



دراسات جزيئية ونسجية مقارنة للتغير الموسمي في الضفادع

رسالة مقدمة إلى

كلية العلوم – جامعة الفيوم

للحصول علي درجة الماجستير

في العلوم

مقدمة من

شيماء شعبان محفوظ عبد العاطي

المشرفون

أ.د / ايمن مصطفى عبد العزيز

استاذ مساعد علم الخلية والانسجة كلية

العلوم جامعة الفيوم

أ.د/ عبد الكريم محمد عبد اللطيف

استاذ علم الخلية والانسجة كلية العلوم جامعة الفيوم

د/هبة محمد ربيع

مدرس علم الخلية والانسجة كلية العلوم جامعة الفيوم

وكيل الكلية لشئون الدراسات العليا والبحوث

أ.د/ سميرة السيد جودة



دراسات جزيئية ونسجية مقارنة للتغير الموسمي في الضفادع

رسالة مقدمة من

شيماء شعبان محفوظ عبد العاطي

بكالوريوس العلوم قسم الحيوان والكيمياء

كلية العلوم - جامعة الفيوم

لاستيفاء الدراسات المقررة للحصول علي رجة الماجستير في العلوم

علم الحيوان

(علم الخية والانسجة والوراثة)

قسم علم الحيوان

كلية العلوم - جامعة الفيوم

2023

الملخص العربي

الاحترار العالمي والتغيرات المناخية لها تأثير كبير على أنواع الحيوانات، وخاصة البرمائيات. العديد من هذه الآثار لها عواقب سلبية على البرمائيات. تؤثر التغيرات المناخية على نشاط البرمائيات خلال فصلي الربيع والشتاء. أصبح تغير المناخ تهديداً رئيسياً للأنواع في جميع أنحاء العالم على مدار العقود القليلة الماضية. يُعتقد حالياً أن معدلات الانقراض العالمية تصل إلى 1000 مرة أكبر من معدل الخلفية الموجود في السجل الأحفوري. البرمائيات هي المجموعة التي تضم أعلى نسبة من الأنواع المهددة بالانقراض. تتأثر البرمائيات بشكل كبير بالاحتباس الحراري، مما يجعلها تخرج من السبات في وقت مبكر.

دفعت درجات الحرارة المنخفضة وقلة الطعام خلال فصل الشتاء ضفدع المستنقعات (*R. ridibunda*) والضفدع العشبي (*R. mascareniensis*) إلى السبات من أجل البقاء على قيد الحياة. السبات هو ظاهرة تحدث بشكل طبيعي في العديد من الحيوانات تمكنها من البقاء على قيد الحياة في الظروف البيئية القاسية، مثل درجة الحرارة الباردة ونقص الغذاء خلال فصل الشتاء. أثناء السبات، ينخفض معدل ضربات القلب ومعدل الأيض والتنفس.

تهدف الدراسة الحالية إلى التحقق من تأثير الخلايا لمناطق المخ المختلفة بتقلبات درجات الحرارة خلال فترة السبات والنشاط بين نوعين من الضفادع، الضفدع العشبي (*R. mascareniensis*) وضفدع المستنقعات (*R. ridibunda*).

تم تجميع نوعي الضفادع محل الدراسة يدوياً وبشكل عشوائي خلال فترة النشاط الصيفي (في الأسبوع الأول من سبتمبر 2019) وأثناء السبات الشتوي (في الأسبوع الرابع من يناير 2020) من مواقع مختلفة في أبو روش والمنصورة بمحافظة الجيزة، مصر. وتم نقل جميع العينات التي تم جمعها إلى معمل الأبحاث بقسم علم الحيوان بكلية العلوم جامعة الفيوم بمصر.

تم تخدير الضفادع عن طريق الحقن داخل الصفاق بواسطة 80 ملجم / كجم من بنتوبريتال الصوديوم ثم تشريح الضفادع واستخراج المخ حيث يتم تثبيت الضفدع بطبق التشريح مع توجيه سطحه الظهري لأعلى تم قطع الجلد خلف الرأس عرضياً باستخدام المشروط تم شده للأمام لإزالته من فوق منطقة الرأس. يتم رفع عظام سقف الجمجمة وقطعها بعد فتح العظام بوضع حافة المشروط فوق خط الوسط الظهري للجمجمة وتحريكها للخلف وللأمام عدة مرات بأقل ضغط حتى يتم فتح الجمجمة للكشف عن المخ. يتم تثبيت المخ كاملاً في محلول مثبت الفورمالين المتعادل بغرض إجراء الدراسات النسيجية والكيميائية النسيجية المناعية. بالإضافة إلى ذلك فقد تم حفظ الفصوص الشمية في محلول RNA later وتخزينها عند درجة حرارة 4 مئوية لإستخراج mRNA وإجراء تقنية RT-qPCR.

وقد تمت الحصول علي الموافقة الاخلاقية لجميع إجراءات هذا العمل وترخيصها من قبل لجنه رعاية واستخدام حيوانات التجارب بجامعة الفيوم برقم (FU-IACUC ؛ 2204 AEC). أظهرت النتائج أن التركيب التشريحي للمخ في ضفدع العشب *R. mascareniensis* و ضفدع المستنقعات *R. ridibunda* يتكون من الفصين الشميين، نصفي الكرة المخية، الدماغ البيني، الفصين البصريين، المخيخ والدماغ المعيني.

