SY9300249

# FINAL REPORT FOR SCIENTIFIC RESEARCH

## INFLUENCE OF B-ADRENOCEPTOR STIMULATION ON THE METABOLISM OF C18 UNSATURATED FATTY ACIDES IN ISOLATED HEART OF RAT

DR. SAMAR MAKDISSI

DEPARTMENT OF RADIOBIOLOGY AND HEALTH

AECS-B/FRSR 65 FEBRUARY 1993

ATOMIC ENERGY COMMISSION P.O. BOX 6091 DAMASCUS SYRIA

We regret that some of the pages in the microfiche copy of this report may not be up to the proper legibility standards, even though the best possible copy was used for preparing the master fiche

SY9300249

# تقرير نهائي عن بحث علمي

## تأثير تنشيط مستقبلات بيتا على استقلاب الحموض الدسمة غير المشبعة ذات ١٨ ذرة كربون في قلب الجرذ المعزول

الدكتورة سمر مقدسي

قسم البيولوجيا والصحة الاشعاعية

هـ ط ذ س ـ ب /ت ن ب ع ٦٥

شباط ١٩٩٣

هيئة الطاقة الذرية

سورية ـ دمشق ـ ص. ب ٦٠٩١

الجمهورية العربية السورية
هيئـــة الطاقـــة الذريـــــة

قسم البيولوجيا والصحة الاشعاعية

# تأثير تنشيط مستقبلات بيتا على استقلاب الحموض الدسمة غير المشبعة ذات ١٨ ذرة كربون في قلب الجرذ المعزول

الدكتورة سمر مقدسـي

هـ ط ذ س ب/ت ن ب ع ٦٥ — شـباط ١٩٩٣

حقـوق النشـر

يسمح بالنسخ والنقل عن هذه المادة العلمية للاستخدام الشخصي بشرط الاشارة الى المرجع ،
أما النسخ والنقل لأهداف تجارية فغير مسموح بهما الا بموافقة خطية مسبقة من ادارة الهيئة ٠

الفهـــرس

الصفحـــــة


| | |
|---|---|
| ١ ـ الملخـــص | ١ |
| ٢ ـ المقـدمـــة | ٢ |
| ٣ ـ المواد والطرائق والقياسات | ٦ |
| ٣ ـ ١ ـ الحيوانات | ٦ |
| ٣ ـ ٢ ـ المواد والتجهيزات | ٦ |
| ٣ ـ ٣ ـ الطرائق والقياسات | ٨ |
| ٣ ـ ٣ ـ ١ ـ جهاز القلب المعزول | ٨ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٢ ـ تحضير الحيوان | ٩ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٣ ـ تحضير سائل التروية | ٩ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٤ ـ قياسات القنص ونسبة $CO_2$ المتشكل | ١٠ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٥ ـ معالجة النســيج | ١٠ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٦ ـ تحاليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة | ١١ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٦ ـ ١ ـ فصل الدسم الاجمالية | ١١ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٦ ـ ٢ ـ فصل الكارنتين عن الدسم الفوسفورية | ١٢ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٦ ـ ٣ ـ فصل الاسترات الميتيلية للحموض الدسمة | ١٢ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٧ ـ عد الاشعاع | ١٣ |
| ٣ ـ ٣ ـ ٨ ـ الحسابات الاحصائية | ١٣ |
| ٤ ـ النتـائــج | ١٤ |
| ٤ ـ ١ ـ توزع الحموض الدسمة المدروسة ( 18:1 , 18:2 , 18:3 ) في القلب المعـزول . | ١٤ |
| ٤ ـ ٢ ـ تأثير تنشيط B على استقلاب 18:1 , 18:2 , 18:3 في القلب المعـزول . | ١٥ |
| ٥ ـ المناقشة | ١٩ |
| ٥ ـ ١ ـ تأثير تنشيط B | ٢٠ |

٥ ـ ٢ ـ تفاعلات نزع الرابط المضاعف ٢١

٦ ـ التوصيات ٢٢

٧ ـ كلمة شكر ٢٢

٨ ـ المراجع ٢٣

## ١ ـ الملخص

درس تأثير تنشيط مستقبلات B على استقلاب كل من حمض 18:1n-9 ، 18:2n-6 . و 18:3n-3 في قلب الجرذ المعزول والمروى بطريقة لانغندورف . اجريت التجارب على مرحلتين ، الاولى ادخل فيها كل من الحموض الدسمة المدروسة بمفرده ضمن سائل كريبس بشكل موسوم بالكربون ـ ١٤ ومعقد مع الالبومين . وفي المرحلة الثانية اضيف الايزوبروتيرينول ( $M\ 10^{-4}$ ) الى المزيج السابق لاحداث تنشيط مستقبلات B القلبية .

تبيّن ان القلب يستخلص كلاً من 18:1 و 18:3 بمعدل يفوق معدل استخلاص 18:2 ، وان سرعة اكسدة 18:1 هي الاعلى بين الحموض الثلاثة المدروسة والتي تشابهت في نمط استرتها بحيث أُدخلت كلها في زمرة ثلاثيات الغليسريد بشكل رئيسي ( ٦٥ ـ ٦٦ ٪ ) وبشكل اقل في الدسم الفوسفورية ( ١٦ ـ ١٨ ٪ ) ، بينما لم تشكل ثنائيات الغليسريد والحموض الدسمة الحرة الا مركبات ثانوية سرعان ماتتحول الى الزمر الاخرى الاكثر ثباتاً .

كذلك لوحظت تفاعلات نزع الرابط المضاعف بالنسبة لكل من 18:1 الذي يتحول الى مشتقات ثلاثية الرابط و 18:3 الذي يتحول الى مشتقات رباعية ، خماسية ، وسداسية الرابط ، وذلك ضمن مجموعة ثلاثيات الغليسريد .

