تأثير الكحول الاثيلي في مستوى حامض السياليك في مجانس دماغ ومصل دم ذكور الجرذ البيض

لندا صلاح الدين فوزي * نظيرعبود فزع **

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٤/١٢/٢٦

الخلاصة

تم دراسة تأثير التجريع بالايثانول في المحتوى الكلي لحامض السياليكTotal sialic acid (TS A) و حامض السياليك المرتبط بالدهون Lipid bound sialic acid (LBSA) في مصل دم ومجانس دماغ ذكور الجرذ البيض . تضمنت الدراسة تجريع 20 حيوان من ذكور الجرذ البيض بالايثانول يوميا ولمدة اربعة اسابيع وبتراكيز 20 %، 30 %، 40 %، 50 % وبحجم جرعة (5 مل) . أظهرت نتائج الدراسة ان مستويات TSA في مجانس الدماغ ومصل الدم تنخفض انخفاضا معنويا ($P < 0.001$) عند استخدام التراكيز المختلفة من الايثانول مقارنة بمجموعة السيطرة وان مقدار الانخفاض يعتمد على تركيز الايثانول المستخدم ، وقد كان الانخفاض اكثر شدة عند استخدام تركيز 40 % ، واشارت نتائج الدراسه الى وجود علاقه معنويه $p<0.01$ ذات معامل ارتباط (0.799) بين انخفاض TSAفي مجانس الدماغ ومصل الدم . كما اوضحت النتائج ان محتوى LBSA ينخفض انخفاضا معنويا($P < 0.001$) في مجانس الدماغ عند استخدام التراكيز المختلفة من الايثانول وان هذا الانخفاض كان اكبر عند مقارنته مع الانخفاض في LBSA مصل الدم.

المقدمة

يعد الإدمان على الكحول مشكلة عالمية تشمل الذكور والإناث وبأعمار مختلفة (1) وقد شغلت اهتمام الكثير من الباحثين في شتى انحاء العالم وتم تناولها من جوانب عديدة من اجل التوصل الى حلول مناسبة. يؤدي الاستهلاك الخاطئ للكحول الى تأثر الخلية العصبية بذاتها وهو تاثير يشمل كل من وظيفة الخلية العصبية المتمثلة بالنقل الكهرباني والنقل المشبكي (2) وتركيب الخلية العصبية سواء في الغشاء او المكونات السايتوبلازمية والنووية (3 ، 4) .

تهدف الكثير من الدراسات الحديثة الى معرفة التاثير المباشرللكحول على احداث الضرر في الخلايا العصبية اذ اشارت الى تاثير الكحول في القنوات الايونية مثل GABA و NMDA ومستقبلات النواقل الكيميائية وكذلك تاثير الكحول في مستوى DNA الخلية(5 ، 6، 7، 8) . إن لحامض السياليك دور مهم وفعال في سطوح الكثير من الخلايا وبسبب هذا الدور فقد اعتمدته الكثير من الدراسات الحديثة علامة بيولوجية ولاسيما فيما يخص الامراض السرطانية وعلاجها (9 ، 10 ، 11) . ولحامض السياليك أيضا دور مهم وفعال في مستوى اغشية الخلايا العصبية ولاسيما في منطقة المشابك العصبية(12)كما وان للكحول دور تفضيلي غير متخصص على المشابك العصبية (13) . ولذلك صممت الدراسة الحالية من اجل معرفة تأثير الايثانول فيTSA مجانس الدماغ ومصل الدم ومحاولة أيجاد علاقه بينهما.

المواد و طرائق العمل

الحيوانات المختبرية المستخدمة

استخدمت في هذه الدراسة 25 حيوان من ذكور الجرذ المختبرية *R attus norvegicus albinus* قسمت الحيوانات الى خمس مجاميع لكل مجموعة خمسة حيوانات اذ جرعت اربع مجموعات بكحول الايثانول عن طريق الفم

* استاذ مساعد- فرع البيولوجي الطبي كليه الطب-جامعة النهرين
** مدرس مساعد كلية العلوم للبنات قسم علوم الحياة-جامعة بغداد

وباربعة تراكيز مختلفة 20 % و 30 % و40 % و 50 % وبحجم 5 مل للجرعة الواحدة يوميا ولمدة 30 يوم . تم تشريح الحيوانات بعد تخديرها بواسطة الكلوروفورم (14) .

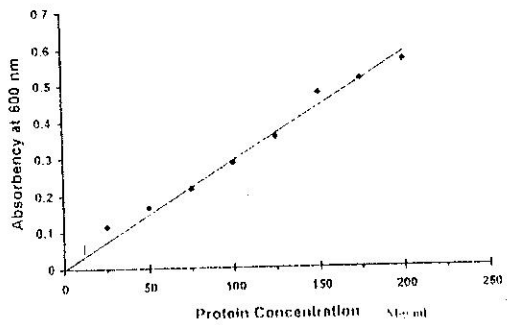
جمع عينات المصل: شرحت الحيوانات ثم سحب الدم من القلب بشكل مباشر بواسطة محقنة طبية (15) . وضع الدم في انبوبة اختبار لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4°م ثم نبذ مركزيا بسرعة 2000 دورة/ دقيقة ولمدة 10 دقائق وسحب مصل الدم وحفظ بدرجة حرارة – 20°م لحين الاستعمال.

تحضير مجانس الدماغ

سحق نصف الدماغ الايمن باستخدام دارئ الفوسفات الفسلجي Phosphate buffered saline (p.b.s.) ذي باء هاء 7.4 وبخمسة اضعاف حجم نصف الدماغ المجانس وطرد مركزيا بسرعة (3000) دوره / بالدقيقه لمدة نصف ساعه وبدرجة حراره 4م? باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد ، فصل الطافي بواسطة ماصه زجاجيه وخزن بدرجة حراره – 20 ?م لحين الاستعمال .

قياس تركيز البروتين للعينات

اعتمدت طريقة Lowry وجماعته (16) في قياس مقدار البروتين الكلي للنماذج وحسب المنحنى المعياري باستخدام بروتين البومين المصل البقري Bovine Serum Albumin(BSA) ،شكل رقم (١).



شكل رقم (١) المنحنى القياسي لقياس مستوى البروتين الكلي TP

قياس تركيز حامض السياليك

تحضير المحاليل

1. محلول حامض السياليك الخزين Stock Sialic Acid حضر بإذابة 50 ملغم من حامض السياليك في 100مل من الماء المقطر ومنه حضرت المحاليل القياسية الاتية 10 ، 20 ، 30 ، 40 ، 50 ، مايكرو غرام / مل والتي حضرت باستخدام دارئ الفوسفات الفسيولوجي PBS ذي باء هاء 7.4 (١٧)

2. محلول الريزورسينول الخزين Stock Resorcinol Solution: حضر بإذابة 0.6غم من الريزورسينول بكمية قليلة ماء مقطر واكمل الحجم الى 100مل وحفظ بالثلاجة بدرجة 4°م.

3. كاشف الريزورسينول: حضر بمزج 2 مل من محلول الريزورسينول الخزين مع 0.05 غم كبريتات النحاس المائية و 1.95 مل من الماء المقطر واكمل الحجم الى 20 مل باضافة حامض الهيدروكلوريك المركز.

4. محلول خلات البيوتانول – ميثانول Butyl Acetate / Methanol Solution حضر بمزج 85 % من خلات البيوتانول مع 15 % كحول الميثانول.

المنحنى المعياري لحامض السياليك

حسب المنحنى المعياري باستخدام حامض السياليك المذاب في الدارئ الفوسفاتي ذي باء هاء 7.4 (17) . شكل (٢) وكما مبين في الخطوات الاتية.

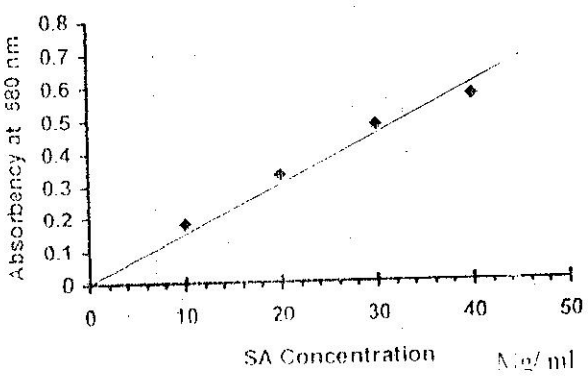
1. وضع 20 مايكرولتر لكل من التراكيز 10، 20، 30، 40 مايكرو غرام/ مل لحامض السياليك في انبوبة اختبار زجاجية وأضيف 980 مل ماء مقطر لا أيوني ومزج المحلول ووضع على حمام ثلجي مع مراعاة غمر ثلثي الانبوب في الثلج.

2. أضيف 1 مل من كاشف الريزورسينول والذي يعمل على صبغ SA في العينة باللون الازرق.

3. وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 100 °م لمدة 15 دقيقة من اجل التحلل المائي لحامض السياليك، مع مراعاة غمر ثلثي الانبوب في الماء المغلي.

4. نقلت بعد ذلك الى حمام ثلجي لمدة 10 دقائق مع مراعاة غمر ثلثي الانبوب في الثلج.

5. أضيف 2 مل من محلول خلات البيوتانول – ميثانول مع المزج الجيد وهذا يعمل على استخلاص حامض السياليك و نبذ بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق.



شكل (٢) منحنى المعايرة لحامض السياليك

تركيز حامض السياليك الكلي (TSA)

Total sialic acid

حسب TSA لعينات التجربة وعينات السيطرة في مصل الدم ومجانس الدماغ باستخدام طريقة Miettinen (17) المذكورة في الفقرة السابقة . وتم الحصول على قراءات الامتصاصية .O. D لكل العينات وسقطت على منحنى المعايرة القياسي من اجل الحصول على تركيز TSA المجهول لكل عينة.

تركيز حامض السياليك المرتبط مع الدهون

Lipid Bound Sialic Acid(LBSA)

حسب تركيز حامض السياليك المرتبط مع الدهون كما موضح في الخطوات الاتية:

1. وضع 50 مايكروليتر من العينة في انبوب اختبار زجاجي ويضاف لها 150 مايكروليتر ماء مقطر لا أيوني.
2. مزج بشكل جيد لمدة خمس ثواني.
3. وضع في حمام ثلجي مع مراعاة غمر ثلثي الانبوب في الثلج.
4. أضيف 3 مل من محلول كلوروفورم/ ميثانول المبرد 1 :2 حجم/حجم.
5. مزج بشكل جيد.
6. أضيف 0.5 مل ماء مقطر لا أيوني مبرد.
7. مزج بشكل جيد.
8. طرد مركزيا لمدة خمسة دقائق وبسرعة 30 00 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
9. اخذ 1مل من الطبقة العليا ووضع في انبوب اختبار اخر.
10. أضيف 50 مايكروليتر حامض الفوسفوتونكستك (1 غم/ مل)و مزج بشكل جيد.
11. ترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
12. طرد مركزيا لمدة 5 دقائق وبسرعة 3000 دورة/ دقيقة
13. أزيل الطافي Supernatant ثم اضيف الى الراسب 1 مل ماء مقطر لاايوني ومزج بشكل جيد الى ان اصبح الراسب عالق منتشر في الانبوبة.
14. أضيف 1 مل من كاشف الريزورسينول ووضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة 10 0 ^{o}م لمدة 15 دقيقة.
15. نقلت الى حمام ثلجي لمدة 10 دقائق.
16. أضيف 2 مل خلات البيوتانول – ميثانول و مزج بشكل جيد .
17. طرد مركزيا بجهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعة 3000 دورة/ دقيقة.
18. قرأت الطبقة العليا الملونة باللون الازرق على طول موجي 580 نانوميتر.

التحليل الاحصائي : تم استخدام تحليل التباين الاحادي ANOVA في تحليل النتائج لمعرفة الفروق المعنوية الناتجة بسبب تأثير الايثانول

النتائج

مستوى حامض السياليك الكلي في مجانس الدماغ TSA:

أظهرت نتائج الدراسة البايوكيميائية ان مستوى TSA في مجانس دماغ الجرذ الطبيعية غير المعاملة بالايثانول هو (212.40±3.19) مايكروغرام/ مل جدول رقم1 ،كما وبينت نتائج الدراسة بان الانخفاض يكون معنوي عال عند التجريع بالايثانول بتركيز 20% و 30% و 50%) (p< 0.001 وان الانخفاض يكون معنوي عال جدا (p<0.001) عند استخدام التركيز 40% وذلك عند استخدام الاختبار الاحصائي اقل فرق معنوي LSD جدول رقم (1) . اشارت نتائج الدراسة الى ان مستوى TSA في مجانس الدماغ في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 30% ينخفض انخفاضا معنويا (p< 0.05) عند مقارنته مع TSA في مجانس دماغ الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 20 %، وفي الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 40 % اوجدت النتائج انخفاضا معنويا في TSA في مجانس الدماغ (p< 0. 001) عند مقارنته مع TSA مجانس الدماغ في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 20 % وكذلك تركيز 30 % ، فضلا عن وجود انخفاضا معنويا في TSA مجانس الدماغ في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 50 % (p< 0. 05) عند مقارنته مع TSA مجانس الدماغ في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 20 % وكذلك تركيز 30 % جدول رقم 1 ، بينما اظهرت النتائج وجود ارتفاع غير معنوي (p> 0. 05) في TSA مجانس الدماغ في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 50% عند مقارنته مع TSA مجانس الدماغ في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 40 % جدول رقم 1 .

جدول رقم 1: تركيز TSA في مجانس دماغ الجرذ الطبيعية والجرذ المعاملة بتراكيز مختلفة من الكحول الاثلي، مقاسا بالمايكروغرام/مل.

المعاملة	تركيز TSA مايكروغرام/مل SE Mean ±
Control	3.19 ± 212.40*
20% Eth.	3.32 ± 132.97*
30% Eth.	3.64 ± 119.22*
40% Eth.	3.18 ± 100.80*
50% Eth.	2.78 ± 103.27*

* (P<0.001)

جدول رقم 3 : تركيز LBSA في مجانس الدماغ في الحيوانات الطبيعية و الحيوانات المعاملة بتراكيز مختلفةمن الكحول الاثلي، مقاسا بالمايكرو غرام/مل

المعاملة	تركيز LBSA مايكرو غرام/مل SE ± Mean
Control	4.46 ± 142.65
20% Eth.	1.99 ± 75.35
30% Eth.	1.95 ± 63.00
40% Eth.	3.25 ± 52.79
50% Eth.	2.84 ± 60.06

تركيز LBSA في مصل الدم

أظهرت نتائج الفحص ان مستوى LBSA في مصل دم الجرذ الطبيعية غير المعاملة بالكحول كان (183. 04 ± 2.88) مايكرو غرام/مل.

أشارت نتائج الفحص البايوكيميائي الى ان مستوى LBSA في مصل دم الجرذ المعاملة بالكحول الاثلي تركيز 20 % وبحجم جرعة (5مل) يوميا لمدة (30) يوما ينخفض انخفاضا معنويا قليلا ($p<0.05$) مقارنة بالجرذ الطبيعية غير المعاملة بالكحول وذلك باستخدام الاختبار الاحصائي LSD جدول رقم 4 ، وبينت النتائج ان معاملة الجرذ بالكحول الاثلي بتركيز 30% يؤدي الى احداث انخفاض في LBSA انخفاضا غير معنويا ($p>0.05$) عند مقارنته مع الجرذ الطبيعية جدول رقم 4 ، كما واوضحت النتائج وجود انخفاضا معنويا عالٍ ($p < 0.001$) في LBSA مصل الدم في الجرذ المجرعة بكحول اثلي بتركيز 40% عند مقارنته مع LBSA في الجرذ الطبيعية غير المجرعة بالكحول جدول رقم 4 ، بينما كان الانخفاض في LBSA مصل الدم في الجرذ المجرعة بالكحول تركيز 50 % انخفاضا معنويا قليلا ($p<0.05$) جدول رقم 4 .

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات بين تراكيز الكحول المستخدمة اذ اشارت الى ان الارتفاع في LBSA مصل الدم عند تجريع الجرذ بالكحول الاثلي تركيز 30 % عنه في تركيز 20 % والمبين في الجدول رقم 4 ،كان ارتفاعا غير معنوي ($p>0.05$) ، بينما كان الانخفاض معنوي عالٍ ($p < 0.001$) عند مقارنة LBSA في مصل دم الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 40 % مع تركيز 30 % جدول رقم 4 ،كما واوضحت النتائج وجود ارتفاع في مستوى LBSA في مصل دم الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 50% ارتفاعا معنويا ($p<0.01$) عند مقارنته مع LBSA مصل الدم في تركيز 40 % جدول رقم 4 . بينما اشارت النتائج الى ان الانخفاض في LBSA في الحيوانات المجرعة بتركيز 50 % عن LBSA مصل دم الحيوانات المجرعة بتركيز 30% كان انخفاضا غير معنوي ($p> 0.05$) جدول رقم 4 ، فضلا عن ان الانخفاض يكون غير معنوي ايضا ($p> 0.05$) عند مقارنته مع LBSA في مصل دم الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 20% جدول رقم 4 .

جدول رقم 4 : تركيز LBSA في مصل دم الجرذ الطبيعية و الحيوانات المعاملة بتراكيز مختلفة من الكحول الاثلي، مقاسا بالمايكرو غرام/مل.

المعاملة	تركيز LBSA في مصل الدم مقاس بالمايكرو غرام/مل Mean ± SE
Control	183.04 ± 2.88
20% Eth.	165.88 ± 2.56
30% Eth.	169.36 ± 2.34
40% Eth.	124.55 ± 4.39
50% Eth.	155.70 ± 6.06

المناقشة

تأثير الايثانول في TSA و LBSA في مجانس الدماغ ومصل الدم

لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع تراكيز الايثانول المستخدمة أدت الى انخفاض معنوي في محتوىحامض السياليك الكلي لمجانس الدماغ عند مقارنته بعينات الجرذ الطبيعية غير المعاملة بالكحول، وهذا يتفق مع ما توصلت اليه الدراسات السابقة (18) ، والتي اشارت الى ان استخدام الايثانول بتراكيز مختلفة وبجرعات حادة او مزمنة تؤدي الى انخفاض ملحوظ في حامض السياليك الكلي لنسيج الدماغ .

لقد ظهرت عدة فرضيات تحاول تفسير هذا الانخفاض و تتفق على مبدأ واحد هو ان تأثير الكحول يكون في الغشاء البلازمي للخلية العصبية ووضح Grenell (19) ارتباط الايثانول عند سطح غشاء الخلية العصبية ثم ظهرت دراسات اخرى اوضحت امتلاك الايثانول تأثير قليل في الجزء الداخلي للغشاء وان الايثانول يسبب اضطراب اكبر على الجزء الخارجي لغشاء الخلية مقارنة بالجزء الداخلي (20).

افترض وجود اربع مناطق لتأثير الكحول في الغشاء البلازمي وهي اولا في الطبقة الثنائية الدهنية وثانيا عند تداخل الطور بين الدهن – البروتين وثالثا عند الموقع البروتيني المحاط

مستوى حامض السياليك الكلي في مصل الدم TSA

بينت نتائج الدراسة ان مستوى TSA في مصل دم الجرذ الطبيعية غير المعاملة بالكحول كان (403.53 ± 8.80) مايكروغرام/ مل جدول رقم 2 .

أشارت نتائج الدراسة الى ان تجريع ذكور الجرذ بالكحول الاثلي تركيز 20 % و 30% ادى الى احداث انخفاض معنوي في المستوى الكلي لحامض السياليك ($p< 0.001$) ،وعند استخدام الكحول الاثلي تركيز 40 % و 50% اوجدت النتائج وجود انخفاضا معنويا عاليا ($p< 0.001$) جدولرقم 2. وكذلك عند تجريع الجرذ بالكحول الاثلي تركيز 50 % اوجدت النتائج ايضاحصول الانخفاض المعنوي العالي ($p<0.001$) جدول رقم 2،وهذا كله عند مقارنة هذه النتائج مع TSA مصل دم مجاميع الجرذ الطبيعية غيرالمعاملة بالكحول الاثلي. اوجدت نتائج الدراسة ان انخفاض TSA في مصل دم الجرذ المعاملة بتركيز 30% كان غير معنويا ($p> 0.05$) عند مقارنته مع TSA في الجرذ المعاملة بالكحول الاثلي تركيز 20 % جدول رقم 2 ، فضلا عن انخفاض TSA في مصل دم الجرذ المجرعة بتركيز 40 % كحول اثلي عن TSA في مصل دم الجرذ المجرعة بتركيز 20 % انخفاضا معنويا ($p< 0.001$) و يكون الانخفاض معنويا بشكل اقل ($p< 0.01$) عند مقارنة TSA في مصل الدم في الجرذ المعاملة بالكحول الاثلي تركيز 40 % مع تركيز 30% وتركيز 50% جدول رقم 2 ، كما واشارت النتائج الى الانخفاض غير المعنوي في TSA مصل دم الجرذ المعاملة بالكحول الاثلي تركيز 50 % ($p > 0.05$) عند مقارنته مع TSA مصل الدم في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 20 % جدول رقم 2، وتظهر النتائج بان مستوى TSA في مصل دم الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 50 % يرتفع عنه في تركيز 30 % وان هذا الارتفاع يكون غير معنويا ($p > 0.05$) جدول رقم 2 .

اوجدت نتائج الدراسه وجود علاقه معنويه $p< 0.01$ ذات معامل ارتباط(0.799) بين TSA في مجانس الدماغ و TSA في مصل الدم .

جدول رقم 2 : تركيز TSA في مصل دم الجرذ الطبيعية و الجرذ المعاملة بتراكيز مختلفة من الكحول الاثلي، مقاسا بالمايكروغرام/مل.

المعاملة	تركيز TSA مايكروغرام/مل SE: Mean ±
Control	8. 80 ± 40 3.53
20% Eth.	13. 34 ± 302.12
30% Eth.	7. 37 ± 285.95
40% Eth.	4.73 ± 271.17
50% Eth.	2.95 ± 289.12

تركيز Liped bound sialic acid (LBSA) في مجانس الدماغ.

أظهرت نتائج الفحص البايوكيميائي ان مستوى LBSA في مجانس دماغ ذكور الجرذ الطبيعية غير المعاملة بالكحول كان (142.65 ± 4.46) مايكروغرام/مل.

بينت نتائج الفحص وجود انخفاض معنوي عال ($P<0.001$) عند تجريع ذكور الجرذ بالكحول الاثيلي وللتراكيز 20% و 30% و 50% ووجود انخفاض معنوي عال جدا ($P<0.001$) عند استخدام الكحول الاثلي بتركيز 40% وذلك عند المقارنة مع LBSA في مجانس الدماغ في الجرذ الطبيعية وباستخدام الاختبار الاحصائي LSD جدول رقم 3 .أشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق بين تراكيز الكحول المستخدمة اذ ان الانخفاض في LBSA مجانس الدماغ في الجرذ المجرعة بكحول اثلي تركيز 30 % ينخفض عن LBSA في الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 20% انخفاضا معنويا ($p< 0.05$) جدول رقم 3 ، فضلا عن انخفاض LBSA مجانس الدماغ في الجرذ المعاملة بالكحول الاثلي تركيز 40 % عنه في تركيز 30 % انخفاضا معنوياعاليا($p < 0.001$) جدول رقم 3 ، كما وبينت النتائج ان LBSA في مجانس دماغ الجرذ المعاملة بالكحول الاثلي تركيز 50 % يرتفع عنه في تركيز 40 % ارتفاعا معنويا ($p< 0.001$) جدول 3 ، بينما ينخفض عن LBSA في مجانس دماغ الجرذ المجرعة بالكحول الاثلي تركيز 20 % انخفاضا معنويا عاليا ($p < 0.001$) وينخفض كذلك عن تركيز 30 % ولكن الانخفاض يكون غير معنويا ($p > 0.05$) جدول رقم 3 .

بالدهن . ورابعا عند الموقع البروتيني المكشوف على السطح (21).

ان هناك حقائق تجعل من الصعب اهمال دور الدهون والبروتينات على سطوح الاغشية العصبية كأهداف لتأثير الايثانول وتمثل الكانكليوسايدات اغلب الدهون على سطوح الاغشية العصبية اذ تتركز بشكل كبير ولاسيما في المشابك العصبية (22) وتظهر الكانكليوسايدات ارتباط وثيق جدا مع بروتينات الغشاء والذي تم اثباته في الزجاج *in vitro* عند اضافة كانكليوسايدات الى مزارع الخلايا اذ يصبح جزء منها منغرز داخل الغشاء بينما يرتبط الجزء الاخر مع البروتين ولا يمكن تحريره الا باضافة التربسين (23)، ولذلك كان هذا الارتباط الوثيق سببا باقتراح وجود دور للكانكليوسايدات في تنظيم وظيفة المستقبل (22).

تعد الكانكليوسايدات هدفا رئيسا لنشاط الايثانول الذي ظهر بانه يتجزء داخل الطبقة الثنائية الدهنية ويعمل على ارباك ذنب السيرامايد للكانوكليوسايدات المنغرسة في الغشاء مؤديا الى انحراف الترتيب الفضائي لنهايات حامض السياليك البارزة الى السطح ، كذلك فان التغيرات داخل الغشاء يمكن ان تبدل البناء الأنزيمي و العمليات التحطيمية التي تنجز التحول الطبيعي للكانكليوسايدات التي ترتبط مع الايثانول عن طريق جزيئة حامض السياليك عند سطح الغشاء (24 ، 25 ، 26 ، 3) . ويعمل على تحفيز انشطارها الذي يؤدي الى خفض مستويات SA في الدماغ والذي قد يكون سببا في زيادة اظطراب الغشاء الناشئ من تأثير الايثانول(27، 12 ، 28).

من جانب أخر يمكن ان يكون لبروتينات الغشاء دور مهم ايضا كهدف لتأثير الايثانول حيث انها تقوم بالالتفاف داخل الغشاء البلازمي مخفية اجزائها غير القطبية وكاشفة اجزاءها القطبية الى السطح (29)، كما ان احماضها الامينية موجبة الشحنة البارزة على السطح تمتلك دورا مهما جدا من خلال تأصرها هيدروجينيا مع الماء الموجود عند سطح الغشاء . والذي يعمل كجسر كهربائي يربط الاحماض الامينية موجبة الشحنة لبروتين الغشاء من جهة وحامض السياليك الكانكليوسايدي ذو الشحنة السالبة من جهة اخرى (30) .

ان إحلال الكحول محل الماء المرتبط يؤدي الى تأثيرات الوستيرية في بروتين المستقبل يمكن ان تفسر تأثير الكحول في اكثر من بروتين (قناة ايونية) واحد وكذلك تفسر عدم حاجة الايثانول للارتباط بمستقبل متخصص كجزء من الآلية المطلوبة لظهور تأثيره في الاغشية العصبية اذ ان تأثير الايثانول في مستقبلات نواقل عصبية متخصصة هو غير مباشر اذ ينشأ من تغير في الحالة الفيزيائية للبيئة الدقيقة السطحية الانية التي تستقر فيها مستقبلات قنوات الايونات مما يؤدي الى تغيرات الوستيرية في الترتيب الفضائي لأنواع من بروتينات القنوات الايونية . ان التغيرات المحفزة بالكحول في الترتيب الفضائي للبروتين السكري السيالي قد يعيد ثمالات حامض السياليك فيه لتصبح اكثر تقبلا للانشطار بواسطة انزيم السياليديز اذ ظهر ان الايثانول يخفض من محتوى حامض السياليك المرتبط بالبروتينات السكرية في الدماغ .

