

**Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Mosul
College of Science**



Biomolecular and Physiological Study of Some Antiaging Factors in Animal Cell Senescence Markers in Aged Rats

A Thesis

**Submitted to the Council of College of Science/ University of
Mosul in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
of Doctorate of Philosophy**

In

Biology/Animal Physiology

By

**Shwan Hussein Sofy Khana
M.Sc. in Biology**

Supervised

By

Assist. Prof. Dr. Sarab D. Suleiman

Prof. Dr. Ismail S. Kakey

2015 A.D.

1436 A.H.

Summary

The current study included fifty-six young male albino rats (4 months old and weighted 280 –290 gm), and twenty-four senescent male albino rats (24 months old and weighted 420 – 450 gm). The study was conducted in Biology Department of the College of Science, University of Mosul, and in the Medical Research Center of Hawler Medical University. Animals' treatment and assessing biomarkers of the experiment lasted a period between January- 2013 and December - 2014.

The present study aimed to investigate the antiaging properties of grape seed extract (GSE), green tea extract (GTE), pomegranate seed extract (PSE), ginkgo biloba extract (GBE), α - lipoic acid (LA) and centrophenoxine (CPH) in normal and D- galactose (D-gal) induced aged male albino rats, and their preventing and improving effects in some biomolecular and physiological biomarkers of aging resulted from oxidative damage to cells in natural and D-gal induced aged rats.

Young male rats of four months age were divided randomly into eight groups (7 rats in each group), group I (control without any treatment), group II (D-gal treated rats), group III (D-gal +CPH treated rats), group IV (D-gal + GSE treated rats), group V (D- gal + GTE treated rats), group VI (D-gal+ LA treated rats), group VII (D-gal + PSE treated rats) and Group VIII (D-gal +GBE treated rats). Senescent male rats of 24 month old were divided randomly into four groups (7 rats in each group), group I (control), group II (CPH), group III (GSE) and group IV (GTE).

At the end of the nine weeks of experimental treatment period, blood samples were collected and the obtained serum were stored at (-80°C) then used for biochemical assay. The dissected liver and brain of each animal in the all groups had been homogenized and liver and brain supernatant was collected and stored at (-80°C) then used for oxidative stress biomarkers assay, also small pieces were taken from the liver and the brain of each animal to be used in the biomolecular studies.

The results showed that mitochondrial deoxyribonucleic acid (mtDNA) deletion⁴⁸³⁴ bp, 8-hydroxy-2'-deoxy guanosine (8-OHdG), Malondialdehyde (MDA) and isoprostane (IsoP) significantly ($P < 0.01$) increased in the liver and brain of natural aged and D-gal. induced aging rats. Cellular mtDNA copy number is significantly ($P < 0.01$) increased also in liver and brain of natural aged and D-galactose induced aging rats in response to oxidative stress with the aging. Administration of antiaging biocompounds as GSE, GTE, PSE, GBE, LA and CPH significantly ($P < 0.01$) decreased mtDNA deletion⁴⁸³⁴ bp and 8-OHdG, mtDNA copy number, MDA and IsoP in liver and brain of normal aged rats and D-Galactose induced aging groups.

The data of this study showed a significant ($P < 0.01$) decrease in total antioxidant capacity (TAC), total glutathione (T.GSH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) of the liver and brain of rats and indicates that this decrease may be involved in the mechanisms of free radical induced damage to lipids, proteins and DNA during normal aging and chronic administration of D-galactose. Administration of antiaging biocompounds; GSE, GTE CPH significantly ($P < 0.01$) increased TAC, T.GSH, SOD, CAT levels of liver and brain in natural and D-gal induced aging rats. D-gal induced aging rats treated with LA significantly ($P < 0.01$) increased SOD and T.GSH in liver, T.GSH and TAC in brain. D-gal induced aging rats treated with PSE significantly ($P < 0.01$) increased liver SOD and T.GSH, brain SOD, CAT, T.GSH and TAC. D-gal induced aging rats treated with GBE significantly ($P < 0.01$) increased liver SOD, CAT, TAC and T.GSH, brain SOD, T.GSH and TAC.

Total non-heme iron and ferritin concentration of liver and brain were significantly ($P < 0.01$) increased in natural and induced aged rats. Treatment with GSE, GTE, PSE, GBE, LA and CPH significantly ($P < 0.01$) caused decrease of the non-heme iron in liver and brain of normal and induced ageing rats.

Significant ($P < 0.05$) elevation in serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphate (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT) and significant ($P < 0.05$) reduced of albumin (ALB) and total bilirubin (TBI) as a liver function biomarkers was shown in natural and D-gal. induced aging rats. D-gal induced aging rats treated with CPH showed a protective role in decreasing significantly ($P < 0.05$) the serum levels of AST, ALT, GGT with significant ($P < 0.05$) increasing in the serum ALB. D-gal induced aging rats treated with GSE significantly ($P < 0.05$) decreased serum levels of AST, ALP, ALT, GGT with significant ($P < 0.05$) increasing in the serum TBI.

D-gal induced aging rats treated with GTE significantly ($P < 0.05$) decreased serum levels of AST, ALP, ALT, GGT with significant ($P < 0.05$) increasing in the serum ALB and TBI. D-gal induced aging rats treated with LA, PSE and GBE significantly ($P < 0.05$) decreased serum levels of AST, ALT, GGT with significant ($P < 0.05$) increasing in the serum TBI.

Treatment of natural aged rats with CPH showed a potent protective role in decreasing significantly ($P < 0.05$) the serum levels of ALT, ALP and GGT with significant ($P < 0.05$) increasing in the serum TBI. Natural aged rats treated with GSE, showed significantly ($P < 0.05$) decreased serum levels of ALT and ALP with significant ($P < 0.05$) increasing in the serum ALB and TBI. Natural aged rats treated with GTE showed significantly ($P < 0.05$) decreased serum levels of ALT, AST, GGT and ALP with significant ($P < 0.05$) increasing in the serum ALB and TBI.

The levels of liver function biomarkers of serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK) significantly ($P < 0.05$) increased in natural and D-gal. induced aging rats. D-gal induced aging rats treated with GSE, GTE, GSE, GBE, LA and CPH showed a protective role in significantly decreasing the serum levels of LDH and CPK. Natural aged rats treated with

CPH and GTE showed significantly ($P<0.05$) decreased serum CPK while treated with GSE significantly ($P<0.05$) decreased serum LDH.

The levels of renal function biomarkers of serum urea and creatinine as a significantly ($P<0.05$) increased in D-gal induced aging rats and significantly ($P<0.05$) increased uric acid in natural aged rats.

Serum urea significantly ($P< 0.05$) decreased in D-gal induced aging rats treated with PSE and GBE. Serum creatinine significantly ($P< 0.05$) decreased in D-gal induced aging rats treated with GSE, GTE, PSE, GBE, LA and CPH. Uric acid significantly ($P< 0.05$) increased in D-gal induced aging rats treated with PSE and GBE.

Natural aged rats treated with CPH, GSE and GTE showed a protective role of these antiaging factors in decreasing significantly ($P<0.05$) the serum urea, creatinine and uric acid as a renal function biomarkers.

Body weight and organs weight (liver, heart and brain) were significantly ($P<0.05$) decreased in D-gal induced aged rats, treatment of rats with GSE, GTE, GPE, GBE, LA and CPH improves the body weight and organs weight.

In conclusion, this study demonstrates that aging induces a significant mtDNA oxidative damage and oxidative stress biomarkers in rats. Chronic administration of D-gal. accelerates aging via enhancing production of reactive oxygen species and advanced glycation ends products (AGE), this sequence of events results an oxidative stress and cellular damage. 9-week supplementation of GSE, GTE, PSE, GBE, LA and CPH supplementation suppresses senescence biomarkers and down regulates oxidative stress damage in the liver, heart, kidney and brain tissues of normal and D-gal.-induced aging rats.



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم

دراسة بايوجزيئية وفسلجية لبعض مضادات
الشيخوخة في مؤشرات شيخوخة الخلية الحيوانية
في الجرذان المسنة

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات نيل شهادة دكتوراه

فلسفة في

علوم الحياة / علم الفسلجة الحيوانية

من قبل

شوان حسين صوفي خانه

بإشراف

أ. الدكتور:

أ.م. الدكتورة: سراب داود سليمان
اسماعيل صالح كاكي

ربيع الاول ١٤٣٦ هجرية
كانون الثاني ٢٠١٥ ميلادية

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية ست وخمسون حيوانا من الجرذان الذكور الفتية Young male albino بأعمار أربعة اشهر و ذات أوزان بين ٢٨٠ - ٢٩٠ غراما و أربعة وعشرون حيوانا من الجرذان الذكور المسنة Aged male albino بأعمار أربعة وعشرون شهرا وذات أوزان بين ٤٢٠ - ٤٥٠ غراما. أجريت الدراسة في قسم علوم الحياة بكلية العلوم في جامعة الموصل، وفي مركز الأبحاث الطبية في جامعة هولير الطبية، للفترة ما بين كانون الثاني 2013 الى كانون الاول ٢٠١٤.

استهدفت الدراسة الحالية التحري عن خصائص مضادات الشيوخوخة لمستخلصات بذور العنب والشاي الاخضر وبذور الرمان وجينكو بيلوبا وكذلك المركبات الكيماوية المضادة للشيوخوخة حامض لبيويك α -Lipoic acid وسينتروفينوكسين Centrophenoxine في الجرذان المسنة طبيعيا و المستحثة بالكالاكتوز ودراسة تأثيرات هذه العوامل في بعض مؤشرات الحيوية الجزيئية والفسلجية للشيوخوخة الناتجة عن الضرر التأكسدي للخلايا في الجرذان المسنة طبيعيا والمستحثة بالكالاكتوز.

قسمت الدراسة الحالية الى فئتين من التجارب, الفئة الاولى أستخدمت فيها الجرذان المسنة المستحثة بالكالاكتوز والفئة الثانية أستخدمت فيها الجرذان المسنة طبيعيا باعمار اربعة وعشرون شهرا. في تجارب الفئة الاولى قسمت الجرذان الذكور الفتية باعمار أربعة اشهر عشوائيا الى ثماني مجاميع بواقع سبع جرذان لكل مجموعة, تركت المجموعة الاولى بدون أي معاملة واعدت مجموعة السيطرة وعوملت المجموعة الثانية من الجرذان بالكالاكتوز وعوملت المجموعة الثالثة بالكالاكتوز وسنتروفينوكسين وعملت المجموعة الرابعة بالكالاكتوز ومستخلص بذور العنب وعوملت المجموعة الخامسة بالكالاكتوز ومستخلص الشاي الاخضر وعوملت المجموعة السادسة بالكالاكتوز وحامض لبيويك وعوملت المجموعة السابعة بالكالاكتوز ومستخلص بذور الرمان وعوملت المجموعة الثامنة بالكالاكتوز ومستخلص جينكو بيلوبا. قسمت جرذان الفئة الثانية من التجارب الى أربعة مجاميع بواقع ست جرذان بعمر ٢٤ شهرا لكل مجموعة, تركت المجموعة الاولى بدون

أي معاملة واعدت مجموعة السيطرة وعوملت المجموعة الثانية بسينتروفينوكسين وعوملت المجموعة الثالثة بمستخلص بذور العنب وعوملت المجموعة الرابعة بمستخلص الشاي الاخضر .

بعد تسعة أسابيع من المعاملة اليومية لجميع المجاميع، جمعت عينات الدم من حيوانات مجموعتي التجارب و حفظ المصل المعزول في (-٨٠) درجة مئوية لأستخدامها فيما بعد في الاختبارات الكيموحيوية، وكذلك أخذت نماذج من أنسجة الكبد والمخ من جميع حيوانات التجارب وبعد معاملتها جمع رائق الكبد والدماغ المجانسة وحفظ في (-٨٠) درجة مئوية لأستخدامها لقياس المؤشرات الحيوية للأكسدة. كما تم أخذ قطع صغيرة من الكبد والمخ لكل حيوان لأستخدامها في الدراسات البايوجزيئية.

أظهرت النتائج زيادة معنوية ($P < 0.01$) في مستويات مؤشرات ازالة^{٤٨٣٤} للحامض المايتوكونديريا النووي Mitochondrial DNA deletion⁴⁸³⁴ bp و 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine وكذلك مستوى مالونداي الدهايد MDA والايسوبروستان Isoprostane في أنسجة الكبد والدماغ لمجموعات الجرذان المسنة طبيعيا و مجموعات الشيخوخة المستحثة بالكالاكوتوز. كما اظهرت زيادة معنوية ($P < 0.01$) في عدد نسخ الخلية لحامض النووي للمايتوكونديريا (mtDNA copy number) في الكبد والدماغ لمجموعات الجرذان المسنة صبيغيا و مجموعات الشيخوخة المستحثة بواسطة بالكالاكوتوز كاستجابة لحالة الإجهاد التأكسدي المرافق للشيخوخة الطبيعية والمستحثة.

أدت معاملة مجموعات الجرذان المستحثة الشيخوخة ومجموعات الشيخوخة الطبيعية بالمركبات الكيموحيوية، حامض لبيويك و سينتروفينوكسين وكذلك المستخلصات النباتية المضادة للشيخوخة، بذور العنب والشاي الاخضر وبذور الرمان وجينكوبيلوبا الى خفض معنوي ($P < 0.01$) في التلف المحدث بالاجهاد التأكسدي في حامض النووي المايتوكونديريا (mtDNA) و ازالة^{٤٨٣٤} لحامض النووي المايتوكونديريا ومستوى مالونداي الدهايد MDA والايسوبروستان Isoprostane في انسجة الكبد و الدماغ للجرذان المسنة طبيعيا و مجموعات الشيخوخة المستحثة بالكالاكوتوز .

أظهرت نتائج هذه الدراسة انخفاضا معنويا ($P < 0.01$) في المحتوى الكلي لمضادات الأكسدة ومستوى كلوتاتايون وفعالية أنزيمات المضادة للأكسدة، سوبراوكسايد ديسميتيز والكتليز في انسجة الكبد والدماغ للجرذان المسنة طبيعيا و مجموعات الشيخوخة المستحثة بالكالاكوتوز، ويدل هذا الانخفاض الى

زيادة أليات الكرب التأكسدي و ضرر الجذور الحرة للجزيئات الحيوية DNA وبروتين و الليبيدات خلال الشيخوخة الطبيعية والمستحثة بالكالاكتوز. أدت معاملة الجرذان المسنة طبيعيا و المستحثة بالكالاكتوز بالسيتروفينوكسين ومستخلصات بذور العنب والشاي الاخضر الى زيادة معنوية ($P<0.01$) في المحتوى الكلي لمضادة الأكسدة ومستوى كلوتاثاين وفعالية أنزيمات المضادة للأكسدة, سوبراوكسايد ديسميتز و الكتلز في الكبد و الدماغ. أدت معاملة الجرذان المستحثة الشيخوخة بالكالاكتوز بحامض لبويك الى زيادة معنوية ($P<0.01$) لمستوى الكلوتاثاين والسوبراوكسايد ديسميتز في أنسجة الكبد ومستوى الكلوتاثاين و المحتوى الكلي لمضادة الاكسدة TAC في أنسجة الدماغ. كما أدت معاملة الجرذان المستحثة الشيخوخة بالكالاكتوز بمستخلص بذور الرمان الى زيادة معنوية ($P<0.01$) لمستوى الكلوتاثاين والسوبراوكسايد ديسميتز و الكتلز في أنسجة الكبد و مستوى الكلوتاثاين والسوبراوكسايد ديسميتز في أنسجة الكبد و مستوى الكلوتاثاين والسوبراوكسايد ديسميتز و الكتلز في أنسجة الدماغ. و أدت معاملة الجرذان المستحثة الشيخوخة بالكالاكتوز بمستخلص جينكو بيلوبا الى زيادة معنوية ($P<0.01$) مستوى الكلوتاثاين والسوبراوكسايد ديسميتز و الكتلز و المحتوى الكلي لمضادة الاكسدة TAC في أنسجة الكبد و مستوى الكلوتاثاين والسوبراوكسايد ديسميتز و المحتوى الكلي لمضادة الاكسدة TAC في أنسجة الدماغ.

أدت الشيخوخة الطبيعية والمستحثة الى ارتفاع الكمية الكلية للحديد غير الهيمي Total non-heme iron و الفيريتين بشكل معنوي ($P<0.01$) في أنسجة الكبد والدماغ. أدت معاملة الجرذان المسنة طبيعيا والمستحثة بحامض لبويك و سينتروفينوكسين ومستخلصات بذور العنب والشاي الاخضر وبذور الرمان وجينكو بيلوبا الى خفض من كمية الكلية للحديد غير الهيمي Total non-heme iron و الفيريتين بشكل معنوي ($P<0.01$) في أنسجة الكبد والدماغ للجرذان في المجموعتين.

وكذلك أظهرت الدراسة تغيرا في مؤشرات وظائف الكبد في جرذان المسنة طبيعيا والمستحثة بالكالاكتوز. اذ أظهرت ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستويات أنزيمات ألانين ترانسفيريز ALT والاسبارتيت ترانسفيريز AST وألكلاين فوسفوتيز ALP وكاما كلوتاميل ترانسفيريز GGT وانخفاض معنوي ($P<0.05$) لمستويات الالبومين ALB والبيلبروبين الكلي TBI. ادت معاملة الجرذان الشيخوخة المستحثة بالكالاكتوز بالسيتروفينوكسين الى خفض مستويات AST و ALT و GGT بشكل معنوي ($P<0.05$)

وزيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستوى الالبومين. وأدت المعاملة بمستخلص بذور العنب الى خفض مستويات AST و ALT و ALP و GGT بشكل معنوي ($P < 0.05$) وزيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستوى البيليروبين الكلي TBI. وأدت المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر الى خفض مستويات AST و ALT و ALP و GGT بشكل معنوي ($P < 0.05$) وزيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستويات الالبومين والبيليروبين الكلي TBI. كما أدت معاملة الجردان الشيوخة المستحثة بالكالاكتور بحامض لبويك و مستخلص بذور الرمان والجينكو بيلوبا الى خفض مستويات AST و ALT و GGT بشكل معنوي ($P < 0.05$) وزيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستوى البيليروبين الكلي TBI.