كان حمض 18:3 اقل الحموض تأثراً بتنشيط B . مال معدل قنص 18:2 نحو زيادة طفيفة في حين انخفض معدل قنص 18:1 مما قد يشير الى تنافس بينه وبين الحمض المختزن داخل الخلية. كذلك ازداد معدل اكسدة 18:1 بالاضافة الى معدل ادخاله في ثلاثيات الغليسريد والدسم الفوسفورية على حد سواء ، بنفس الصورة ازدادت اكسدة 18:2 ، اما استرته فتغير اتجاهها بحيث ارتفع معدل ادخاله ضمن الدسم الفوسفورية مقابل انخفاض ادخاله ضمن ثلاثيات الغليسريد .

يمكن القول بموجب ذلك ان 18:1 يلعب دوراً حساساً على مستوى انتاج القدرة المباشرة الى جانب دوره كمكوّن للدسم الفوسفورية المتوضعة في الاغشية الخلوية ، بينما يتوجه استقلاب 18:2 بصورة اكبر نحو الدسم الفوسفورية .

## ٢ المقدمة :

تشكل الدسم مع السكريات مصادر الطاقة الرئيسية بالنسبة للعضلة القلبية ، ( crass et al,1970 ) . وتعد الدسم وقود القلب المفضل لانها اكثر انتاجاً للـ ATP ( Neely and Morgan, 1974 ) . يقوم القلب باستقلاب الدسم وفق المراحل التالية

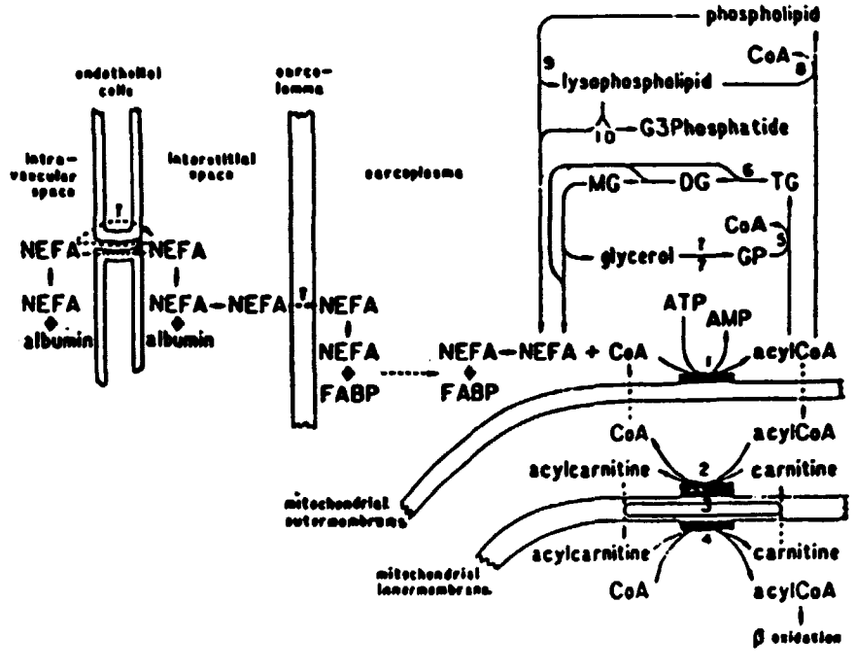



FIGURE 2. Schematic representation of the carnitine uptake and metabolism of NEFA (= FFA). FABP, fatty acid binding protein; CoA, coenzyme A; GP, = glycerolphosphate; TG, triacylglycerol; DG, diacylglycerol; MG, monoacylglycerol; G3 Phosphatide, glycerol 3-phosphatide; 1, fatty acylCoA synthetase; 2, carnitine fatty acyltransferase I; 3, acylcarnitine-carnitine translocase; 4, carnitine fatty acyltransferase II; 5, glycerolphosphate acyltransferase + diacylglycerolacyltransferase; 6, triacylglycerol lipase; 7, glycerol kinase; 8, lysophospholipid acyltransferase; 9, phospholipase; 10, lysophospholipase; ◆, binding to protein; |, equilibrium.

( الشكل ـ ١ ـ )

الطرق الاستقلابية الرئيسية للدسم داخل الخلية القلبية

van der vusse and Reneman , 1984

ـ قنص الحموض الدسمة ( uptake ) من الدم الجاري وادخالها ضمن الخلية

ـ تنشيط الحمض الدسم الحر ، وبمعنى آخر ربطه مع الـ CoA ليشكل Acyl CoA الذي يتجه اما نحو الاسترة او الاكسدة :

الاسترة هي طريق التخزين ، وفيها يدخل الـ Acyl CoA في احدى الرمر التالية : غليسريدات ( احادية ، ثنائية ، او ثلاثية ) ، استرات الكولسترول ، ودسم فوسفورية . (الشكل ـ ١ ـ)

وتعد وحيدات الغليسريد واسترات الكولسترول زمراً ثانوية بالنسبة الى الخلية القلبية (van der vusse et al; 1982;Al Makdessi et al;1987) .

اما الاكسدة فهي الطريق الفوري لانتاج الـ ATP ، وتتم في الماتيوكوندريا التي يدخلها الـ AcylCoA بشكل Acyl carnitine ( الشكل ـ ٢ ـ )

والتي بموجبها تشطر ذرات الحمض الدسم الى وحدات ثنائية ( Acetyl CoA ) تدخل حلقة كريبس وتشكل $CO_2$ ، وتتضمن هذه السلسلة مركبات وسيطة بعدد كبير كلها ذوابة في الحموض تعطي الى جانب $CO_2$ مقياساً لشدة الاكسدة .