أظهرت مناطق المخ المختلفة باستخدام صبغة التولويدين الازرق بنية نسيجية طبيعية في النوعين المدروسين خلال فترة النشاط في الصيف. وعلى النقيض من ذلك، لوحظت خلايا عصبية متدهورة ذات الفراغ المحيط، وخلايا عصبية بها أنوية ذات كروماتين مكثف وايضا خلايا عصبية ذات محاور مقلوبة وكذلك لوحظ محاور عصبية متدهورة في كلا من النوعين أثناء السبات الشتوي في

مناطق المخ المختلفة.

كشفت تقنية كيمياء الأنسجة المناعية المستخدمه عن وجود مستويات تعبير عالية لإنزيم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ في المناطق الفرعية المختلفة من المخ خلال الفترة النشاط في الصيف في النوعين المدروسين مما يعكس أهمية ارتفاع $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ لعمليات التنظيم الأيضي للحفاظ على أنشطة ووظائف المخ المختلفة. علي النقيض ، انخفضت مستويات تعبير $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ في المناطق الفرعية المختلفة من المخ أثناء السبات في الشتاء في النوعين المدروسين بسبب انخفاض استثارة الخلايا العصبية وضعف الوظائف المعرفية والحفاظ على الطاقة.

ايضا اظهرت تقنية كيمياء الأنسجة المناعية المستخدمه للكشف عن نشاط pax6 عن وجود مستويات تعبير عالية في المناطق الفرعية المختلفة من المخ خلال الفترة النشاط في الصيف في النوعين المدروسين مما قد يعكس أهميته في عمليات الانتشار والتجديد لتعويض الخلايا العصبية المتدهورة في مناطق المخ الفرعية المختلفة التي حدثت خلال فترة السبات. علي النقيض اظهرت مستويات منخفضة من pax6 في المناطق الفرعية المختلفة من المخ أثناء السبات الشتوي في النوعين المدروسين مما يشير الي انخفاض النشاط التجديدي للخلايا.

وباستخدام تقنية RT-qPCR، كشفت هذه الدراسة زيادة التعبير الجيني لعدد من الجينات في خلايا أنسجة الفص الشمي في النوعين محل الدراسة أثناء فترة السبات في الشتاء بما في ذلك بروتينات الصدمة الحرارية (HSP30 و HSP40 و HSP47 و HSP70 و HSP90 و HSP110) مما يشير إلى أنها قد تلعب دورًا مهمًا في حماية البروتينات عند درجات الحرارة المنخفضة. وأيضاً زيادة التعبير الجيني لبروتينات الفصل: UCP1 مما يشير إلى أنه قد يلعب دوراً مهماً في التكيف الحراري للمخ وأيضاً زيادة UCP2 و metallothionein مما يشير إلى أن هذه البروتينات قد يكون لها تأثير وقائي ضد الاجهاد التاكسدي.

تظهر هذه الدراسة أن تكيفات الدماغ مع درجات الحرارة المنخفضة تلعب دوراً مهماً في تنسيق استجابات الإجهاد وأهمية دور الفصوص الشمية في الإحساس بتقلبات درجات حرارة البيئة الخارجية والتنظيم الحراري.

أيضاً يتم تقليل أنشطة إنتاج الطاقة العصبية وتجديدها بين نوعي الضفادع المدروسة بشكل ملحوظ مع انخفاض درجة حرارة الجسم والتي تظهر في دراستنا من خلال التعبير المنخفض لانزيم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ كمنظم للطاقة و Pax6 كعامل نسخ أثناء السبات في الشتاء. بالإضافة إلى ذلك وكذلك كيف يؤثر ذلك على قدرة الدماغ على آليات التجدد.

بالإضافة إلى ذلك، فإن ارتفاع التعبير الجزيئي لبروتينات الفصل UCPS والميتالوثيونين metallothionein قد يعبر عن نشاطهما خلال فترات السبات في الشتاء للدفاع ضد أي اختلالات وظيفية والحماية من الإجهاد التأكسدي. تم الوصول إلى هذه النتائج من خلال أنشطة الإحساس العالية للفصوص الشمية التي تحفز إجراءات التنظيم الحراري لمناطق المخ الفرعية الأخرى للقيام بدورها الميكانيكي.

في الختام، تعكس نتائج الدراسة الحالية آثار تقلبات درجات الحرارة على نتائج القياسات الجزيئية والنسجية والنسجية المناعية المدروسة في أنسجة المخ المختلفة مما يشير إلى دور المخ الحيوي أثناء تكيف نوعي الضفادع محل الدراسة في فترات الحرارة المختلفة. أيضاً، تعكس دور الفصوص الشمية في الإحساس بتقلبات درجات الحرارة الخارجية والتنظيم الحراري.

توصي الباحثة بدراسة أنواع أخرى من الضفادع المصرية مع استخدام تقنيات أخرى للقياسات الجزيئية والفحص الهستوكيميائي المناعي لبروتينات أخرى لاكتشاف ما إذا كانت تتبع نفس الآليات أثناء التقلب الحراري الخارجي أم لا. وايضا دعم صانعي القرار على المستويات المحلية والوطنية والدولية والمعنية بإدارة تغير المناخ ، لأن التغيرات المناخية تقوض جهود الحفاظ على التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام.