دراسة كيموحيوية ونسيجية لإنزيم الثايوردوكسين ردكتيز المعزول من مصل الدم في الجرذان الطبيعية والمصابة بالكرب التأكسدي

أميرة احمد حمدون[١] و لؤي عبد علي الهلالي[٢]

[١] فرع الفسلجة والكيمياء الحياتية والأدوية، كلية الطب البيطري، [٢] قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ٨ تموز ٢٠١٨؛ القبول ٢١ كانون الأول ٢٠١٨)

الخلاصة

تضمن البحث دراسة تأثير إنزيم الثايوردوكسين ردكتيز المفصول من مصل دم الإنسان في الجرذان الطبيعية أو المصابة بحالة الكرب التأكسدي، من خلال الفحص النسيجي للقلب والكبد وقياس المتغيرات الكيموحيوية التي تضمنت إنزيم الثايوردوكسين ردكتيز وإنزيم الكرياتين كاينيز وإنزيم ألانين أمينوترانسفريز وإنزيم أسبارتيت أمينوترانسفريز والبليروبين الكلي والألبومين وحامض اليوريك. إذ أن معاملة حيوانات التجارب ببيروكسيد الهيدروجين ١% أدت إلى ارتفاع معنوي في إنزيم الثايوردوكسين ردكتيز وإنزيم الكرياتين كاينيز، إنزيم أسبارتيت أمينوترانسفريز والبليروبين الكلي مقارنة بمجموعة السيطرة، بينما كان هناك انخفاض معنوي في الألبومين وحامض اليوريك ولم يكن هناك فرق معنوي لإنزيم ألالنين أمينوترانسفريز مقارنة مع مجموعة السيطرة، فضلا عن أن حقن الجرذان بالإنزيم المفصول في الغشاء البريتوني بجرع مختلفة ٢ و٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان مع بيروكسيد الهيدروجين ١% حسنت من مستوى المتغيرات المقاسة من خلال تقليل حالة الأكسدة والكرب التأكسدي الناتجة لدى الجرذان. أظهرت نتائج الفحص النسيجي وجود تغييرات مرضية مميزة عن مجموعة السيطرة في قلب المجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين والمحقونة بالإنزيم المفصول في الغشاء البريتوني وبجرعة ٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان. أما في الكبد فقد لوحظ وجود تنكس فجوي وتثخن للمحفظة الكبدية نتيجة الاحتقان المزمن وكذلك انحلال في الأوعية الدموية عند المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين ١% مقارنة بمجموعة السيطرة، ولكن لوحظ تحسن واضح في الكبد عند المجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين والمحقونة بالإنزيم المفصول في الغشاء البيريتوني وبجرعة ٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان، وهذه النتائج تثبت دور الإنزيم المفصول في حماية الجسم من الكرب التأكسدي فاستخدام الإنزيم المفصول بإمكانه التقليل من حدة الأمراض المختلفة.

Biochemical and histopathological study of thioredoxin reductase isolation from blood serum in normal and oxidative stress-exposed rats

A.A. Hamdon[1] and L.A. Al-Helaly[2]

[1]Department of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, College of Veterinary Medicine,
[2]Department of Chemistry, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq
Email: [1] ahmadamera231@gmail.com, [2] luayhelaly@yahoo.com

Abstract

The study included investigation of effects of the thioredoxin reductase isolated from serum of human on oxidative stress induced in rats, through histopathological examination of the heart and liver, and the measurement of the biochemical parameters, which included: thioredoxin reductase, creatine kinase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total bilirubin, albumin and uric acid. Treating experimental animals with 1% hydrogen peroxide led to a significant increase in thioredoxin reductase, creatine kinase, aspartate aminotransferase and total bilirubin compared to control group, while a significant decrease in: albumin and uric acid, but non-significant in alanine aminotransferase. As well as, a different dose 2 and 4mgl Kg of rat body weight of isolated TrxR with 1% hydrogen peroxide improved parameter levels through decrease oxidative stress that induced in rats. The results of the histopathological examination revealed slight to moderate changes in the

heart, while no distinguishing changes were observed in the heart of the group treated with hydrogen peroxide and injected with enzyme in intraperitoneally with 4 mg/ kg of rat weight compared to control group. In the liver, there was observed vascular degeneration and thickening of hepatic capsule as a result of chronic congestion and degeneration in the blood vessels which after treatment with 1% hydrogen peroxide compared to control group, but there was noticeable improvement in the liver of group treated with hydrogen peroxide and injected with the enzyme in intraperitoneally with 4 mg/kg of rat weight, and these results confirm the role of the enzyme in the protection of the body from oxidative stress, the use of the enzyme can reduce the severity of different diseases.

***Keywords*:** Thioredoxin reductase, Rat, Oxidative stress, Heart, Liver
Available online at http://www.vetmedmosul.com

المقدمة

ينتمي إنزيم الثايرودكسين Thioredoxin reductase (TrxR) الى عائلة الفلافوبروتين-نيكلوتيد-البيريدين ثنائي الكبريت وهو إنزيم أكسدة واختزال يحفز اختزال الثايوردوكسين Thioredoxin (Trx) (ذو وزن جزيئي ١٢ كيلو دالتون) المعتمد على المرافق الإنزيمي NADPH، أفراد هذه العائلة هي دايمرات متجانسة Homodimers كل وحدة فرعية لها مجموعة FAD كمجموعة ترقيعيه Prosthetic group، موقع الارتباط ألـ NADPH وموقع ثنائي الكبريت في النهاية الأمينية وهو الجزء الفعال لعملية الأكسدة والاختزال (١).

إن زيادة الكرب ألتأكسدي Oxidative stress له علاقة واضحة بالأمراض المختلفة لدى الإنسان، فالكرب ألتأكسدي (الإجهاد ألتأكسدي) يعرف بأنه عدم التوازن بين المواد المؤكسدة (الجذور الحرة ونواتجها) ومضادات الأكسدة، إذ إن الخلايا تحتوي على مواد مؤكسدة أكثر من مضادات الأكسدة، وهذا بدوره يؤدي إلى تدمير الجزيئات الحيوية في الجسم مثل البروتينات والدهون والأحماض النووية، إذ يحدث الكرب التأكسدي عندما يتجاوز مستوى مركبات الأكسدة قدرة مضادات الأكسدة على إزالتها (٢).

يشارك إنزيم TrxR بوصفه مضادا للأكسدة من خلال اختزاله الثايوردوكسين المؤكسد وتحويله الى الشكل المختزل الفعال ليدخل في تفاعلات عدة منها مساهمة Trx في عملية إزالة بيروكسيد الهيدروجين من أوساط عدة وتحويله الى ماء عن طريق إنزيم الثايوردوكسين بيروكسيديز Trx peroxidase وكذلك استخدام Trx المختزل في عملية بناء الـ DNA بمساهمته في تفاعلات إنزيم رايبونيوكليوتيد ردكتيز Riboneucleotide reductase فضلا عن مساهمته مع عوامل الاستنساخ Transcription factor عند عملية استنساخ الجين Gene transcription لأداء مهام مختلفة داخل الجسم (٣).

فضلا عن ذلك فأن إنزيم TrxR له القدرة على اختزال عدد من المواد المؤكسدة مثل الكوينونات المؤكسدة Quinone's وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وبيروكسيدات الالكيل ROOH وذلك من خلال السيلينوسستين Selenocysteine عالي الفعالية (٤) ولإنزيم TrxR دور في الاختزال والإعادة Recycling للعديد من مضادات الأكسدة غير الإنزيمية كفيتامين C المؤكسد (ديهايدرو حامض الأسكوربك) وفيتامين E وحامض اللايبويك وبوجود الكلوتاثيون GSH يساهم في تنظيم الأكسدة والاختزال الخلوي Cellular redox (٥). فضلا عن ذلك فأن إنزيم TrxR يلعب دور مهم في الفسلجة المرضية للأمراض المزمنة مثل الروماتيز الرثوي Rheumatoid arthritis، العوز المناعي AIDS وبعض الأورام الخبيثة (٦)، وله دور مهم في تنظيم عمليات الأكسدة والاختزال داخل الخلية، نمو الخلية موتها المبرمج (٧). فضلا عن ذلك فان التداخلات السمية التي يمكن أن تنتج مركبات مؤكسدة مختلفة يمكن أن تزال باستخدام إنزيم الثايوردوكسين ردكتيز وهذا ما لاحظه Gencheva وأخرين (٨) عندما استخدموا أحد المركبات السامة مثل توكسوفلافين وحقنها في الفئران لوحظ أن للإنزيم القدرة على استخدامها كمادة أساس له واختزالها وبالتالي التقليل من عملية حدوث الكرب التأكسدي الذي ينشأ عن طريق التوكسوفلافين. يهدف هذا البحث الى دراسة تأثير إنزيم TrxR المفصول من مصل الدم على الجرذان الطبيعية أو المصابة بحالة الكرب التأكسدي من خلال قياس المتغيرات الكيموحيوية والفحص النسيجي.

المواد وطرائق العمل

فصل الإنزيم

بعد أن تم تحضير الإنزيم في دراسة سابقة من قبل الهلالي وحمدون (٩) والتي أجريت من خلال استخدام مصل دم ذكر سليم ظاهريا بعمر ٣٩ سنة غير مدخن وبعد التأكد من خلوه من أية إصابة مرضية من سكنة مدينة الموصل. وقد تمت عملية التنقية من خلال استخدام تقنيات حياتية مختلفة كالترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم وعملية الفرز الغشائي dialysis واستخدام عمودين من أعمدة الفصل، الأول كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي نوع سيفادكس G-50 والثاني نوع سيفادكس G-100 لفصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة فضلا عن استخدام المبادل الأيوني نوع DEAE-cellulose وذلك للحصول على نقاوة عالية للإنزيم وصلت الى ٢٨٩ مرة. ومن ثم استخدم هذا الإنزيم (٩) لدراسة تأثيره على الجرذان الطبيعية والمصابة بحالة الكرب التأكسدي.

حيوانات التجربة المستخدمة في عملية الحقن

استخدمت في هذه الدراسة ٢٤ ذكرا من ذكور الجرذان البالغة من نوع Albino male rats وبعمر ٤ أشهر وبأوزان تراوحت بين ٢٠٠-٣٥٠ غم تم تربية الحيوانات في غرفة خاصة تتوفر فيها الشروط الصحيحة لتربية الحيوانات من درجة حرارة وإضاءة وتهوية في الحقل التابع لكلية الطب البيطري /جامعة الموصل، وتم تغذيتها على عليقة قياسية وماء الشرب.

تقسيم الحيوانات

وزعت الحيوانات وفقا لوزنها إلى أربعة مجاميع وبواقع ست حيوانات لكل مجموعة وعوملت لمدة خمسة عشر يوما. المجموعة الأولى: تم إعطاؤها ماء الشرب الاعتيادي طيلة مدة التجربة وعدت مجموعة سيطرة. المجموعة الثانية: تم إعطاؤها ماء الشرب بواسطة القناني الخاصة والحاوي على ١% بيروكسيد الهيدروجين (١٠) طيلة مدة التجربة. المجموعة الثالثة: تم إعطاؤها ماء الشرب الحاوي على ١% بيروكسيد الهيدروجين وحقنت بالإنزيم TrxR المنقى في الغشاء البريتوني وبجرعة ٢ ملغم/ كغم من وزن الجرذان طيلة مدة التجربة (١١). المجموعة الرابعة: تم إعطاؤها ماء الشرب الحاوي على ١% بيروكسيد الهيدروجين وحقنت بالإنزيم TrxR المنقى في الغشاء البريتوني وبجرعة ٤ ملغم / كغم من وزن الجرذان طيلة مدة التجربة (١١).

جمع نماذج الدم من حيوانات التجربة

تم جمع نماذج الدم من مجاميع الحيوانات قبل المعاملة (الوقت صفر) وبعد سبعة أيام وكذلك بعد خمسة عشر يوما من المعاملة، إذ تم سحب الدم من وريد العين بواسطة أنبوبة شعرية تحتوي على الهيبارين غرست في الزاوية الداخلية لمحجر العين، إذ سمح للدم بالانسياب الى أنبوبة بلاستيكية جافة ونظيفة وبعدها ترك الدم ليتخثر ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٤٠٠٠ gx لمدة ١٥ دقيقة لفصل الجزء المتخثر عن مصل الدم (١٢)، إذ تم تقسيمه على جزئيين في أنابيب بلاستيكية صغيرة جافة ونظيفة وحفظ في درجة حرارة - ٢٠م° لحين استخدامه في قياس المتغيرات المحددة في البحث حيث تم قياس إنزيم ثايوردوكسين ردكتيز (١٣)، إنزيم كرياتين كاينيز (١٤)، إنزيم اسبارتيت امينوترانسفيريز (١٢)، إنزيم الالنين امينوترانسفيريز (١٢)، الألبومين (١٥)، حامض اليوريك (١٢)، والبليروبين الكلي (١٦).

إن المواد الكيميائية المستخدمة في قياس المتغيرات المختارة مجهزة من شركات عالمية مختلفة كما استخدمت عدد قياسية جاهزة من شركة BIOLABO الفرنسية لقياس إنزيم كرياتين كاينيز وإنزيم اسبارتيت امينوترانسفيريز وإنزيم الانين امينوترانسفيريز الألبومين وحامض اليوريك والبليروبين الكلي أما إنزيم ثايوردوكسين ردكتيز فقد استخدمت طريق يدوية لقياسه.

الفحص النسيجي

استخدمت طريقة الباحثين (١٧) للتثبيت واستخدم محلول مثبت fixation solution وهو محلول الفورمالين المنظم المتعادل بتركيز ١٠% neutral buffered formalin solution. تم أخذ قطع من نسيج القلب ونسيج الكبد من كل المجاميع بعد قتلها في نهاية المعاملة وتم تثبيتها بالمحلول المثبت (المحضر سابقا) ثم غسلت بالماء المقطر لإزالة المتبقي من المثبت بعدها مررت في سلسلة متدرجة في التركيز من الكحول الأثيلي ابتداء من ٧٠%، ٩٠%، ١٠٠% ثم تم إمرارها على محلول الزايلول بعدها تنقل الى شمع البرافين المنصهر لمدة نصف ساعة بعدها يتم صب القوالب الشمعية لتكون جاهزة للتقطيع في جهاز المشراح الدوار microtome إذ قطعت إلى شرائح نسيجية بسمك خمسة مايكروميترات وصبغت الشرائح بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين hematoxylin and eosin، ومن ثم تم عرض الشرائح النسيجية الناتجة على أطباء متخصصين في مختبرات مستشفى الزهراوي التعليمي في مدينة الموصل.

التحليل الإحصائي

تم استخدام البرنامج الإحصائي SPSS 10 لتحديد المعدل Mean والانحراف القياسي للمعدل Standard Deviation (SD)، وتم استخدام اختبار t للمقارنة بين متغيرين وإيجاد الاختلاف بين القيم التي ظهرت من خلال قيمة الاحتمالية والتي عُدت عند $p \leq 0.05$ اختلافاً معنوياً Significant وعند $p > 0.05$ اختلافاً غير معنوي، فضلا عن اختبار أنوفا ANOVA test (one way) للمقارنة بين أكثر من مجموعتين وإيجاد الاختلاف من خلال قيمة الاحتمالية كما ذكر أنفاً (١٨).

النتائج

توضح الجداول ١ - ٧ نتائج معاملة حيوانات التجارب خلال ثلاث فترات هي ٠ و٧ و١٥ يوم ببيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١% وكذلك معاملة بالإنزيم المفصول بجرع مختلفة ٢ و ٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان على مستويات إنزيم TrxR (الجدول ١)، إنزيم CK (الجدول ٢)، إنزيم AST (الجدول ٣)، إنزيم ALT (الجدول ٤)، الألبومين (الجدول ٥)، البليروبين الكلي (الجدول ٦) وحامض اليوريك (الجدول ٧). أشارت النتائج الموضحة في الجدول ١ إلى أن استخدام بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١% مع ماء الشرب أدى إلى انخفاض فعالية إنزيم TrxR بعد سبعة أيام من المعاملة وكذلك في المجموعة الثالثة ثم ارتفع بعد خمسة عشر يوما وفي جميع المعاملات.

أدت المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين لحيوانات التجربة إلى ارتفاع معنوي في فعالية إنزيم CK (الجدول ٢) في مدة المعاملة مقارنة مع نظيراتها في مجموعة السيطرة، وكذلك لوحظ ارتفاع معنوي في فعالية الأنزيم بعد سبعة أيام من المعاملة في المجموعتين الثالثة والرابعة.

أدت المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين لحيوانات التجربة الى ارتفاع معنوي في فعالية أنزيم AST (الجدول ٣) وكذلك في المجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين والأنزيم المفصول بجرعة ٢ ملغم/كغم من وزن الجرذان بعد ١٥ يوم من المعاملة في حين لوحظ ارتفاع معنوي في مستوى فعالية الأنزيم في المجموعة المحقونة بالأنزيم المفصول بجرعة ٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان بعد ٧ أيام من المعاملة. أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في فعالية أنزيم ALT (الجدول ٤) في المجموعتين المعاملتين ببيروكسيد الهيدروجين والأنزيم المفصول بجرعة ٢ملغم و ٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان بعد ١٥ يوما من المعاملة.

أدت معاملة حيوانات التجربة ببيروكسيد الهيدروجين إلى انخفاض معنوي في مستوى الألبومين في أوقات المعاملة ٧ و ١٥ يوما مقارنة مع نظيرتها في مجموعة السيطرة ولم يظهر هناك فرق معنوي واضح عند استخدام الإنزيم المفصول كجرع مع بيروكسيد الهيدروجين كما يلاحظ في (الجدول ٥).

في حين أدت المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين الى رفع مستوى البيليروبين الكلي، إذ أظهرت ارتفاع معنوي في مستواه بعد المعاملة لمدة ١٥ يوما مقارنة مع مجموعة السيطرة ولم يظهر هناك فرق معنوي واضح عند إستخدام الإنزيم المفصول كجرع مع بيروكسيد الهيدروجين كما يلاحظ من (الجدول ٦).

يلاحظ في (الجدول ٧) انخفاض معنوي في مستوى حامض اليوريك في مجموعة الحيوانات المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين في جميع أوقات المعاملة مقارنة مع نظيراتها في مجموعة السيطرة، وفي نفس الوقت عند استخدام الإنزيم المفصول كجرعة لوحظ أن هناك فرقا معنويا عند استخدام تركيز ٢ملغم /كغم وإرجاع القيمة الى مستوى أعلى لحامض اليوريك مقارنة بالمجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين.

الجدول ١: تأثير المعاملات المختلفة على فعالية إنزيم الثايوردوكسين ردكتيز (وحدة عالمية / مل) ×١٠-٥ للمجموعات المدروسة خلال أوقات معاملة ٠ و٧ و١٥ يوما في حيوانات التجارب

المعاملات	مجموعة بزمن صفر (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ٧ أيام (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ١٥ يوم (العدد =٦)		قيمة الاحتمالية
	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	
مجموعة السيطرة	a٦,٤٤	١,١٢	a٦,٧٤	١,٧١	a٥,٧٩	١,٢٥	٠,٦
بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١%	b ٥,٢٩	٠,٥٤	a١,٩٩	٠,٢٣	c٨,٣٥	٠,٦٣	**٠,٠٠٠١
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٢ ملغم / كغم	b٦,٧٤	١,٢٥	a٣,٦٨	٠,٤١	c٩,٨٠	٠,١٨	**٠,٠٠٠١
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٤ ملغم / كغم	a٤,٩١	٠,٤٧٥	b٥,٩٨	٠,٤١	c٨,٩	١,٠٨	**٠,٠٠١

اختلاف الأحرف أفقيا دلالة على أن هناك اختلاف معنوي. * فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P≤0.05.

** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P<0.001.

الجدول ٢: تأثير المعاملات المختلفة على فعالية إنزيم الكرياتين كاينيز (وحدة عالمية/لتر) للمجموعات المدروسة خلال أوقات المعاملة ٠ و٧ و١٥ يوما في حيوانات التجارب

المعاملات	مجموعة بزمن صفر (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ٧ أيام (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ١٥ يوم (العدد =٦)		قيمة الاحتمالية
	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	
مجموعة السيطرة	١٠,٨٣ a	٣,٢٥	a ١٢,٢	١,٧٣	a ١٤,٣٢	١,١٦	٠,١٤
بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١%	a ١٠,٦٧	٢,٧٢	b ٤٧,٧	٥,٧	b ٤٥,٥٥	٣,٤٤	*٠,٠٤
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٢ ملغم / كغم	a ١٠,٠٤	٢,٨٧	٢٢,٢١ b	٤,١	b ١٤,٤٤	٣,٤١	*٠,٠٤٣
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٤ ملغم / كغم	a ١١,٣٢	٣,٤١	b ٢٢,٢	١,٧٢	a ١٢,٢	١,٥٥	*٠,٠٤٦

اختلاف الأحرف أفقيا دلالة على أن هناك اختلاف معنوي. * فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P≤0.05.

الجدول ٣: تأثير المعاملات المختلفة على فعالية إنزيم AST (وحدة عالمية/لتر) للمجموعات المدروسة خلال أوقات المعاملة ٠ و٧ و١٥ يوما في حيوانات التجارب

المعاملات	مجموعة بزمن صفر (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ٧ أيام (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ١٥ يوم (العدد =٦)		قيمة الاحتمالية
	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	
مجموعة السيطرة	a ٦٢,١	٩,٤٩	a٥٩,٣٣	٧,٢٧٣	a ٦٢,١٣	٧,٦٥	٠,١٠٤
بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١%	a ٦٣,١	٦,١٣	a٦٦,٠٧	٨,٤٩	b ٧٤,٥٧	٥,٦٧	*٠,٠٥
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٢ ملغم / كغم	a ٦٤,١٧	٨,٥٨	a ٦٢,٠	٢,٧٨	b ٦٧,٣٣	٨,٩٥	٠,٥٩٧
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٤ ملغم / كغم	a ٥٧,٧	٨,٣٢	b ٦٢,٩٣	٦,١٧	a ٥٠,٩	٣,٩٥	*٠,٠١٨

اختلاف الأحرف أفقيا دلالة على أن هناك اختلاف معنوي. * فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P≤0.05.

الجدول ٤: تأثير المعاملات المختلفة على فعالية إنزيم ALT (وحدة عالمية / لتر) للمجموعات المدروسة خلال أوقات المعاملة ٠ و٧ و١٥ يوما في حيوانات التجارب

المعاملات	مجموعة بزمن صفر (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ٧ أيام (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ١٥ يوم (العدد =٦)		قيمة الاحتمالية
	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	
مجموعة السيطرة	a ٤٠,٣٧	٢,٤٣	a ٣٩,٨٣	٢,٠١	a ٤٠,٢٦	٠,١٣	٠,١٢٩
بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١%	a ٤١,٤	١,٣٥	a ٤٢,٤٧	٦,٣١	a ٤٣,٣٧	٤,٢١	٠,٦
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٢ ملغم / كغم	c ٢,٠٠	٤,٩٥	b ٣٩,٣٨	٠,٧٦	a ٣٦,١٣	١,٦١	*٠,٠١٥
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٤ ملغم / كغم	b ٤٢,٢٣	٤,٧١	a ٣٩,٤	١,٢٩	a ٣٦,٩٣	١,٥	*٠,٠٢٤

اختلاف الأحرف أفقيا دلالة على أن هناك اختلاف معنوي. * فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P≤0.05.

الجدول ٥: تأثير المعاملات المختلفة على مستويات الألبومين (غم/١٠٠ مل) للمجموعات المدروسة خلال أوقات المعاملة ٠ و٧ و١٥يوما

المعاملات	مجموعة بزمن صفر (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ٧ أيام (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ١٥ يوم (العدد =٦)		قيمة الاحتمالية
	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	
مجموعة السيطرة	a٧,١٦٧	٠,٩	a ٦,٩	٠,٥	a ٧,٤٨	٠,٣٥	٠,٢٩٣
بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١%	c ٧,٤٢	٠,٥٤	b ٦,٣٧	٠,٤٨	a ٥,٢	٠,٤	*٠,٠٣٦
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٢ ملغم / كغم	a ٦,٨٣	١,١٢	a ٦,٥٤	٠,١٧	a ٧,٣٥	٠,٥٩	٠,١٩
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٤ ملغم / كغم	a ٦,٧٦	٠,٩٥	a ٦,٩١	٠,٣٦٨	a ٧,١٧	٠,٢٣٢	٠,٥٢

اختلاف الأحرف أفقيا دلالة على أن هناك اختلاف معنوي. * فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P≤0.05.

الجدول ٦: تأثير المعاملات المختلفة على مستويات البليروبين الكلي (ملغم/١٠٠ مل) للمجموعات المدروسة خلال أوقات المعاملة ٠ و٧ و١٥ يوماً في حيوانات التجارب

المعاملات	مجموعة بزمن صفر (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ٧ أيام (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ١٥ يوم (العدد =٦)		قيمة الاحتمالية
	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	
مجموعة السيطرة	a ٠,٣٨	٠,٠١١	a ٠,٣٨	٠,٠١٢	b ٠,٣٦	٠,٠٤	٠,١٢
بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١%	a ٠,٢٧	٠,٠٣	a ٠,٢٥	٠,٠١٧	b ٠,٤٣	٠,٠٤٩	*٠,٠٣٣
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٢ ملغم / كغم	a ٠,٢٦	٠,١٦	a ٠,٣١٣	٠,٠٢	a ٠,٢٢	٠,٠٢٣	٠,٢٥٣
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٤ ملغم / كغم	a ٠,٤٥	٠,٠٣٦	a ٠,٢٥	٠,٠١١	a ٠,٢٥	٠,٠٤	٠,٢٤٧

اختلاف الأحرف أفقيا دلالة على أن هناك اختلاف معنوي. * فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P≤0.05.

الجدول ٧: تأثير المعاملات المختلفة على مستويات حامض اليوريك (ملغم/١٠٠ مل) للمجموعات المدروسة خلال أوقات المعاملة ٠ و٧ و١٥ يوماً في حيوانات التجارب

المعاملات	مجموعة بزمن صفر (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ٧ أيام (العدد =٦)		مجموعة بعد مرور مدة ١٥ يوم (العدد =٦)		قيمة الاحتمالية
	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	المعدل	الانحراف القياسي	
مجموعة السيطرة	a ٨,٠٧	٠,٨٣٦	a ٨,١٢	٠,٩٧	a ٩,٧٦	٢,٩٤	٠,٢٣
بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ١%	c ٨,٢	٠,٢٣	a ٤,٦٤	٠,٤	b ٥,٤٢	٠,٢٥	**٠,٠٠٠١
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٢ ملغم / كغم	c ٨,٤٦٧	١,٠٦	a ٤,٤٦	٠,٣٣	b ٦,٣٣	٠,٤٦	**٠,٠٠٠١
بيروكسيد الهيدروجين ١% وكذلك الإنزيم TrxR بجرعة ٤ ملغم / كغم	a ٧,٣٥	٠,٥٠٥	a ٦,٥٨	٠,٥٢	a ٦,٩٦	٠,٢٧	٠,٧٢٥

اختلاف الأحرف أفقيا دلالة على أن هناك اختلاف معنوي. ** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى P<0.001.

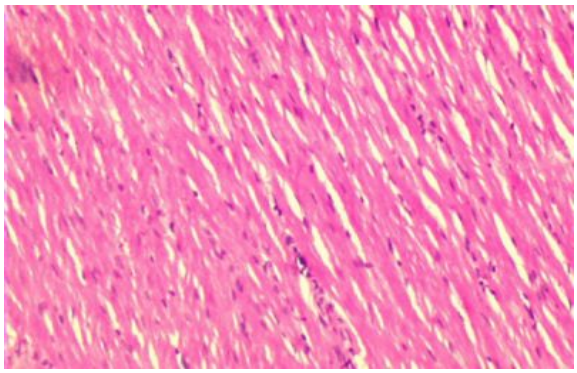
نتائج الفحص النسيجي

أظهرت نتائج الفحص النسيجي وجود تغيرات مرضية خفيفة إلى متوسطة في القلب عند المجاميع المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين ١% ولمدة ١٥ يوماً مقارنة بمجموعة السيطرة (الشكل١)، إذ أظهرت المجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين وجود انتفاخ طفيف في الألياف العضلية القلبية، واختفاء جزئي في بعض الخطوط المستعرضة، وتفجي طفيف في سايتوبلازم الألياف العضلية، فضلا عن ارتشاح طفيف للخلايا اللمفية بين الألياف العضلية (الشكل ٢). ولوحظ تثخن في جدران الاوعية الدموية لنسيج قلب جرذي معامل ببيروكسيد الهيدروجين ١% ومحقون بالإنزيم المفصول بجرعة ٤ ملغم /كغم لمدة ١٥ يوما (الشكل٣). اما في الكبد فقد لوحظ وجود تنكس فجوي Vascular degeneration عند المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين ١ % مقارنة بمجموعة السيطرة (الشكلين ٤ و ٥). في حين قل التنكس الفجوي في نسيج الكبد لجرذي معامل ببيروكسيد الهيدروجين ١% ومحقون بالإنزيم المفصول بجرعة ٤ ملغم /كغم لمدة ١٥ يوما (الشكل ٦).

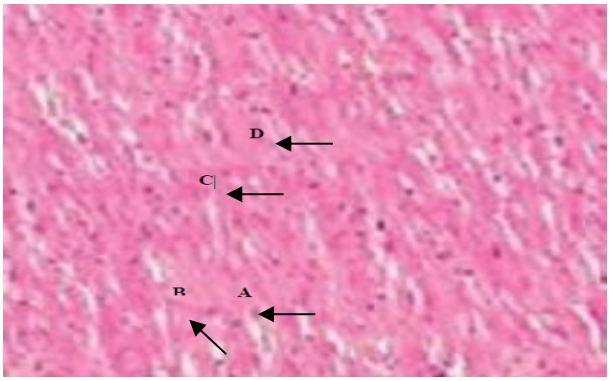
المناقشة

يعد نظام الثايوردوكسين واحدا من أهم الأنظمة المنظمة للأكسدة والاختزال داخل الخلية (١٩) وله دور عال في المحافظة على حالة الجسم من الكرب التأكسدي. وان انخفاض قيمة فعالية الإنزيم بعد مرور ٧ أيام من المعاملة يدل على استهلاك الإنزيم لاستخدامه كمضاد أكسدة في إنتاج الثايوردوكسين الذي يحتاجه الجسم لإزالة الأكسدة ولكن بعد مرور ١٥ يوما من المعاملة زادت فعالية الإنزيم لتكيف الجرذان مع جرع بيروكسيد الهيدروجين. إذ إن من التفاعلات المهمة التي تعكس فعالية إنزيم

TrxR (٢٠) دوره في إزالة بيروكسيد الهيدروجين مباشرة (٢١،٢٠) وله دور غير مباشر في المحافظة على الصيغة المختزلة للعديد من البروتينات وذلك بإعادة الثايوردوكسين الى صيغته المختزلة (٢٢) واستخدامه في تحسين حالة الأكسدة التي حدثت لدى الحيوان.

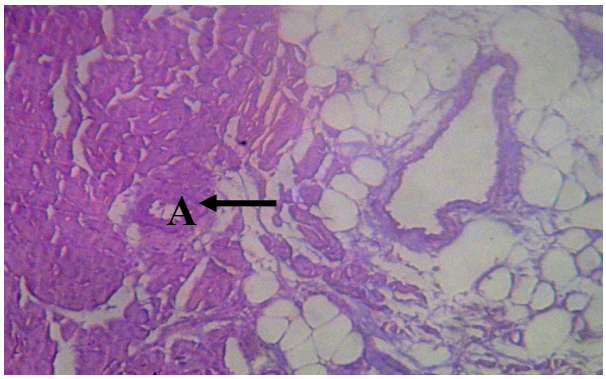


الشكل ١: مقطع عرضي لنسيج قلب الجرذي بدون أي معاملة. ملون الهيماتوكسيلين والايوسين، ١٦٥×.

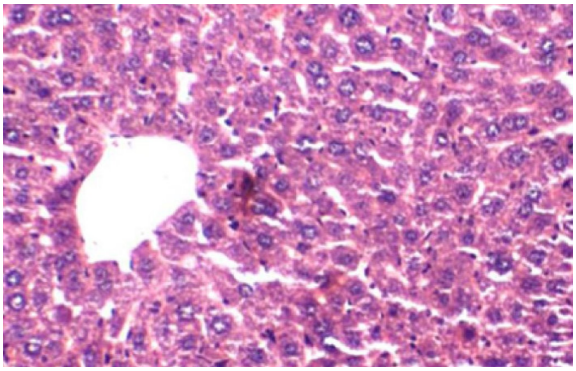


الشكل ٢: مقطع عرضي لنسيج قلب الجرذي معامل ببروكسيد الهيدروجين ١% لمدة ١٥ يوماً، إذ يلاحظ انتفاخ طفيف في الألياف العضلية القلبية (A)، مع اختفاء جزئي للخطوط المستعرضة (B)، وتفجي طفيف في سايتوبلازم الألياف العضلية (C) فضلاً عن ارتشاح طفيف للخلايا اللمفية بين الألياف العضلية (D). ملون الهيماتوكسيلين والايوسين، ١٦٥×.

أشارت دراسة للباحث Kunihis وأخرين (٢٣) إلى أن هناك زيادة في فعالية إنزيم TrxR في دم الأشخاص المصابين بارتفاع مستوى البروتين الدهني واطئ الكثافة LDL مع ارتفاع مستوى Trx المختزل ولوحظت نفس النتيجة في تجارب الحيوانات المختبرية في الأرانب المصابة بارتفاع LDL في الدم (٢٤). وقد أشار الباحث Furman وأخرين (٢٥) إلى أن البروتين الدهني واطئ الكثافة الذي عانى من عملية الأكسدة ox-LDL يزيد من عملية استنساخ إنزيم TrxR في الخلايا البلعمية الأحادية المشتقة لدى الإنسان Human monocytes-derived macrophages، وأثبتت هذه الدراسة أيضا بأن إنزيم TrxR وTrx تعمل بتناسق كميكانيكيات دفاعية مضادة للأكسدة في تصلب الشرايين فالصيغة المختزلة للـ Trx هي التي تعكس فعالية إنزيم TrxR.



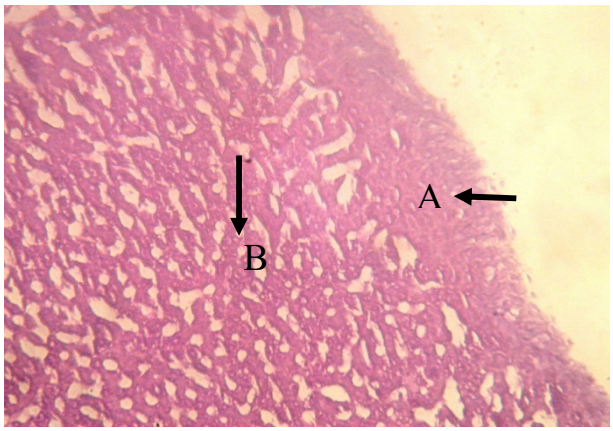
الشكل ٣: مقطع عرضي لنسيج قلب الجرذي معامل ببيروكسيد الهيدروجين ١% ومحقون بالإنزيم المفصول بجرعة ٤ ملغم/كغم لمدة ١٥ يوما، (A) يوضح تثخن جدران الأوعية الدموية. ملون الهيماتوكسيلين والايوسين، ١٦٥×.



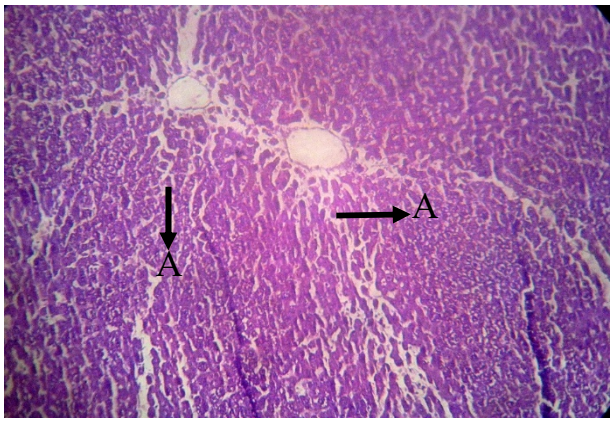
الشكل ٤: مقطع عرضي لنسيج كبد الجرذي بدون أي معاملة. ملون الهيماتوكسيلين والايوسين، ١٦٥×.

وقد بينت دراسة أجراها Tripathy وأخرين (٢٦) على الفئران المصابة بطفيلي الملاريا التي تؤدي الى تكوين جذر السوبر أوكسيد السالب أن هناك زيادة في فعالية إنزيم TrxR بعد خمسة عشر يوما من الإصابة مقارنة بمجموعة السيطرة. وذكر Haendeler وأخرين (٢٧) بأن بيروكسيد الهيدروجين يزيد من استنساخ الثايوردوكسين في الخلايا البطانية للأوعية والعضلة القلبية فالتراكيز القليلة من البيروكسيد تحمي الخلايا البطانية من الموت المبرمج وذلك بتحفيز استنساخ الثايوريدوكسين بينما تستنفذ التراكيز العالية منه خزين الثايوريدوكسين للخلايا البطانية

وتحث الموت المبرمج للخلايا البطانية. وفي دراسة Augusti وأخرين (٢٤) بينت العلاقة بين فعالية إنزيم سوبر أوكسيد ديسميوتيز SOD وإنزيم TrxR لوحظ دور إنزيم TrxR في إزالة H_2O_2 الناتج من إنزيم SOD إذ يعمل إنزيم SOD على تحول جذرين من السوبر أوكسيد السالب الى بيروكسيد الهيدروجين.



الشكل ٥: مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذي معامل ببيروكسيد الهيدروجين ١% ١٥ يوما، إذ يلاحظ أن هناك (A) تثخين للمحفظة الكبدية، و (B) تنكس فجوي. ملون الهيماتوكسيلين والايوسين، ١٦٥×.



الشكل ٦: مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذي معامل ببيروكسيد الهيدروجين ١% ومحقون بالإنزيم المفصول بجرعة ٤ ملغم / كغم لمدة ١٥ يوماً، (A) إذ يلاحظ تنكس فجوي ولكن بشدة أقل. ملون الهيماتوكسيلين والايوسين، ١٦٥×.

أوضحت دراسة بأن Trx يفرز الى البلازما استجابة دفاعية ضد الكرب التأكسدي ومن المقترح بانه يحث بواسطة سايتوكينات الالتهابات (٢٨). أوضحت دراسة أيضا دور Trx وبأن إعطاءه قبل إعادة التروية Reperfusion له تأثير في حماية عضلة القلب من التلف الناتج بعد نقص وإعادة التروية (٢٩)، وأشار Tao وأخرين (١١) بأن المعالجة بـ Trx تختزل المحتوى الناتج من عملية الأكسدة بفعل أصناف النيتروجين الفعالة وهو نايتروتايروسين Nitrotyrosine في نسيج عضلة القلب في حالة نقص التروية/ وإعادة التروية Ischemic /Reperfusion ومن المقترح بأن Trx يظهر تأثيره كمضاد للموت المبرمج Anti-apoptotic عن طريق تأثيراته كمضاد لحالة الكرب التأكسدي الناتج عن أصناف النايتروجين الفعالة Anti-nitrosative stress.

أن استحداث الكرب التأكسدي بواسطة بيروكسيد الهيدروجين عن طريق ماء الشرب أدى الى ارتفاع معنوي في فعالية أنزيمات CK, ALT, AST مما أدى الى ضرر في أنسجة الجسم منها الكبد والخلايا البطانية للأوعية والعضلة القلبية. فأدى إلى تحرر هذه الإنزيمات الى الدم، ولكن عند استخدام جرع الإنزيم مع بيروكسيد الهيدروجين يمكن أن يقلل من حالة الكرب التأكسدي، وهذه إشارة واضحة على أن إنزيم TrxR المفصول عمل على إعادة توازن الجسم لمستوى الإنزيمات الطبيعية مما يدل على إعادة تصليح الأنسجة التي تتحرر منها تلك الإنزيمات، إذ أشار Arun وأخرين (٣٠) إلى أن ذكور الفئران المعرضة للإشعاع المسبب للموت المبرمج في أوقات مختلفة أدت إلى تحرر الإنزيمات من الكبد، أما ميكانيكية تحرر هذه الإنزيمات هي نتيجة لتلف غشاء الخلية فتقل فعاليتها في الكبد وتزداد في الدم (٣١). ولوحظت النتائج نفسها مع فعالية إنزيم CK في الدم والعضلات الهيكلية (٣٢). أما نتيجة Tripathy وأخرين (٢٦) فقد لاحظوا أن تكون جذر سوبر أوكسيد السالب $O_2^{\bullet-}$ في الفئران المصابة بطفيلي *Plasmodium berghei* تعمل على زيادة مستوى إنزيمي ALT وAST بعد ١٠ أيام من الإصابة وهذا يدل على تلف الخلايا الكبدية وتحرر هذه الإنزيمات.

يعود انخفاض مستوى الألبومين في مصل الدم الى دوره كمضاد للأكسدة في حالة زيادة الكرب التأكسدي الناتجة من بيروكسيد الهيدروجين، إذ يعد الألبومين من أكثر المركبات البروتينية المنتشرة في الدم، وتشير البحوث إلى أن التركيز العالي للألبومين هو نتيجة التأثير الوقائي لجزيئة الألبومين من خلال عمله كمضاد للأكسدة، عن طريق ارتباطه بالحوامض الدهنية الحرة فضلاً عن قدرته على الارتباط مع المركبات الأخرى مثل العناصر المعدنية التي تكون مشحونة بالشحنة الموجبة (١٢)، وبسبب كونه منتشراً داخل بلازما الدم الذي يكون معرضاً للإجهاد التأكسدي المستمر لذلك فأن التأثير الكمي لجزيئة الألبومين قد يلعب دوره في كونه مانع أكسدة جيد (٣٣). أما ارتفاع مستوى البيليروبين الكلي نتيجة إنتاجه في جسم الحيوان للحماية ضد العديد من الأمراض الناتجة من الكرب التأكسدي منها تصلب الشرايين، وأمراض القلب التاجية وأمراض الالتهابات (٣٤،٣٥).

بينت دراسة Chan وأخرين (٣٦) بأن المستويات العالية من البيليروبين لها علاقة في انخفاض حالة الالتهابات كذلك ارتفاع مستوى البيليروبين غير المقترن أيضا له علاقة في خفض

الالتهابات وذلك عن طريق خفض مستوى انترلوكوين -6 (IL-6) (٣٧)، وحديثا بينت الدراسات أن الارتفاع المعتدل في مستوى البيليروبين غير المقترن يؤخر تكون لويحات تصلب الشرايين وذلك بإعاقة تكوين الخثرة Thrombus من خلال منع حث الكولاجين لتجمع الصفائح (٣٨).

يلاحظ انخفاض معنوي في مستوى حامض اليوريك في مجموعة الحيوانات المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين في جميع أوقات المعاملة مقارنة مع نظيرتها في مجموعة السيطرة إذ يعتبر حامض اليوريك من مضادات الأكسدة داخلية المنشأ له دور الحماية ضد أمراض الأوعية القلبية والسرطانات في الإنسان (٣٩)، إذ يقوم حامض اليوريك بكسح الجذور الحرة وبذلك تزداد القدرة الدفاعية لمضادات الأكسدة في المصل ويحمي من خطر الإصابة بالكرب التأكسدي (٤٠) وله القابلية على تثبيط عملية بيروكسدة الدهون وذلك عن طريق ارتباطه مع الحديد والنحاس اللذين يشاركان في تكوين الأكسدة من خلال تفاعل فينتون ومن ثم يثبط عملية تكوين الجذور الحرة (٤١). ويسبب الكرب التأكسدي المحدث بواسطة بيروكسيد الهيدروجين في إضعاف قابلية الأنظمة الدفاعية المضادة للأكسدة في الدم من خلال تقليل مستوياتها مثل حامض اليوريك. وقد إشارات دراسة حديثة الى أن الثايوروردوكسين الناتج من الإنزيم TrxR له دور عالي في تقليل حالة الكرب التأكسدي للجرذان وبالتالي التقليل من الإصابة من بعض الأمراض مثل مرض السكري (٤٢).

وأوضحت دراسة Tao وأخرين (١١) من خلال التجارب المختبرية بأن المعالجة بال Trx المختزل لها دور مهم في حماية العضلة القلبية من الموت المبرمج المستحث بالكرب النايتروسي Nitrostive stress الناتج بعد نقص التروية Post-ischemic وذلك عن طريق حث واستنساخ إنزيم سوبر أوكسيد ديسميوتيز نوع mSOD وتقليل محتوى ($O_2^{\bullet-}$) فضلا عن تثبيط تكوين جذر أوكسيد النيتريك ومن هذا يتبين بان نظام الثايوردوكسين TrxR (NADPH Trx) فضلا عن إنزيم الثايوردوكسين بيروكسديز له دور مهم في المحافظة على الوظيفة الفسيولوجية للأوعية الدموية القلبية فضلا عن حماية الخلايا من الضرر التأكسدي في الحالات المرضية المختلفة بينما الجرعة العالية من Trx تزيد من حجم احتشاء عضلة القلب (٤٣).

أما بالنسبة للتغيرات المرضية الطفيفة في نسيج القلب فسببها أن لبيروكسيد الهيدروجين القابلية على تحطيم جدران الخلايا مما يساعد في تحرير العديد من الوسائط الكيميائية والتي بدورها تعمل على جذب الخلايا الالتهابية في منطقة الأذى، في حين لم يلاحظ وجود تغييرات مرضية مميزة عن مجموعة السيطرة في قلب المجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين والمحقونة بالإنزيم المفصول في الغشاء البريتوني وبجرعة ٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان عدا وجود تثخن طفيف في جدران الشرايين الدقيقة في العضلة القلبية الشكل (٣). إذ لقد وجد حديثا أن عملية الكرب التأكسدي وحدوث موت الخلايا يمكن أن يقل بعملية زيادة إنتاج إنزيم ثايوردوكسين ردكتيز وعلى العكس فان عملية الكرب تزداد مع قلة التمثيل الجيني لعملية تكوين الإنزيم (٤٤) بينما لوحظ وجود تنكس وعائي في نسيج الكبد عند المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مقارنة بمجموعة السيطرة وسببه فشل الخلية الكبدية في إنتاج البروتينات الحاملة للدهون فتترسب في سايتوبلازم الخلية فتظهر على شكل تنكس فجوي دهني ويعزى هذا إلى اضطراب الأيض الخلوي ولوحظ أيضا تثخين للمحفظة الكبدية نتيجة الاحتقان المزمن وكذلك انحلال في الأوعية الدموية ولوحظ تنكس وعائي في المجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين والمحقونة بالإنزيم المفصول في الغشاء البيريتوني وبجرعة ٤ ملغم/كغم من وزن الجرذان، ولكن بشدة أقل عند مقارنتها مع المجموعة المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين، وهذه النتائج تثبت دور الإنزيم المفصول في حماية الجسم من الكرب التأكسدي. إذ كما أشرنا سابقا أن الكرب التأكسدي أحد العوامل التي تعمل على حدوث أمراض عديدة من ضمنها مرض الزهايمر Alzheimer وتصلب الشرايين Atherosclerosis ومرض عجز القلب (٤٥) فاستخدام الإنزيم المفصول بإمكانه التقليل من حدة الأمراض المختلفة والقضاء عليها. إذ يلعب الثايوردوكسين الناتج بشكل رئيس من الإنزيم دور مهم كمضاد للأكسدة في حماية الأعصاب من التلف الناتج عن الكرب التأكسدي والذي لوحظ من خلال حقن الجرذان بالثايوردوكسين والذي لوحظ انه يعمل على تقليل الأكسدة ويحافظ على الخلايا العصبية الدماغية مع تحفيز إنزيم البيروكسي ردوكسين Peroxiredoxin في حماية الدماغ.

المصادر

1. Arscott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams CH. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanism of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;15;94(8):3621-3626. doi:10.1073\pnas.94.8.3621.
2. Al-Dalaen SM, Al-Qtaitat AI. Oxidative stress versus antioxidants. J Biosci Bioengen. 2014;2(5):60-71. doi:10.116-48\j.bio.20140205.11.
3. Hashemy S, Ungerstedt J, Zahedi AF, Holmgren A. Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. J Biol Chem. 2006;281(16):10691-7. doi: 10.1074\jbs.M511373200.
4. Ceans N, Nivinskas H, Anusevicius Z, Sarlauskas J. Interaction of quinines with thioredoxin reductase: A challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein. J Biol Chem. 2004;279:2583-2592. doi: 10.1074/jbc.M310292200.
5. Nordberg H, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Rad Biol Med J. 2001;31:11,1287-1312. doi: 10.1016\s0891-5849(01)00724-9.
6. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. Biochem. 2000;267:6102. doi:10.1042\bj3460001.
7. Arner ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. Seminar Caner Biol. 2006;16(6):420-6. doi: 10.1016\j.semcancer.2006.10.009.
8. Gencheva R, Cheng Q, Arnér ESJ. Efficient selenocysteine-dependent reduction of toxoflavin by mammalian thioredoxin. Biochim Biophys Acta. 2018;S0304-4165:30146-6. doi:10.106\J.bbagen.2018.05.014
9. Al-Helaly LA, Hamdoon AA, Biochemical and kinetic study for partial purified Thioredoxin reductase from healthy human serum. Tikrit J Pure Sci. 2017;22(10):116-131. doi:10.25130\j.v22:10.704.

10. Al-Saidya AMA. Study of pathological and antihyperlipidemic effects of ginger *Zingiber officinalae* in rats exposed to oxidative stress. Iraqi J Vet Sci. 2010;24(2):103-108. DOI: 10.33899/ijvs.2010.5596
11. Tao L, Gao E, Hu A, Colettic C, Wang Y, Chirstopher TA, Lopez BL, Kocch W, Ma XL. Thioredoxin reduce post-ischemic myocardial apoptosis by reducing oxidative/ nitrative stress. Bri J Pharmacol. 2006;149(3):311-318. doi: 10.1038\sj.bjp.0706853.
12. Burtit CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th ed. USA: Saunders; 2012. 2256 p.
13. Arner ES, Zhong LA, Lester P. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods Enzymol. 1999;300:226-239. doi:10.1016\s0076-6879(99)00129-9.
14. Sanhai WR, Christenson RH. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4th ed. USA: Kaplan; 2003. 1211 p.
15. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chem Acta.1971;31:87-96. doi:10.1016\0009-8981(71)90365-2.
16. Walters M, Gerarde H. An ultramicromethod for the determination of conjugated and total bilirubin in serum or plasma. Microchem J. 1970;15:231-243. doi: 10.1016\0026-265x(70)90045-7.
17. Bancroft JD, Cook HC. Manual of histological techniques. New York: Churchill Livingston; 1984. 274 p. doi:10.1002/path.1711450410.
18. Hinton PR. Statistics explained. 2nd ed. USA: Routledge; 2004. p 85.
19. Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin system. Antioxid Redox Signal. 2000;2:811-820. doi:10.1089\ars.2000.2.4-811.
20. Lixa L, Nordman T, Olsson JM, Damdimopoulos A, Bjorkhem L, Nalvarte I, Eriksson C, Arner ESJ, Spyrou, G, Bjornstedt M. The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduce ubiquinone: A novel mechanism for defense against oxidative stress. J Biol Chem. 2003;278:2141-2146. doi:10.1074\jbc.n210456200.
21. Mitsui A, Hirakawa T, Yodoi J. Reactive oxygen-inducing and protein-refolding activities of adult T-cell leukemia-derived factor / human thioredoxin. Biochem Biophys Res Commun. 1992;186:1220-1226. doi:10.1016\s0006-291x(05)81536-0.
22. Arner ESH, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem. 2000;267:6102-6109. doi:10.1046\j.1432-1327.2000.01701.x.
23. Kunihisa M, Chiharu K, Nakamura H, Makita T, Ishii K, Okuda N, Yodoi J, Sasayama S. Serum thioredoxin and α-tocopherol concentrations in patients with major risk factor. Circ J. 2005;69:291-294. doi:10.1253\circj.69.291.
24. Augusti PR, Ruviaro AR, Quatrin A, Somacal S, Conterato GMM, Vicentini JT, Duarte MMF, Emanuelli T. Imbalance in superoxide dismutase/ thioredoxin reductase activities in hypercholesterolemic subjects: Relationship with low density lipoprotein oxidation. Lipids Heal Dis. 2012;11:79. doi:10.1186\1476-511x-11-79.
25. Furman C, Rundlof AK, Larigauderie G, Jaye M, Bricca G, Copin C, Kandoussi AM, Fruchart JC, Arner ES, Rouis M. Thioredoxin reductase is upregulated in atherosclerotic plaques specific induction of the promoter in human macrophages by oxidized low-density lipoproteins. Free Radic Biol Med. 2004;37:71-85. doi:10.1916\j.freeradbiomed.2004.04.016.
26. Tripathy S, Chakraborty SP, Roy S. Superoxide radical generation mediated plasmodium bergheri infection in Swiss mice. Al Ameen J Med Sci 2012;5(1):69-81.
27. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. FEBS Lett. 2004;577:427-33. doi:10.1016\j.febslet.2004.10.041.
28. Kaghad M, Dessarps F, Jacquemin H, Caput D, Fradelizi D, Wollman EE. Genomic cloning of human thioredoxin –encoding gene: mapping of the transcription starts points and analysis of the promoter. Gene. 1994;140:273-278. doi:10.1016\0378-1119(94)90557-6.
29. Tao L, Gao E, Bryan NS, Qu Y, Liu HR, Hu A. Cardioprotective effects of thioredoxin in myocardial ischemia and reperfusion, role of S-nitrosation. Proc Natl Acad Sci. 2004;101:11471-11476. doi:10.1073\pnas.0402941101.
30. Arun P, Oguntayo S, Nambiar MP. Rapid Release of Tissue Enzymes into Blood after Blast Exposure: Potential Use as Biological Dosimeters. PLoS ONE. 2012;7(4): e33798. doi:10.1371\journal.pone.0033798
31. Shahshahani MM, Azizahari S, Soori T, Manavi S, Balighi K. Hepatotoxicity and liver enzyme alteration in immunosuppressive therapy. J Dermatol. 2011;38:1153-7. doi:10.1111\j.1346-8138.2011.01278.x.
32. Bassit RA, Pinheiro CH, Vitzel KF, Sproesser AJ, Silveira LR. Effect of short-term creatin supplementation on markers of skeletal muscule damage after strenuous contractile activity. Eur J App Physiol. 2011;108:945-955. doi.org/10.1007/s00421-009-1305-1
33. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. FASEBJ. 1999;13(2):233-244. doi: 10.1096/fasebj.13.2.233
34. Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner K.H. Bilirubin and beyond a review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. Prog Lipid Res. 2013;52(2):193-205. doi: 10.1016/j.plipres.2012.11.001
35. Jangi S, Otterbein L, Robson S. The molecular basis for the immune modulatory activities of unconjugated bilirubin. Inter J Bioch Cell Biol. 2013;45(12):2843-2851. doi;10.1016\j.biocel.2013.09.014.
36. Chan KH, Oconnell RL, Sullivan DR. Plasma total bilirubin levels predict amputation events in type 2 diabetes mellitus: The Fenofibrate intervention and event lowering in diabetes (FIELD) study. Diabetologia. 2013;56(4):724-736. doi: 10.1007/s00125-012-2818-4
37. Wallner M, Bulmer AC, Molzer C. Haem catabolism: A novel modulator of inflammation in Gilbert's syndrome. Eur J of Clin Invest. 2013;43(9):912-919. doi:10.1111\eci.12120.
38. Kundur AR, Bulmer AC, Singh I. Unconjugated bilirubin inhibits collagen induced platelet activation. Platelets. 2014;25(1):45-50. doi:10.3109\09537104.2013.764405.
39. Palmer TM, Nordestgarad BG, Benn M, Hansen AT, Smith GD, Lawlor DA, Timpson NJ. Association of plasma uric acid with ischaemic heart disease and blood pressure mendelian randomization analysis of two large Cohorts. BMJ. 2013;347:f4262. doi:10.1136\bmj.f4262
40. Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SRJ. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. Clin Sci. 2003;105:425-430. doi:10.1042\cs20030149.
41. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals and antioxidant in the year 2000. A historical look to the future. Ann NY Acad Sci. 2000;899:136-147. doi:10.1111\j.1749-6632.2000.tb06182x.
42. Hong L, Changqing X, Quanfeng L, Xiuxiang G, Erkio S. Thioredoxin 2 Offers Protection against Mitochondrial Oxidative Stress in H9c2 Cells and against Myocardial Hypertrophy Induced by Hyperglycemia. Int J Mol Sci. 2017;18:1-10. doi: 10.3390\ijms18091958.
43. Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC. Thioredoxin a key regulator of cardiovascular homeostasis. Circ Res. 2003;93:1029-1033. doi:10.1161\01.RES.0000102869..39150.23.
44. Zhu W, Wang XR, Du S.Q, Yan CQ, Yang N, Lin LL, Shi GX, Liu CZ. Anti-oxidative and Anti-apoptotic Effects of Acupuncture: Role of Thioredoxin-1 in the Hippocampus of Vascular Dementia Rats. Neurosci. 2018;21:281-291. doi:10.1016\j.neuroscience.2018.03.29.Epup.
45. Mahmood DFD, Abderrazak A, El Hadri K, Simmet T, Rouis M. The Trx-system as therapeutic target in human health and disease. Antioxid Redox Signal. 2013;19(11):1266-303. doi:10.1089\ars.2012.4757.