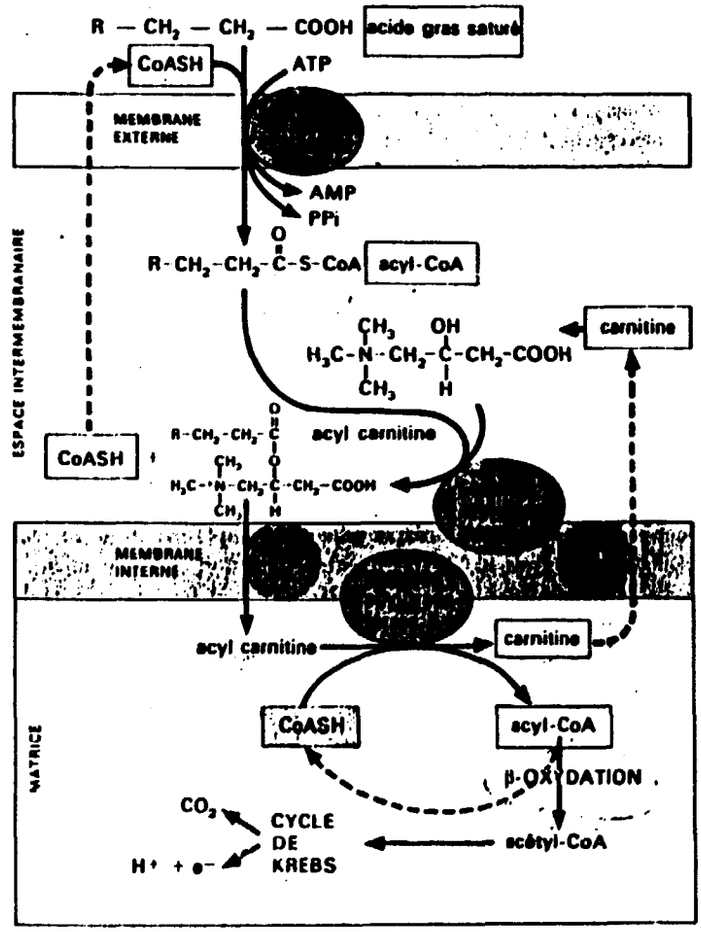


**Figure 9.31**
**Entrée des chaînes d'acides gras dans la matrice.**
La membrane externe et la membrane interne interviennent successivement dans ce processus. Les acyl-CoA synthétases de la membrane externe transforment les acides gras en acyl-CoA qui passent alors dans l'espace intermembranaire. Une carnitine acyltransférase de la membrane interne catalyse le transfert de l'acyl-CoA à la carnitine donnant l'acyl carnitine qui traverse la membrane interne grâce à un transporteur spécifique. Dans la matrice, l'acyl carnitine est scindée en carnitine et acyl-CoA grâce à une autre carnitine acyltransférase de la membrane interne. La carnitine retourne dans l'espace intermembranaire sans doute à l'aide d'un transporteur spécifique de la membrane interne. Dans la matrice l'acyl-CoA subit la β-oxydation. La membrane interne étant imperméable à l'acyl-CoA, son entrée dans la matrice se fait grâce à la navette carnitine.




الشكل ـ٢ ـ اكسدة الحموض الدسمة داخل الخليـة
(Biologie et physiologie Cellulaires II , 1978)

يتميز القلب بنسبة اكسدة عالية اذا ماقورن باعضاء اخرى كالكبد ، نظراً لحاجته المستمرة الى القدرة لكي يتقلص .

يستعمل قلب الجرذ المعزول بشكل واسع جداً لدراسة التفاعلات الاستقلابية ( Williamson and kobayashi;1984 ) ، ذلك ان الدراسة ضمن العضوية ( in vivo ) تتعرض لمشاكل تعدد وتداخل العوامل المؤثرة ، في حين ان عزل العضو يسمح بالتحكم بشروط وعوامل التجربة ، وعلى هذا الاساس وضع ( Neely et al;1967 ) نظام القلب المعزول وفيه عرفت اهمية السكريات والمواد الدسمة ، الا ان ٩٩ ٪ من الدراسات التي اجريت على الدسم تناولت فقط حمض النخل ( 16:0 ) الذي هو حمض مشبع وعليه بنيت الاستنتاجات الاوليـة .

ان انتشار الطرق الكروماتوغرافية في اوائل الثمانينات هو الذي سمح بتفريق الزمر والحموض الدسمة في الاوساط الحيوية ، فاظهر تمايزها تجاه التفاعلات الاستقلابية ، وكشف عن وجود فروق في سرعة التفاعلات تبعاً لطول السلسلة ( Bremer and Norum,1982 ) ، لعدد الروابط المضاعفة ، وحتى لمواضع التماكب الموضعي او الهندسي (Lawson and kummerow,1979)

كما تبين من خلال هذه الدراسات ان الحموض ذات ١٨ ذرة كربون تلعب دوراً محورياً في انتاج القدرة داخل الخلية القلبية ، الامر الذي يشير الى وجود انظمة خمائرية اصطفائية .

هناك دور آخر تميزت به الحموض ذات ١٨ ذرة كربون والمسماة بالحموض الدسمة الاساسية ( Essentialfatty acids ) وهو دورها كطلائع في اصطناع الحموض الدسمة ذات السلسلة الاطول ، وذلك وفق المخطط التالي ( الشكل ـ ٣ ـ ) .

