ولمدة شهر , وتم توفير الماء والغذاء بصورة حرة وجرعت علاجاً للتأكد من خلوها من الأمراض المختلفة , آذ جرعت فموياً 0.5 ملغم من (Sodium –Sulfadimidine)في 1 لتر من الماء ولمدة 5 أيام متتالية , و 0.5 ملغم من (Ampicillin 20 %) في 1 لتر من الماء ولمدة 5 أ يام متتالية وتركت الحيوانات للتأقلم لمدة شهر .

قسمتً 10 من إناث الأرانب عشوائياً إلى مجموعتين طيلة مدة التجربة وقد اتبعت طريقة الحقن حسب (Dabbagh *et al* . ,1997) وكانت المجاميع :-

1 – مجموعة السيطرة G1 وعوملت (0.5) مل بالحقن العضلي من المحلول الفسلجي بالتدريج التصاعدي في الأسبوع الأول مرة والأسبوع الثاني مرتين والأسبوع الثالث ثلاث مرات والأسبوع الرابع أربع مرات .

2– المجموعة الثانية G 2 تم إزالة المبايض الثنائية فقط Bilateral oophorectomy , لقد تمت العملية تحت ظروف صحية حيث تم خدرت الحيوانات باستخدام مزيج (مل ونص مل من الكيتامين والزايلازان) ثم تم استئصال المبيض وذلك بسحب المبيض خارج الجسم وعقد الأوعية الدموية ومن ثم استئصال المبيض (Mills& Copland , 1982 ; Hughs , 2000) .

وتم قياس موجات القلب الكهربائية بواسطة جهاز تخطيط القلب الكهربائي electrocardiograph (ECG) مع تحوير الأقطاب المعدنية للجهاز. وتمت القراءة على قياس Lead II على قوة التضخيم 10 mm/Mv وفولتية كهربائية 25 mm/s وبسرعة 1/2 ثانية . وقد تمت عملية قياس التخطيط بدون تخدير

طريقة استخلاص الـ DNA

بعد استخلاص الـDNA من نسيج القلب حسب طريقة الشركة المصنعة Promega تم جمع تفاعل أنزيم بلمرة الـDNA المتسلسل (Polymerase chain reaction) PCR

إذ تم تحضير المحلول الخزين Stock solution حسب النشرة المرفقة من الشركة المجهزة (Bioneer) ومحلول العمل Work solution وكالتالي :

أ ضيف 16l µ من Premix لكل أنبوبة ابندروف خاصة بجهاز الـ PCR وأضيف لها 1µL مايكرولتر من كل من F–Primer , R–Primer من محلول العمل وأضيف 2 µl من الـ DNA ومن ثم نقلت الأنابيب إلى جهاز PCR والذي تم على شكل 40 دورة تبدا الدورة الاولى لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 94 م° ودرجة حرارة لـ Exon الأول درجة حرارة 64 م° ولـ Exon الثاني درجة حرارة 67 م° ولـ Exon الثالث درجة حرارة 66 م° لمدة دقيقتين والدورة النهائية لمدة دقيقة وبدرجة 94 م°وتحفظ الأنابيب بالتجميد لحين عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز .

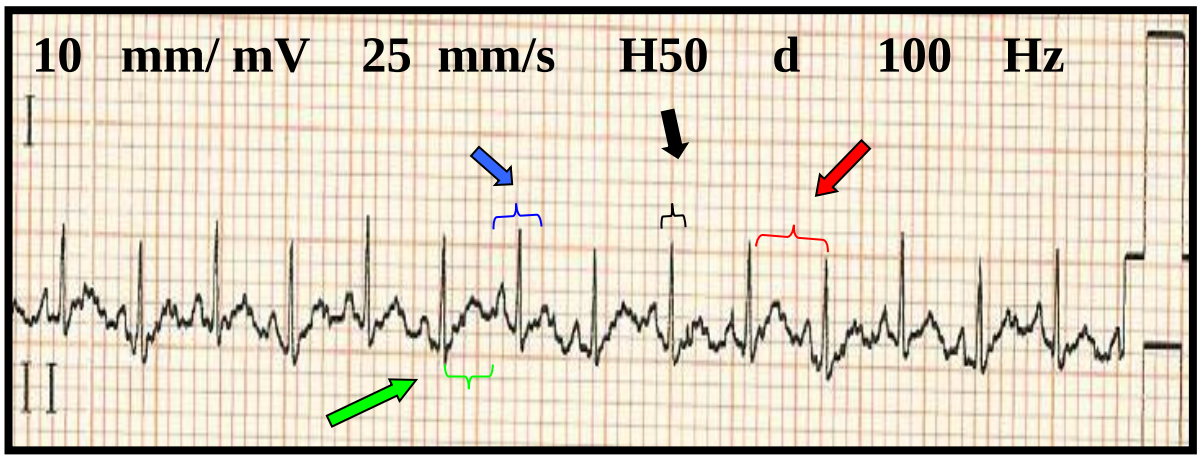
جدول (1) يوضح تسلسل اكسونات البرايمرات المستخدمة في الPCR

Forwared primer (5-3)	Reverse primer (5-3)	Size bp	Annealing T.
GGGCTATTTAAAGGGCCTG	TCATGGCTCAGTGAGGGTG	222	64
TGCCCAGAGAGCAACAGCT	TTGCTGACAGGCACCACAG	385	67
GGAGGTGGTGAGATCACA	CACAGGTCCTAGCCAGGAA	180	65

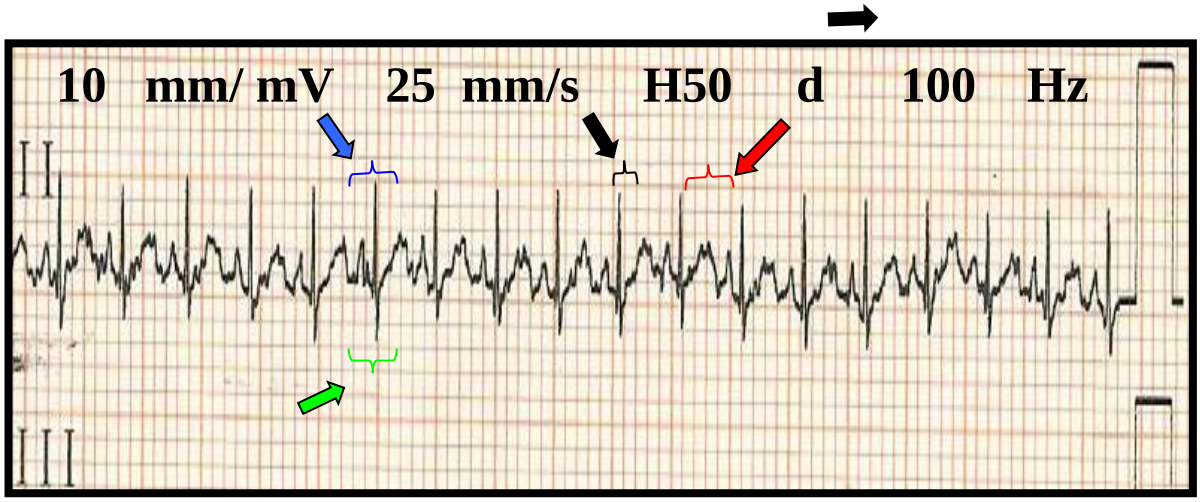
وبعد ذلك تم الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وتم التقاط الصور الرقمية بكاميرا من نوع Canon وبدقة 12 ميغابكسل .