تتباين تأثيرات الايثانول من نظام نواقل عصبية الى اخر ومن منطقة دماغية الى اخرى ، ويتركز تأثيره في المشابك بشكل تفضيلي غير متخصص وهو لا يعمل على موقع ارتباط متخصص للمادة المرتبطة ligand اذ انه يحل محل الماء المرتبط هيدروجينيا على السطح بين منطقة الشحنة السالبة المتمثلة بحامض السياليك والموجبة المتمثلة بالاحماض الامينية البروتينية اذ يتنافس الايثانول للارتباط مع أحدى هذه الجزيئات وذلك لكون جزيئات الماء تكون في حالة حركة سريعة تؤدي الى انكسار الاواصر الهيدروجينية واعادة تكوينها كل (1×10^{-9}) ثانية تقريبا ولذلك فان هناك فرصة وافرة للايثانول لاحلال اواصره الهيدروجينية محل الاواصر الهيدروجينية للماء الذي يرتبط من جهة اخرى مع Ca^{++} الموجودة في الغشاء والذي يوفر الصلابة للغشاء من خلال ارتباطه مع مجموعة الكربوكسيل السالبة لحامض السياليك ومجموعة الكاربوكسيل السالبة للأحماض الأمنية للبروتين اذ يعمل على ربط الاثنين معا وفرض الصلابة في الغشاء . لذلك فان الايثانول يتنافس ايضا مع الماء للارتباط بالكالسيوم اذ ان ازاحة الماء سوف تساعد على كسر الجسر المائي بين الكانكليوسايدات وبروتينات المستقبل مما يؤدي الى جعل جزيئات حامض السياليك اكثر تقبلا لانزيم السياليديز ويبعد بذلك الكانكليوسايد عن البروتين ويسهم في زيادة سيولة الغشاء (29) .

تعتمد السرعة التي يتجزأ فيها الايثانول داخل الغشاء على المستوى الموجود سابقا من السيولة ويمكن ان يؤدي التسييل القوي بالبروتينات المطمورة وما يجاورها من الدهن السكري لان يصبحا منطمرين بشكل اعمق في الطبقة الثنائية الدهنية بحيث تكون السلاسل البارزة من السكريات المحدودة مسحوبة بالقرب من

سطح الغشاء وهذا قد يغير السبلقة الدقيقة المكونة من كانكليوسايد – ماء – بروتين وان التغيرات المحفزة بالكحول قد تكون تالية لعملية التسييل والاضطراب في الغشاء وهذا يؤثر بشكل كبير على وظيفة الغشاء البلازمي الطبيعية وبشكل خاص وظيفة المشابك العصبية (31).

ان احلال الايثانول محل الماء المرتبط على سطح الغشاء هي عملية انكاز Dehydration وان من بين الاوائل الذين اشاروا الى هذه الظاهرة هو العالم Grenel (19) وتبعه العالم Klemm (32) في دراسة لاحقة ، وفي ضوء هذه النظرية يعمل الايثانول على زيادة انشطار SA في الكانكليوسايد الذي من المحتمل ان يحدث عن طريق التغيرات في الترتيب الفضائي التي تجعله اكثر تقبلا لانزيم السياليديز .

يمكن تفسير الانخفاض في محتوى حامض السياليك الكلي TSA نتيجة المعاملة المزمنة بالايثانول في الدراسة الحالية على أساس وجود دور مؤثر للايثانول في كل من الدهون السكرية والبروتينات السكرية المرتبطة بحامض السياليك في اغشية الخلايا العصبية.

لقد أظهرت الدراسة الحالية بان تأثير الايثانول في انشطار حامض السياليك المرتبط بالدهون كان اكبر بكثير منه في حامض السياليك المرتبط بالبروتين في مجانس الدماغ وهذا يتفق مع كل من الانتشار الواسع للكانكليوسايدات في اغشية الخلايا العصبية وما توصلت اليه الدراسات المذكورة سابقا بان الايثانول يمتلك تأثيرا في حامض السياليك المرتبط بالدهون السكرية الغشائية ، بالرغم من ان اغلب هذه الدراسات تقترح وجود تأثير معنوي في حامض السياليك المرتبط بالدهون والبروتينات السكرية . الدراسة الحالية تقترح دورا اكبر لحامض السياليك المرتبط بالدهون في الدماغ كهدف رئيس لتأثير الايثانول ولكن هذا لا يعني ان جميع الانخفاضات كانت نتيجة لانخفاض مستوى هذا السكر المرتبط بالدهون اذ ان الفروق الواضحة بين TSA و LBSA تشير الى وجود نسبة من حامض السياليك المرتبط بالبروتين قد تعرضت ايضا الى تأثير الايثانول وهذا يتفق مع النسبة القليلة للبروتينات السكرية مقارنة بالكانكليوسايدات على سطوح اغشية الخلايا العصبية ولاسيما في المشابك العصبية ومع الدراسات المذكورة سابقا والتي أشارت الى وجود تأثير للايثانول على بروتينات الغشاء السكرية. من خلال دراسة مستويات TSA في مصل الدم للجرذ المعاملة بتراكيز مختلفة من الايثانول في الدراسة الحالية ظهر بان هناك انخفاض معنوي عالي جدا في محتوى TSA في المصل مقارنة بالحيوانات الطبيعية . ان هذه الدراسة تدعم وجود دور اكبر للايثانول بالتأثير في حامض السياليك المرتبط بالبروتينات السكرية في مصل الدم مقارنة بذلك المرتبط بالدهون السكرية ، اذ بينت الدراسة الحالية ان الانخفاض في حامض السياليك المرتبط بالدهون وبالرغم من انه كان معنويا في التراكيز العالية الا انه قليل مقارنة بالانخفاض في مستوى TSA في المصل وبالتالي فانه غير كاف لتفسير هذا الانخفاض مما يدعو الى ترشيح دور اكبر لحامض السياليك المرتبط بالبروتين في مصل الدم كهدف ذي حساسية اكبر لتأثير المعاملة بالايثانول المزمن وان هذا ينسجم مع وجود البروتينات السكرية بتراكيز عالية في مصل دم اللبائن ، وتوفر الدراسة الحالية الدعم للدراسات السابقة التي اشارت الى حدوث انخفاض في محتوى حامض السياليك المرتبط بالبروتينات في مصل الدم نتيجة للمعاملة بالايثانول، (34،35).