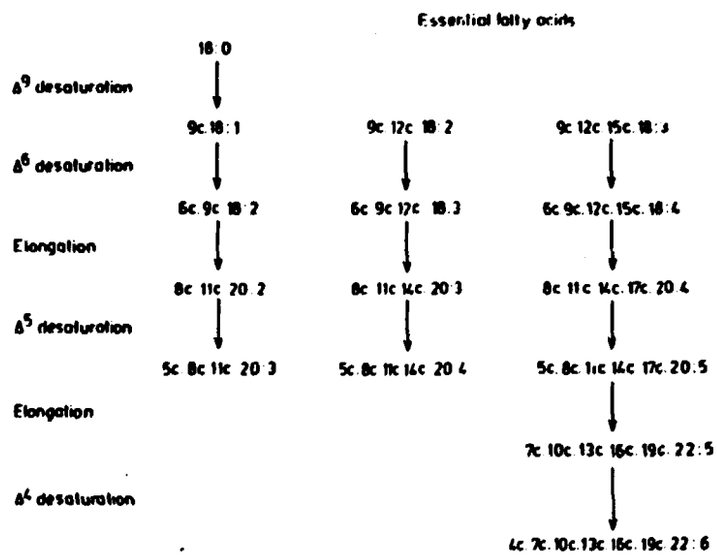



Fig. 3. Unsaturated fatty acid biosynthesis.

الشكل ـ٣ ـ تفاعلات نزع الرابط المضاعف اطالة السلسلة

Jeffcoat and James 1984

تنتمي الحموض الدسمة ذات ١٨ ذرة كربون الى ٣ زمر رئيسية ( Sprecher , 1981 ) :

ـ زمرة ( n-9 ) التي يقع اخر روابطها المضاعفة على الكربون التاسع بالنسبة الى جذر المتيل النهائي ، مثل حمض الزيت 18:1,n-9 .

ـ زمرة ( n-6 ) التي يقع اخر روابطها المضاعفة على الكربون السادس بالنسبة الى جذر المتيل النهائي ، مثل حمض 18:2,n-6 .

ـ زمرة ( n - 3 ) التي يقع آخر روابطها المضاعفة على الكربون الثالث بالنسبة الى جذر الميتل النهائي ، مثل حمض 18:3,n-3.

لدى دراسة كل من 18:1,n-9 ، 18:2,n-6 ، و 18:3,n-3 وجد انها تختلف عن بعضها في سرعة اكسدتها وفي نمط استرتها ، سواء في قلب الجرذ المعزول ( vasdev and kako ,1977 ) او في قلب الكلب داخل العضوية (van der vusse et al,1982) مما يؤكد على دورها الاستقلابي المختلف الذي مازال موضع تساؤل ، اما عن كونها طلائع لحموض اخرى ، فقد امكن اظهار ذلك في الخلايا الكبدية المعزولة ( Hagve and christophersen,1983 ) في خلايا الكلية ( chern and kinsella, 1983 ) ، وفي الصفيحات الدموية ( lagarde et al , 1985 ) ، الا ان المعطيات الخاصة بالخلايا القلبية ماتزال محدودة جداً حتى الآن ( Hagve and Sprecher, 1989 ).

حين يطلب من القلب عمل اضافي كما في حالات الجهد ، افراز الكاتيكولامينات او تنشيط مستقبلات B ، فان استهلاكه للقدرة سوف يزداد ، وبشكل اخص استهلاكه للدسم ( Oram al , 1973;Mjøs,1971 ) ، ولثلاثيات الغليسريد تحديداً ( crass et al,1975 ) ولدى دراسة هذه الظاهرة على قلب الكلب داخل العضوية ( Al Makdessi et al;1987 ) وجد ان تنشيط B يسبب حلمهة ( تحريك ) ثلاثيات الغليسريد في النسيج البطيني الشحمي وفي داخل القلب . وضمن هذه المجموعة لوحظت التغيرات الاعظمية على الحموض غير المشبعة ذات ١٨ ذرة كربون ، وبدرجات متفاوتة تبعاً لصيغتها ( 18:1,cis ,18:2 ,18:3n-3 ,18:3n-6 ).

الا ان الدراسة داخل العضوية تطرح مشكلة التداخل بين الحمض الدسم الخارجي المصدر ( الوارد ) ، وذلك المختزن ضمن الخلية ، كما سبق وذكر ، بحيث تكون النتيجة محصلة اجمالية لذلك طرحت الدراسة الحالية للتفريق بالدرجة الاولى بين هذين المصدرين بحيث تنحصر في المصدر الخارجي فقط . الى جانب ذلك يتناول الموضوع الحموض الدسمة الثلاثة الرئيسية 18:1n-9 18:2n-6 ، 18:3n-3 بغية ادخالها الى القلب بشكل موسوم بالكربون ـ ١٤ وبتراكيز قريبة جداً من التراكيز الفيزيولوجية بحيث تدرس في مرحلة اولى طرق استقلابها الرئيسية معدل القنص ، الاكسدة ( تشكل $CO_2$ والمشتقات المؤكسدة التي تسمى ايضاً المشتقات الذوابة في الحموض ) ، الاسترة ( التوزع في كل من الغليسريدات الثنائية والثلاثية ، الدسم الفوسفورية ، والحموض الدسمة الحرة ) ، التحول الى حموض بعدد روابط اعلى .

في مرحلة ثانية يدرس تأثير تنشيط B على كل من النقاط المذكورة سابقاً وبالنسبة لكل حمض بمفرده .