النتائج والمناقشة Results & Discussion

أشار الشكل (1) تخطيط القلب الكهربائي لأنثى أرنب لمجموعة السيطرة ويلاحظ إن النسبة بين R-R يساوي 0.24 ملي ثانية و طول المدة الفاصلة في انقباض وانبساط البطين QT interval تساوي 0.12 ملي ثانية



شكل (1) يبين المخطط البياني لقلب أنثى أرنب تمثل مجموعة السيطرة G1 ونلاحظ من المخطط النظمية لضربات القلب طبيعية (R-R) وقيمتها 0.24 mm/s , وقيمة المدة الفاصلة لانقباض وانبساط البطين QT interval 0.12 mm/s قيمة PR-complex تساوي (0.06 mm/s) وقيمة QRS complex تساوي (0.06 mm/s)



شكل (2) يبين المخطط البياني لقلب أنثى أرنب تمثل مجموعة الحيوانات مزالة المبايض (G2)ويشير الشكل إلى حالة التسارع في نظمية القلب (قصر المسافة للR-R) والى قصر فترة Short QT interval وقيمة PR-interval تساوي (0.06 m m/s) وقيمة QRS complex تساوي (0.02mm/s)

أشار الشكل (2) لتخطيط القلب الكهربائي لمجموعة الأرانب مزالة المبايض حيث يلاحظ قصر المسافة (R– R) إذ بلغت 0.20 mm /s والذي يدل على وجود حالة تسارع بضربات القلب (Tachycardia) , كما يشير الشكل إلى قصر الفترة الفاصلة (Short QT interval) والبالغة 0.11 mm/s مقارنة مع مجموعة السيطرة G1 .

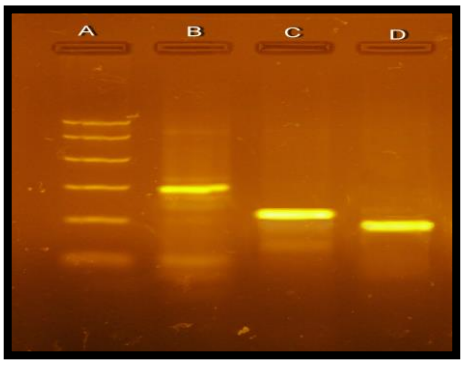
إن نتائج الدراسة الحالية تقترح بان انخفاض هرمون الاستروجين له اثر مباشر على تحوير عضلة القلب البطيني عند انبساط القلب حيث ظهر ذلك التحوير في مخطط القلب الكهربائي على الفترة الفاصلة للانقباض وانبساط عضلات البطين في القلب فأصبحت اقصر QT short . يلاحظ من الدراسة الحالية بأن هناك ميكانيكية جزيئية ذات علاقة وطيدة مع انخفاض مستويات تركيز هرمون الاستروجين تؤثر في قصر الفترة الفاصلة لانقباض وانبساط عضلات البطين ,حيث إن انخفاض مستوى تركيز هرمون الاستروجين في الجسم يغير من التعبير الجيني لقنوات البوتاسيوم Potassium rectifier channels وهذا ما أكدته إحدى الدراسات (Sebastien *et al* . ,2003) والذي ينظم مرحلة عودة استقطاب خلايا عضلة القلب ,من خلال جهد الفعل الذي يعكس المدة الفاصلة لموجة QT interval (Luhr *et al* . ,2000) إن عملية إزالة المبايض تؤدي إلى انخفاض مستوى تركيز هرمون الاستروجين والذي يؤثر في موجات القلب الكهربائية من خلال اضطرابات في نظمية القلب Arrhythmia وحصول حالة التسارع في ضربات القلب Tachycardia , الناتجة من التغيرات في فترة جهد الفعل(APD) Action Potential Duration المرتبطة بالتغيرات في سرعة خروج ايونات البوتاسيوم من قنوات البوتاسيوم –الصوديوم Outward K+ Current Densities وبالتالي الاضطرابات في نظمية ضربات عضلة البطين والتسارع فيها حيث يؤدي هرمون الاستروجين الى انخفاض مستوى التنظيم لايونات تيارات البوتاسيوم وهذا ما أكده Tomoak وجماعته (2009) وقد لاحظ Nakagawa وآخرون 2006 بان المدة الفاصلة لموجة QT تكون اقصر عند إناث الفئران في مرحلة الجسم الأصفر Luteal phase وهي المرحلة التي ينخفض فيها معدل تركيز هرمون الاستروجين مقارنة مع مرحلة الجريبات Follicular phase التي يكون معدل تركيز هرمون الاستروجين عالي حيث تكون المدة الفاصلة لموجة QT interval طويلة (Nakagawa *et al* . ,2006) ان تأثير هرمون الاستروجين المعالج للنساء بعد سن اليأس يؤثر في انبساط القلب البطيني . (Haseroth *et al* . ,2000; Carnethon *et al* . ,2003) , وقد اثبت بأن الأرانب المزالة المبايض والمعاملة بجرع من هرمون الاستروجين يؤدي إلى إطالة موجة QT prolongation وذلك بسبب انخفاض التعبير الجيني لقنوات البوتاسيوم وبشكل تنظيمي يتناسب مع الاختلافات الجينية في قنوات البوتاسيوم من صنف(***HK2 و K V 1.5***)في خلايا أنسجة البطين .

ربما يعود سبب قصر موجة QT إلى حدوث طفرة في قنوات البوتاسيوم وبالأخص في مواقع بدء النسخ الجيني لذلك سبب استئصال المبايض إلى تضخم عضلة البطين في بعض الحالات Hypertrophied ,وان نتائج مجموعة الأرانب المزالة المبايض سببت قصر في موجة QT والتي تمثل فترة انقباض وانبساط القلب في البطين إلى ارتفاع مستوى التنظيم Up regulation صناعة قنوات البوتاسيوم بسبب انخفاض مستوى تركيز المنظم وهو الاستروجين والذي يؤدي الى زيادة جهد الفعل وبالتالي ازدياد تقلص العضلة وعدم الوصول إلى إزالة الاستقطاب ونتيجة ذلك يحصل اضطرابات في نظمية ضربات القلب Arrhythmia وقصر المسافة للفترة الفاصلة لعودة استقطاب خلايا عضلة البطين . و من خلال تحطم المستقبلات لهرمون الاستروجين في عضلة قلب الفئران وبالأخص في البطين من خلال غياب الاستروجين جراحياً أدى إلى ازدياد التعبير الجيني لقنوات

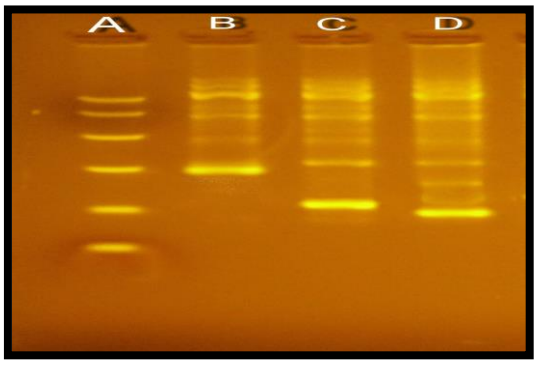
الكالسيوم من نوع L-type Ca2+ channels في نسيج البطين ventricular myocytes وبالمقابل التأخير في عودة استقطاب البطين QRS وقصر المسافة في المدة الفاصلة QT interval وبالتالي إلى تخلل نظمية القلب Arrhythmia كما يلاحظ هذا التأثير في النساء في سن اليأس آو النساء مزالة المبايض جراحياً ويؤدي إلى الهياجية Excitability والانقباضية Contracillty وبالتالي إلى قصر R-R وقصر QT interval (Johnson *et al.* ,1997)

إما بالنسبة لتغيرات الجزيئية في القنوات الأيونية في نسيج عضلة القلب (البطين)

تم تفاعل أنزيم بلمرة الـ DNA المتسلسل بأستخدام بادئات اعتماداً على الدراسة السابقة لـ Mazzone وجماعته (Mazzone *et al* . ,2008) إذ تبين الإشكال (3,4)الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لـDNA لمجاميع التجربة.