أدت معاملة الجردان المسنة طبيعيا بالسينتروفينوكسين الى خفض مستويات ALP و ALT و GGT بشكل معنوي ($P < 0.05$) وزيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستوى البيليروبين الكلي TBI. وأدت معاملة الجردان المسنة طبيعيا بمستخلص بذور العنب الى خفض مستويات ALP و ALT بشكل معنوي ($P < 0.05$) وزيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستويات الالبومين والبيليروبين الكلي TBI. في حين أدت المعاملة بمستخلص الشاي الاخضر الى خفض مستويات AST و ALT و ALP و GGT بشكل معنوي ($P < 0.05$) وزيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستويات الالبومين والبيليروبين الكلي TBI.

أدت الشيوخة الطبيعية والمستحثة بالكالاكتور في الجردان الى ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) لمستويات أنزيمات وظائف القلب, كيراتين فوسفوكاينيز CPK ولاكتيك ديهيدروجينيز LDH. أدت معاملة الجردان المستحثة الشيوخة بالكالاكتور بمستخلص بذور العنب و الشاي الاخضر وبذور الرمان وجينكو بيلوبا وحامض لبويك و سينتروفينوكسين الى خفض مستويات أنزيمات وظائف القلب LDH و CPK بشكل معنوي ($P < 0.05$). أدت معاملة الجردان الشيوخة الطبيعية بمستخلص الشاي الاخضر وسينتروفينوكسين الى خفض مستوى CPK بشكل معنوي ($P < 0.05$), بينما أدت معاملتهم بمستخلص بذور العنب الى خفض مستوى LDH بشكل معنوي ($P < 0.05$).

أدت الشيوخة الطبيعية والمستحثة بالكالاكتور في الجردان الى ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) لمستويات اليوريا والكرياتينين وانخفاض معنوي ($P < 0.05$) لمستوى حامض يوريك. أدت معاملة الجردان الشيوخة المستحثة بالكالاكتور بمستخلص جينكو بيلوبا وبذور الرمان الى خفض من مستوى اليوريا بشكل

معنوي ($P < 0.05$)، وأدت معاملة الجردان الشيخوخة المستحثة بالكالاكتورز بمستخلص بذور العنب والشاي الاخضر وبذور الرمان وجينكو بيلوبا وحامض لبيويك و سينتروفينوكسين الى خفض في مستوى الكيرياتينين بشكل معنوي ($P < 0.05$). كما أدت معاملة الجردان الشيخوخة المستحثة بالكالاكتورز بمستخلص جينكو بيلوبا وبذور الرمان الى زيادة من مستوى حامض اليوريك بشكل معنوي ($P < 0.05$). وكذلك أدت معاملة الجردان الشيخوخة الطبيعية بمستخلص بذور العنب والشاي الاخضر وسينتروفينوكسين الى خفض من مستويات اليوريا والكيرياتينين و الحامض يوريك بشكل معنوي ($P < 0.05$).

أدت الشيخوخة الطبيعية والمستحثة بالكالاكتورز في الجردان الى انخفاض وزن الجسم و وزن الكبد والقلب والدماغ بشكل معنوي ($P < 0.05$). وأدت معاملة هذه الجردان بمستخلص بذور العنب والشاي الاخضر وبذور الرمان وجينكو بيلوبا وحامض لبيويك و سينتروفينوكسين الى الحد من فقدان وزن الجسم والاعضاء.

تستنتج من هذه الدراسة أن الشيخوخة تحث الضرر التأكسدي للحامض النووي للمايتوكوندريا (mtDNA) والمؤشرات الحيوية للكرب التأكسدي بشكل معنوي في الجردان. وان المعاملة المزمدة بالكالاكتورز تسرع الشيخوخة خلال زيادة إنتاج أنواع الاكسجين الفعالة والجذور الحرة و نواتج التسكر (AGE) محدثة الكرب التأكسدي وتلف الخلايا. ان معاملة الحيوانات المسنة طبيعيا و المستحثة بالكالاكتورز بمركبات و مستخلصات نباتية مضادة للشيخوخة مثل مستخلص بذور العنب و الشاي الاخضر وبذور الرمان وجينكو بيلوبا وحامض لبيويك وسينتروفينوكسين تؤدي الى خفض اثار الشيخوخة ومؤشراتها الحيوية.