## ٢ ـ المواد والطرائق والقياسات

### ٢-١ ـ الحيوانات

أجريت التجارب على جرذان ذكور من السلالة البيضاء ( white Albino ) وزنها ( 185± 31 g, n=40 ) تمت تربيتها في حظيرة مركز الدراسات والبحوث العلمية . كانت هذه الحيوانات تجلب يوم التجربة نفسه او قبله بيوم او يومين . وكانت تترك لها حرية تناول الغذاء والماء حتى موعد التجربة . اما تركيب الغذاء المصنع محلياً فكان على النحو التالي :

| اسم المادة العلفية | النسبة المستخدمة ٪ |
|---|---|
| نخالة | ٢٦ر٢١٥ |
| شعير | ٢٦ر٢١٥ |
| ذرة صفراء | ٢٦ر٢١٥ |
| كسبة قطن مقشورة | ١٠ر٥٢٦ |
| كسبة صويا | ٥ر٢٦٢ |
| مسحوق لحم او عظم | ٥ر٢٦٢ |
| | ٪ ٩٩ر٩٩٧ |

### ٢ - ٢ ـ المواد والتجهيزات :

استخدمت في البحث مواد كيميائية عالية النقاوة بعضها من السوق المحلية و بعضها الآخر طلب مباشرة من الشركات المصنعة :

ـ تضمنت المواد التي احضرت من السوق المحلية المذيبات ( كلوروفورم ، ايتر اسيتون ، ايزواوكتان ، هيكزان ، بنزن ، ميتانول ، ايتانول مطلق . ايتانول ٩٥ ٪ ) مصدرها شركة ميرك Merck ( المانيا ) او Riedel de Hahn ( المانيا ) ، الاملاح ( كلور الصوديوم ، كلور البوتاسيوم ، فوسفات احادية البوتاسيوم ، كربونات الصوديوم ، بيكربونات الصوديوم ، ثاني كرومات البوتاسيوم ، كلور الكالسيوم ، كبريتات المغنزيوم ) ، الاسس ( ماءات البوتاسيوم ، ماءات الصوديوم ) والحموض ( حمض كلور الماء ، حمض الكبريت ، حمض الخل ، ايتلين دي امين رباعي الخل ( EDTA ) مصدرها شركة ميرك Merck ( المانيا ) او ماي اند بيكر M&B ( بريطانيا ) ، مواد اخرى ( غلوكوز ، سيليكا جيل Silicagel G60, Silicagel 60 $F_{254}$ ) مصدرها شركة ميرك Merck ( المانيا ) .

ـ مواد طلبت مباشرة من الشركة الاصلية :

حموض دسمة بشكل حر وبشكل استرات متيلية
cis- oleic acid (18:1n-9), trans-oleic acid(18:1n-9), linoleic acid (18:2), linolenic acid(18:3n-3), stearic acid(18:0), 20:4, 20:5, 22:4 22:6, 16:0, 16:1n-7, 18:3n-6

مصدرها شركتا سيغما sigma و Nu check Prep ( الولايات المتحدة الامريكية )

كاشف البور ثلاثي الفلور المنحل في الميتانول ( $BF_3$-20% in methanol )

مصدره شركة ميرك Merck ( المانيا ) .

مضاد الاكسدة بوتيل هيدروكسي تولوين BHT مصدره شركة فلوكا Fluka السويسرية .

الايزوبروتيريينول هيدروكلوريد مصدره شركة سيغما sigma الامريكية وكذلك

الالبومين المنقى من الحموض الدسمة ( Bovine serum Albumin, fraction V, fa tty acid free )

ـ طلبت كل الحموض الدسمة المشعة من شركة اميرشام Amersham البريطانية

بحيث كان نشاطها الاشعاعي كالتالي :

1 - $^{14}C$ 18:1 , specific activity 52.3mci/m mol

1 - $^{14}C$ 18:2 , specific activity 56.7 mCi/ mmol

1 - $^{14}C$ 18:3 , specific activity 56 mCi/ mmol

اما المذيبات المائية والعضوية الخاصة بجهاز الومضان السائل ( كوكتيل ) فقد طلبت من شركة LKB البريطانية .

كذلك استعملت في البحث غازات ( $N_2$ , $O_2$ , $CO_2$ ) محلية المصدر ، وتم مزج غازي $O_2$ و $CO_2$ بالاستعانة بمقاييس تدفق دقيقة مصدرها شركة Cole parmer الامريكية .

تتألف التجهيزات بشكل رئيسي من زجاجيات القلب المعزول ، من معدات كروما توغرافيا الطبقة الرقيقة ، ومن عداد الومضان السائل .

طلبت زجاجيات القلب المعزول من شركة Biomedix البريطانية ، وتتألف من مجموعة مستودعات مصنوعة من زجاج عالي النقاوة وذات جدار مضاعف ليسمح بمرور تيار ماء ساخن ، لهذه المجموعة متممات تتضمن :

مضخة دوارة Peristaltic pump مع حمام مائي ومنظم حراري مصدرها شركة Bioblock الفرنسية .

مقياس حموضة pH meter مصدره شركة WTW الالمانية .

مجموعة ترشيح Millipore مع مراشح اقطار مساماتها ٨ر٠ و ٤٥ر٠ ميكرون مصدرها شركة Millipore الامريكية .

مجموعة وصلات مصنوعة من مادة Tygon ذات النقاوة العالية تم طلبها من شركة Bioblock الفرنسية .

مضخة دوارة اخرى تعمل احياناً بشكل مرافق للاولى تم تصميمها في قسم الصيانة في هيئة الطاقة الذرية .

مسجل ثنائي القنال تمت استعارته من مركز الدراسات والبحوث العلمية .

اما مجموعة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة فتتألف من :

طاولة طلاء مع ذراع مصدرها شركة Desaga الالمانية .

صفائح زجاجية ، سيرينغات ، لمبة UV ( ٢٥٤ ، ٣٦٦ نانومتر ) مصدرها شركة Camag السويسرية .

احواض زجاجية مع اغطية مصدرها محلي .

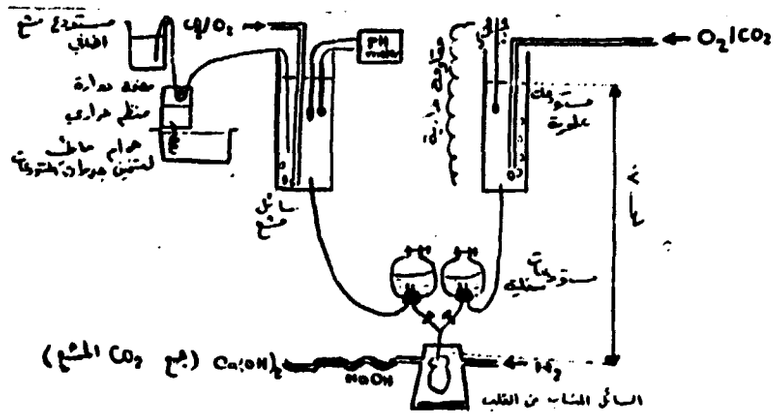
تم استخدام عداد الومضان السائل ( Liquid scintillation Counter ) العائد الى قسم الزراعة في الهيئة ومصدره شركة Packard الامريكية .

كذلك تطلب البحث تصنيع او تعديل بعض القطع والادوات الزجاجية بالتعاون مع ورشة الزجاجيات في مركز الدراسات والبحوث العلمية . وفي القسم الاخير من البحث حيث كثر التعامل مع المواد المشعة تم استعمال ما امكن من المعدات البلاستيكية ذات الاستعمال الوحيد لتفادي احتمال التلوث .

## ٣ ـ ٢ الطرائق والقياسات

### ٣ ـ ٢ ـ ١ جهاز القلب المعزول

تم تركيب جهاز القلب المعزول وفق المخطط التالي ( الشكل ـ ٤ ـ )





الشكل ـ ٤ ـ جهاز القلب المعزول

يعبأ المستودع الاول بـ ٢٠٠ مل من سائل كريبس الحاوي للاملاح الاساسية والغلوكوز ، بينما يعبأ المستودع الثاني بـ ٢٠٠ مل من سائل كريبس الحاوي للاملاح والغلوكوز اضافة الى الحمض المشع المدروس والايزوبروتيرينول ( في المجموعات التي تدرس تأثير تنشيط بيتا ) . توجد على الوصلة النهائية صنابير تسمح بالمرور بسرعة من احد المستودعين الى الاخر . كذلك ثبتت مقاومة خارجية اضافية تسمح بضبط الحرارة طوال العمل ، كما غمس مسرى قياس الحموضة ومجس حراري في المستودع الحاوي للمادة المشعة لاخذ قراءة مستمرة لكل من درجة الحموضة والحرارة . اضافة الى ذلك تم ايصال مزيج غازي $O_2$ ، $CO_2$ الى المستودعين بواسطة انبوب تايغون قطره الداخلي $\frac{3}{8}$ " بحيث تدخل فقاعات كبيرة بشكل بطيء ومنتظم ضمن السائل ،

## ٢ – ٢ – ٢ ـ تحضير الحيوان :

يوزن الجرذ ويخدر بالايتر ثم يفتح قفصه الصدري وتقص الاضلاع بأقصى سرعة ممكنة . يقص القلب ويغمس فوراً في محلول كلور الصوديوم ٩ر٠ ٪ المثلج بحيث يتوقف عن النبض . يجرد الابهر ويدخل ضمن القنية المخصصة له ويفتح صنبور التروية الحاوية للاملاح والغلوكوز فتظهر النبضات خلال الثواني الاولى من دخول السائل وتنتظم خلال ٢ ـ ٣ دقائق . يترك القلب فترة ١٠ دقائق للتوازن يقاس خلالها النبض وحجم السائل المنساب من الاوعية الاكليلية ثم تقلب التروية الى السائل الحاوي للحمض الدسم المشع ويوضع القلب ضمن حجرة مغلقة يعبرها الازوت بمعدل ٢ مل / دقيقة وتتصل من احدى جهاتها بانبوبين زجاجيين موصولين على التسلسل يحوي كل منهما ٥ر١ مل NaOH,1M لجمع غاز $CO_2$ (الشكل ٤) تفيد هذه الحجرة ايضاً في جمع السائل المنساب طوال التجربة . يسجل النبض في كل من الدقائق ١ ، ٥ ، ١٠ ، ١٥ . في الدقيقة ١٥ ترفع الحجرة ويُحبَس النسيج البطيني في ملقط مبرد بالازوت السائل ، ويحفظ بدرجة ـ ١٩٦° لحين سحقه .

## ٢ – ٢ – ٣ ـ تحضير سائل التروية :

يتألف سائل كريبس المعدّل من المواد التاليـة :

NaCl(141.45mM), KCl(4,7mM), $KH_2PO_4$(1,2mM), $NaHCO_3$(21.9mM),

$CaCl_2$(2.5mM), glucose (5,5mM), $Na_2$-EDTA(0.6mM)

ويتم تحضيره بمزج المواد مع بعضها ، عدا كلور الكالسيوم الذي يضاف قبل التجربة مباشرة منعاً لترسيبه .

يضاف الحمض الدسم الى سائل كريبس بشكل معقد مع الالبومين بنسبة ١ / ١ ، وهي النسبة الفيزيولوجية . هذا وقد اضيف الحمض الدسم المشع بحيث يكون تركيز الاشعاع بحدود ١٠ ميكروكوري / ليتر ، ثم اضيفت كمية من الحمض الدسم الموافق بحيث بلغت التراكيز الجزيئية النهائية لكل من الحموض المدروسة المقادير التالية :

| | |
|---|---|
| 18:1n-9 | :100mmol/l |
| 18:2 | :50mmol/l |
| 18:3 | :5mmol/l |

يحضر المعقد وفقاً لطريقة ( Crass et al; 1969 ) والمعدلة وفق طريقة ( Mooney & Lane , 1981 ) و ( Soltys & Hsia , 1977 ) : تؤخذ الكمية المطلوبة من الحمض الدسم محلولة في الكلوروفورم او التولوين ويبخر المذيب حتى الجفاف . تعاد اذابة الحمض الدسم بأقل كمية ممكنة من الكحول المطلق ويضاف ضعف هذا الحجم من كربونات الصوديوم ٥ ٪ مع التسخين الخفيف حتى الجفاف يذاب ملح الحمض الدسم بالماء المقطر المسخن الى الدرجة ٥٠° ـ ٦٠° ثم يضاف على سائل كريبس الحاوي للاملاح والالبومين والمسخن الى الدرجة ٣٥° ـ ٤٠° مع التحريك بحيث يتشكل

مزيج رائق ومتجانس . في تجارب دراسة تأثير تنشيط B اضيف الايزوبروتيرينول في المرحلة الاخيرة بشكل ملح كلوري بمقدار $10^{-4}$M ( Takenaka & Takeo,1976 ) .

ينقى السائل الناتج بترشيحه عبر مراشح قطر مساماتها ٠٫٨ ميكرون ، وعند استعماله يسخن الى الدرجة ٣٧ ويمرر فيه مزيج ( $O_2$ : $CO_2$ ) ( ٩٥ : ٥ ) . يختبر ثبات درجة الحموضة عند 7.4 ± 0.03

قسمت الحيوانات الى ست مجموعات تمت ترويتها كما يلي :

1) 18:1n-9
2) 18:1n-9 + isoproterenol
3) 18:2
4) 18:2 + isproterenol
5) 18:3n-3
6) 18:3n-3 + isoproterenol

## ٢ ـ ٢ ـ ٤ ـ قياسات القنص ونسبة $CO_2$ المتشكل

يحتوي السائل المنساب من الاوعية الاكليلية على كمية من الاشعاع يعود قسم منها الى الحمض الدسم المطروح ( غير المستعمل من قبل القلب ) بينما يعود القسم الاخر منها الى $CO_2$ المتشكل والمنحل ضمن السائل ، لذا تؤخذ في نهاية كل تجربة عينة من سائل كريبس وعينتان من السائل المنساب ، يعد الاشعاع في الاولى ، بينما تحمض الثانية الى PH ( ١ ) لطرد $CO_2$ المنحل ثم يؤخذ العد المتبقي فيها بحيث يكون :

$CO_2$ المنحل : الاشعاع في السائل المنساب قبل التحميض ـ الاشعاع في السائل المنساب بعد التحميض .

القنص : الاشعاع في سائل كريبس ـ الاشعاع في السائل المنساب بعد التحميض ، وذلك وفق طريقة ( Vasdev & Kako ,1976 ) .

الى جانب ذلك يجمع $CO_2$ المنطلق في ٠٫١ مل NaOH ( Evans et al; 1963 ) وتضاف كميته الى $CO_2$ المنحل .

توضع كل العينات المراد عدها في الاوعية الخاصة بجهاز الومضان السائل ويضاف اليها ١٠ مل كوكتيل مائي ثم تؤخذ للعد .

## ٢ ـ ٢ ـ ٥ ـ معالجة النسيج

يسحق النسيج البطيني بدرجة ـ ١٩٦° في هاون مبرد بالازوت السائل وفق طريقة ( Van der vusse et al; 1980 ) ويوزع مسحوق كل نسيج على انبوبي استخلاص مبرّدين الى درجة الحرارة نفسها بعد وزن المسحوق في كل من الانبوبين يضاف الى ... تخلط المشتقات المؤكسدة بالرج لمدة ٣٠ ثانية ( vortex )

٢٥٠٠ دورة بالدقيقة ويعد الاشعاع فيسه .

اما القسم الثاني فتستخلص منه الدسم الاجمالية بمزيج كلوروفورم : ميثانول ( حـاو لمضاد اكسدة BHT بنسبة ٠١ر٠٪ ) ( ٢ : ١ ) ( Folch et al;1957 ) وذلك بالرج لمدة ٢٠ ثانية . ثم يضاف ١ مل كلوروفورم + ١ مل NaCl ( ٧٣ر٠٪ ) ( Emilsson & Gudbjarnason,1981 ) وتفصل الاطوار بواسطة التثفيل بسرعة ٥٠٠٠ د / دقيقة لمدة ٥ دقائق ، تجمع الطبقة العضوية وتبخر بدرجة ٤٠° تحت الازوت وتحفظ في البراد .

## ٢ - ٣ - ٦ تحاليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

أجريت هذه التحاليل وفق ٣ مراحل :

### ٢ - ٣ - ٦ - ١ : فصل الدسم الاجمالية :

اجري الفصل في خلاصة النسيج البطيني المحلولة في ١٥٠ ميكروليتر كلوروفورم ، وذلك على صفائح زجاجية مطلية بالمخبر بطبقة من Silicagel G60 تبلغ ثخانتها ٢٥ر٠ مم . بعد التجفيف والتنشيط لمدة ٣٠ ـ ٦٠ دقيقة بدرجة ٩٠ تطبق عليها عينة ( ٢٠ ـ ٤٠ ميكروليتر ) بشكل خطي كما يطبق مزيج عياري معلوم على صفيحة منفصلة . يتم الرحلان في احواض مشبعة بالمذيبات ( فترة الاشباع : ٥ ـ ٢٤ ساعة ) وذلك على مرحلتين ( Jaeger et al,1976 ) :

المرحلة الاولى : رحلان لمسافة ٥ سم فوق خط القاعدة ضمن مزيج المذيبات :

| | |
|---|---|
| بنزن | ٥٠ |
| ايتير | ٥٠ |
| ميثانول | ٥ر٠ |
| حمض الخل | ١ |

بعد التجفيف في الجو المحيط تنقل الصفائح الى الحوض الثاني الحاوي للمزيج :

| | |
|---|---|
| هيكزان | ٩٠ |
| ايتير | ٢٠ |
| حمض الخل | ١ |

حيث تترك العينات للهجرة حتى الحد الاعلى للصفيحة .