شكل (3) يبين الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لـDNA لمجموعة السيطرة



شكل (4) يبين الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لمجموعة الأرانب مزالة المبايض

- **المسار A يمثل DNA القياسي 100 bp DNA Ladder**
- **المسار B يمثل الترحيل الكهربائي للقطعة المستهدفة من ال Exon 2 ذات الحجم 385 bp**
- **المسار C يمثل الترحيل الكهربائي للقطعة المستهدفة من ال Exon 1 ذات الحجم 222**
- **المسار D يمثل الترحيل الكهربائي للقطعة المستهدفة من ال Exon 2 ذات الحجم 180 bp**

بتركيز 0.2%, 0.5 x TBE , v 70 , A ولمدة ساعة لكل المجاميع zom

بما أنه تم تضخيم القطع المستهدفة من Exon 1 (222) و Exon 2 (180, 385) بنجاح لمجموعة السيطرة والمجموعة مزالة المبايض وبالاستناد إلى الدراسة الحديثة التي أجراها الباحث Mazzone وجماعته في عام 2008 على بروتين التليثونين Telethonin والذي يرتبط بتفاعلات مع قنوات الصوديوم –البوتاسيوم مما يعرقل ويغير من عمل هذه القنوات الموجودة فقد أشارت هذه الدراسة إلى عدم حدوث تغير في اكسونات بروتين التليثونين protein Telethonin المعروف بتفاعله مع القنوات الأيونية والذي يعمل بمثابة امتداد استشعار Stretch sensor والذي يشترك في نفس الموقع للتعبير الجيني لقناة الصوديوم ***Na v1.5*** **المشفر بـ** ***SCN5A*** .

ويمكن تفسير هذه النتيجة ضمن الاحتمالين أدناه :-

1- أ ن عامل إزالة المبايض لم يؤدي إلى حدوث تغيرات وراثية في الـ DNA في كل من الاكسون I و II .

2- قد يؤدي العامل أعلاه إلى حدوث تغيرات وراثية تتمثل بحصول طفرة نقطية يتطلب تحديدها استخدام تقنية دراسة تسلسل متوالية الـ DNA (DNA Sequencing).

إن التعبير الجيني للخلايا السريعة الانفعال مختلف في القنوات الأيونية والذي يسمح بالتبادل السريع مع الفراغ الداخلي الخلوي وهذا التفاعل الايوني ينتج عنه انعكاس الصوديوم وحصول إزالة الاستقطاب . أن وظيفة التعبير الجيني للصوديوم عند موقع ***Na v1.5*** في القلب والدماغ والقناة المعوية وتتغير هذه الوظيفة لقناة الصوديوم حسب التفاعل للبروتينات , إذ أن حصول الاضطرابات في هذا الجين يؤدي إلى حصول أمراض في القلب وعدم انتظام نظمية القلب وقد أشارت الدراسة(Mazzone , *et al* .,2008) إلى حصول طفرة وراثية في هذا الجين مما أدى إلى حصول انسداد كاذب معوي بسبب حدوث تغيرات في قنوات الصوديوم مما سببت مرض انسداد الأمعاء الكاذب,يستنتج بإمكانية وجود تغيرات أو حدوث طفرة في اكسونات بروتين التليثونين والذي قد ينتج عنه تغير في وظيفة قناة الصوديوم عند ***Na v1.5*** .

إن التليثونين بروتين صغير يزن (19Kda) كيلو دالتن يعبر جينياً بشكل رئيسي في العضلات المخططة والقلبية والذي يرتبط ويتفسفر بواسطة Kinase D, Titin Kinase وهو معروف بتفاعله مع عدد من البروتينات (Mazzone , *et al* .,2008) .لذا فأنه بالإمكان تحديد الطفرة النقطية في حال حدوثها فقد استطاع Mazzone من تحديد طفرة نقطية تم فيها استبدال قاعدة واحدة بأخرى وبالتالي تم تغيير السلسلة الببتيدية للأحماض الامينية الناتجة والمسؤولة عن تصنيع بروتين التليثونين .