ان الانخفاض في حامض السياليك الناتج عن تأثير الايثانول في الدراسة الحالية في كل من مجانس الدماغ ومصل الدم يمكن ان يفسر من ناحية اخرى على اساس البناء المضعيف او الهدم المتزايد لهذا السكر الطرفي نتيجة فعل الانزيمات المسؤولة عن هذه العمليات والمتمثلة بانزيمات Sialyltransferase والسياليديز Sialidase .

تأثير تراكيز الايثانول

لقد تم استخدام تراكيز مختلفة من الايثانول في هذه الدراسة ومن خلال نتائج الدراسة والمتمثلة بالمحتوى الكلي لحامض السياليك TSA نلحظ ان هناك علاقة عكسية بين تراكيز الاثيانول و TSA في مجانس الدماغ اذ انه كلما زاد تركيز الايثانول انخفض TSA في المجانس، وان ارتفاع TSA عند استخدام تركيز 50% هو ارتفاع غير معنوي عن تركيز 40%. وان نتائج الدراسة المتعلقة بالمحتوى الكلي في مصل الدم تؤشر ايضا وجود علاقة عكسية بين تركيز الايثانول و TSA في مصل الدم فكلما زاد تركيز الايثانول انخفض تركيز TSA في المصل ، وان الارتفاع في TSA عند استخدام تركيز 50 % قد يعود الى ان هذا التركيز هو التركيز قاتل وفيه فترة التجريع قصيرة اذ انه يؤثر على الانزيمات المسؤولة عن قطع حامض السياليك.إذن الانخفاض في TSA يكون معتمدا على تركيز الايثانول المستخدم ومن خلال

الربط بين تركيز الايثانول ومحتوى حامض السياليك في كل من مجانس الدماغ ومصل الدم نستطيع ان نستنتج بان الانخفاض في TSA مصل الدم والمعتمد على تركيز الايثانول يؤشر انخفاض TSA في مجانس الدماغ.

المصادر

1. Kril, J. J. and Butterwoorth, R. F. 1997. Diencephalic and cereballar pathology in alcoholic and nonalcoholic patients with end-stage liver disease. Hematology, 26 (4): 837-841.
2. Schmitz, C.; Axmacher, B.; Zunker, U.; Korr, H. 1999. Age-related changes of DNA repair and mitochondrial DNA synthesis in the mouse brain. Acta Neuro pathol. (Berlin), 97: 71-81.
3. Ghosh, P.; Ender, I.; Hale, E. A. 1998. Long-Term. Ethanol consumption selectively Impairs Ganglioside pathway in Rat Brain. Alcohol. Cliu. Exp. Res. 22 (6): 1220-1226.
4. Ostrowska, J.; Uczaj w.; Kasacka I.; Roaski A.and Skrzydlewska E. 2004.
Green tea protects agenst ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. Alcohol J. 32 (1) 25-32.
5. Boselli, C. & Govoni, S. 2000. Alcohol differentially affects noradrenergic and purinergic responses in the bisected rat Vas deferens.
6. Allgaier, C.; Frank, H.; Sobottkaa, H. 2000. Acamposate inhibits Ca^{+2} influx mediated by NMDA receptors and Voltage-sensitive Ca^{+2} channels in cultured rat mesencephalic neurons. Naun. Schm. Arch pharmacol. 362: 440-443.
7. Brooks, P. J. 2000. Brain atrophy and neuronal loss in alcoholism: a role for DNA damage?. Neurochem. Inter. 37, pp. 403-412.
8. Masocro, E.; Frattini, P.; Favalli,.; Rozza, A. 2001. Effect of acute Alcohol on ischemia-induced glutamate release and brain damage. Alcohol, 22: 173-177.
9. Patel, P. S.; Adhvaryu, S. G. & Baxi, B. R. 1991. Tumor markers in leukemia evaluation of serum levles of different forms of sialic acid. Int. J. Biol. Markers, 6 (3): 177-182.
10. النهاري، اشرف محمد ٢٠٠٠. مقارنة تأثير بعض عقاقير العلاج الكيماوي لابيضاض الدم على محتوى حامض السياليك ودورة الخلية لخلايا نقي العظم والطحال في الفئران البيض. رسالة ماجستير كلية التربية (ابن الهيثم) جامعة بغداد.
11. الكرخي، انتصار حسين ٢٠٠٠. العلاقة بين مستوى حامض السياليك في كل من بلازما الدم وعلى سطوح خلايا الدم البيض مع دورة الخلية للمصابين بابيضاض الدم واخرين خاضعين للعلاج الكيماوي. رسالة ماجستير. كلية التربية (ابن الهيثم) ـ جامعة بغداد.
12. Collins, B. E.; Yang, L. J.; Gitali, M. & Marie, T. 1999. Sialic Acid Specificity of Myelin-associated Glycoprotein Binding. IBC online, 272 (2): 1248-1255.
13. Lukoyanov, N. V.; Brandao, F. & Cadete, L.2000. Synaptic-reorganization in the hippocample formation of alcohol-fed rats may compensate for functional deficits related to neuronal loss. Alcohol. 20: 139-148.
14. Cadete, L.; Brando, A.; Andrade, F. 1995. Effects of GM1 ganglioside upon neuronal degeneration during with drawl from alcohol. Alcohol, 8: 417-423.
15. Campbell, D.; Garvey, J. & Sussdorf, D. 1964. Methods in Immunology. W. A. Benjamin. Inc., New York.
16. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

17. Miettinen, T. & Luukkainen, T. 1959. Use of butylacetate in determination of sialic acid. Acta chem. Scand., 13, 856-858.
18. Cherian, L. & Klemm, W. R. 1991. Ethanol Effects on Total sialic Acid of Various Brain Regions and Visceral organs. Alcohol, 8: 389-393.
19. Grenell, R. G. 1975. The binding of alcohol to brain membranes. Brain Res., 81: 340-344.
20. Wood, W. G.; Gorka, C.; Rao, A. M. & Schroeder, F. 1989. Specific action of ethanol on lateral vertical membrane lipid domains. In: Sun, G. Y. (ed.). Mechanisms of Alcohol. Clifton, NJ: Human Press, pp. 3-13.
21. Franks, N. P. & Liep, W. R. 1987. What is the molecular nature of general anaesthetic target sites. Trends physiol. Sci., 8: 169-174.
22. Bremer, E. G. & Hakomori, S. II. 1984. Gangliosides as receptor modulators. In: Ledeen, R. W.; Yu, R. K.; Rapport, M. M.& Suzuki, K. (eds.). Ganglioside Structure, Function, and Biomedical Potential. Plenum Press, New York. pp. 381-394.
23. Tomasi, M.: Roda, G.; Ausiello, C. & Agnolo, G. 1980. Interaction of GM_1 gangliosides with bovine serum albumin: formation and isolation of multiple complexes. Eur. J. Biochem. 111: 315-324.
24. Hitzeman, R. L.; Schueler, H. E.; Graham, B. & Krishman, G. P. 1986. Ethanol-induced changes in neuronal membrane order. An NMR study. Biochim. Biophys. Acta, 859: 189-197.
25. Klemm, W. R.; Mathew, J. & Maring, G. 1988. Acute Alcohol Decreases Gangliosides in Mouse Brain. Alcohol, 5: 215-219.
26. Kreishman, G. P.; Hitzemann, R. J. & Harold, E. S. 1986. Ethanol – induced changes in neuronal membrane order, A NMR study. Biocchem. Biophys. Acta, 859, pp. 189-197.
27. Heaton, M. B.; Paiva, M.; Swanson, D. J. & Walker D. W. 1994. Effects of GM_1 ganglioside and protein synthesis inhibition. Brain Res., 654: 336-342.
28. Brinkman, V. L.; Sjoberg, E. C.; Juneja, E. R. & Crocker, P. R. 2000. Loss of N- Glyconeuraminic acid in human. Implications for sialic acid recognition by siglees. J. Biol. Chem., 275: 8633-8640. (Abstract only).
29. Cherian, L. & Klemm, W. R. 1990. Effect of acute injections of ethanol on lipid and protein-bound sialic acid in mice of deferent ages. Drug and Alcohol Dependence, 26, pp. 29-34.
30. Klemm, W. R. & Yrttas, L. 1992. The dehydration theory of A lcohol intoxication. Alcohol Rev., 3: 169-185.
31. Boyles, R.; Mathew, J. & Cherian, L. 1988. Ganglioside, or sialic acid, antagonize ethanol intoxication. Neurosci, 14: 42-46.
32. Klemm, W. R. 1990. Dehdration: A new Alcohol theory. Alcohol, 7: 49-59.
٣٣. لويزو ، ب. ١٩٨٣. الكيميـــاء الحيويـــة التركيبية الجزء الأول، وزارة التعليم العالي و البحث العلمي، جامعة صلاح الدين كليـــة التربية، ترجمة كامل حمود الركابي.
34. Stibler, H. & Borg, S. 1991. Glycoprotein and glycosyltransferase activities in serum in alcohol abusing patients and healthy controls. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 51: 43-51.
35. Xin, Y.; Lasker, J. & Liber, S. 1995. Serum carbohydrate-deficient transferrin: Mechanism after chronic alcohol intake. Hepatology, 22: 1462-1468.

The Effect of Ethanol on the level of Sialic Acid in the Brain Homogenate and Serum of Albino Male Rats

*Linda S.F. **Nadheer A. Fazaa

*Department of Midical biology-Iraqi Midicen College -Al-Nahrin University
**Department of Biology-College of Science-Baghdad University

Summary

Twenty Albino male rats were daily treated with 5ml ethanol of 20 % , 30% , 40% , 50% for 30 days . The effects of each concentration on total sialic acid (TSA) and lipid bouned sialic acid (LBSA) in both the brain homogenate and serum were studied . The results showed that the levels of TSA in brian homogenate and serum significantly decreased ($p < o . oo1$) in a concentration dependent manner . The highest decrease was observed when 40 % ethanol was employed . The present study showed relationship between the decrease of TSA in brain homogenate and serum . The content of LBSA in both the brain homogenate and blood serum was significantly ($p < o.oo1$) decreased due to different concentration of ethanol.