الاستنتاج

- انخفاضا معنوياً في مستوى تركيز هرمون الاستروجين وبالتالي إلى حدوث حالة تسارع في نظمية القلب (Tachycardia) وقصر في موجة (QT interval) في مجموعة الأرانب المزالة المبايض, وتشتت في موجة QT و قصر في الفترة الفاصلة لـ PR-interval وقصر في قيمة الموجة المركبة QRS complex مقارنة مع مجموعة G1 .

- إن عملية إزالة المبايض أدت إلى احتمال حدوث تغيرات وراثية في بروتين التليثونين ثم تغيرات في عمل قنوات الصوديوم –والبوتاسيوم في عضلة قلب إناث الأرانب

المصادر

Braunwald ,E.(1997). Heart Disease :Atexbook of cardiovascular Medcine ,Fith Edition ,P108 ,Phila delphia ,W.B.Saunders .Co. ISBNO -7216-5666-3.

Carnethon ,MR.;Anthony ,MS. ;Cascio, WE. ;Folsom ,AR.; Rautaharju ,PM.;Liao ,D .;Evans ,GW.& Heiss ,G. (2003).AprosepectiveEvalution of the risk of QT prolongation with hormone Replacement therapy : the Atherosclerosis risk in Communities stud.Ann. Epidemiol.;(7): 530-6.

Christain , C.& Moenter ,S. (2010). The Neurobiology of preovulatory and Estradiol –induced Gonadotropin –Raeleasing hormone Surger .Endocrine . Rev. 31 :544-577.

Dabbagh ,A.J. ;Shwaery ,G.T. ;Keancy ,J.F. &Frei ,B.(1997).Effect of ironoverload and deficiency on atherosclerosis in the Hypercholesterolmic rabbit .Arterioscler .Thromb .Vase Biol., 17 :2638-2645.

Haseroth ,K. ; Syffart ,K. ; Wehling , M. &Christ ,M. (2000). Effects of progestin – estrogen replacement therapy on QT – dispersion In postmenopausal women .Int. J. Cardiol.,(2-3): 161-5.

Hughs ,HC.(2000). Anesthesia of laboratory animals lab. Animal .;10 : 40-56.

Johnson ,B.D. ; Zheng ,W.;Korach ,K.S. ;Scheur ,T.; Catteral ,G.M. (1997) Increased expression of the cardial .L-Type calciumChannel in Estrogen receptor –deficient Mice Rockefeller U. press .110 (2): 135-140.

Luhr ,M.;Saels ,A.; et al . (2000). Arethere Sex-spectific difference in Ventricularrepolarization or in drug –induced early after DepolarZations in isolated rabbit parkinji fibers !J.Cadio. Vasc. Pharmacol; 132-139.

Mazzone ,A. ; Strege ,P. ;Tester ,D.;Bernard ,C.; Faulkner ,G.;Giorgio ,R.;Makieliski ,J.; Stanghllini ,V.; gIBBONS ,S.;Achrman ,V. Farrugia ,G. (2008). Amutation in telethonin Alters ***Nav &1.5*** Function .J.Biol. Chem. ; 283 (24): 16537-16544.

Mills ,T.& Copland ,J. (1982). Effect of Ketamine –Xylazine anesthesia on Blood levels of luteinizing hormone and follicle stimulating Hormone in rabbits .Lab.Anim. Sci. ; 37 : 619-621.

Nakagawa ,M. ; Ooie ,T. ;Taniguchi ,Y.;Anan ,F.; Yonemochi ,H.& Saikawa ,T.(2006). In flunce of menstrual cycle on QT – interval Dynamics .Pacing Clin . Electrophysiopl. ; 29 (6): 607-13 .

Tomoak ,S.;Andrea, C. ;Jeam.C.;Ligia ,T. Enrico ,S.&Mansourch ,E. (2009).Estrogen contributes to gender differences in Mouse Ventricular repolarization .Circ .Res . 24 ;105 (4):343-352.

Sebasitein ,H.;Jean-Louis ,D.;Rachel ,R.;Soraga ,S.;Sophie ,C. & Christian ,F. (2003). Influence of endogenous oestrogens on QT interval Duration .European heart .J. 24,166-1667.