يتم اظهار البقع التي رحلت على الصفيحة العيارية بواسطة رذاذ من الرودامين ب ( ٠١ر٠٪ في الايتانول ) الذي يلونها بالاحمر . اما عينات النسيج فتلون باليود الذي يظهرها لبضع دقائق ثم يتصعّد ، مما يكفي لتحديد مواقع كل من الدسم الفوسفورية ( PL ) ، احاديات الغليسريد ( MG ) ثنائيات الغليسريد ( DG ) الكولسترول ( C ) والحموض الدسمة الحرة ( FFA ) ، ثلاثيات الغليسريد ( TG ) واسترات الكلولسترول ( CE ) .

## ٢ـ ٦ ـ ٢ فصل الكارنتين عن الدسم الفوسفورية

تفصل الكارنتين عن باقي مركبات الدسم الفوسفورية بواسطة رحلان ثنائي البعد ( Wittels & Bressler,1965 ) ( vasdev & Kako , 1977 ) على صفائح زجاجية ابعادها ٢٠ × ٢٠ سم مطلية بطبقة سيليكاجيل G 60 سماكتها ٢٥ر٠ مم ومنشطة كما ذكر في الفقرة السابقة . توضع العينة بشكل نقطي في احدى الزوايا وتفرق في الاتجاه الاول في حوض مشبع بالمزيج التالي :

| | |
|---|---|
| كلوروفورم | ٥٠ |
| ميتانول | ٢٥ |
| ماءات النشادر | ٢ |
| ماء مقطر | ٣ |

وذلك حتى مسافة لاتقل عن ١١ سم ابتداء من نقطة البداية ، ثم تجفف لمدة ١٠ دقائق في جو المخبر ثم ٢٠ دقيقة بدرجة ٦٠ ، وتعود وتوضع في اتجاه عمودي على الاتجاه الاول في حوض يحوي المزيج التالي :

| | |
|---|---|
| كلوروفورم | ٥٠ |
| ميتانول | ٢٥ |
| حمض الخل | ٨ |
| ماء مقطر | ٤ |

حيث تترك حتى يرحل المزيج الى مسافة ١٢ سم .
بعد التجفيف تُلَوَّن البقع باليود الذي يظهر الكارنتين بشكل واضح جداً ، وتحدد البقع بالمقارنة مع مزيج شاهد . تنقل البقعة الموافقة للكارنتين الى جانب بقعة تحتوي على الدسم الفوسفورية الاجمالية ويتم العد كما ذكر سابقاً .

## ٢ ـ ٣ ـ ٦ ـ ٢ ـ فصل الاسترات المتيلية للحموض الدسمة

درست امكانية حصول تفاعلات نزع الرابط المضاعف في زمر ثلاثيات الغليسريد وفق الخطوات التالية :

اجري تفاعل شطر للرابط الاستري مع اضافة مجموعة ميتيل ( Transesterification ) بحيث تعزل الحموض الدسمة المؤسترة في ثلاثيات الغليسريد بشكل استرات ميتيلية وذلك حسب طريقة ( Morrison & smith,1964 ) .

تؤخذ كمية من السيليكا جيل الحامل لثلاثيات الغليسريد الى انبوب بيركس ذات غطاء محكم ، ويضاف اليها :

يغلق الانبوب بشكل محكم تماماً ويوضع في حمام مائي درجة حرارته ١٠٠ درجة لمدة ٣٠ دقيقة . يوقف التفاعل بالتبريد ويضاف ٥ر١ مل كربونات الصوديوم ٥ ٪ + ٢ مل ايزواكتان تستخلص الاسترات الميثيلية للحموض الدسمة بالرج لمدة ٣٠ ثانية وتفصل الطبقة العلوية بالتثفيل لمدة دقيقتين بسرعة ٢٥٠٠ دورة / بالدقيقة . تبخر الطبقة العضوية ويعاد حلها في ٨٠ ميكروليتر كلوروفورم وتؤخذ منها عينة ( ٢٠ ـ ٤٠ ميكروليتر ) للتفريق .

يجري التفريق على صفائح زجاجية ( ٢٠ × ١٠ سم ) مطلية في المخبر بطبقة سماكتها ٥ر٠ مم سيليكاجيل G60 يحوي ٥٪ نترات فضة . تنشط الصفائح لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة ٦٠°، وتطبق عليها العينة بشكل خطي ، ويتم التفريق في احد الوسطين التاليتين :

( البنزن (Murawski & Egge, 1975 الذي يفصل الحموض الدسمة المشبعة ، احادية الرابط المضاعف شكل cis وشكل Trans ، ثنائية،وثلاثية الرابط المضاعف .

وسط كلوروفورم ٩٠

ميتانول ١٠

الذي يفصل الحموض الدسمة ذات الروابط الثنائية ، الثلاثية ، الرباعية ، الخماسية ، والسداسية ( Robinson et al, 1990 ) يتم الاظهار بواسطة كاشف ٢ ، ٧ دي كلوروفلوو سيئن وتحدد اماكن البقع بالمقارنة مع مزيج شاهد ، ثم تنقل البقع الموافقة لكل رابط الى انبوب خاص بجهاز الومضان ويتم عدها بوجود ١٠ مل كوكتيل عضوي .

## ٢ ـ ٢ ـ ٧ عـد الاشعاع :

قبل عد العينات بجهاز الومضان السائل تختبر فعالية العد بواسطة محلول عياري يحتوي على ١ ميكروكوري كربون ـ ١٤ ( بلغت فعالية العد بصورة مستمرة ٩٦ ـ ٩٧ ٪ ) .

يؤخذ معدل العدات في الدقيقة ( Counts per minute ) بعد عد كل عينة مرتين لمدة ١٠ دقائق كل مرة . يجري التصحيح اوتوماتيكياً في الجهاز بطريقة اللشعع الخارجي External standard .

## ٢ ـ ٢ ـ ٨ الحسابات الاحصائية

اخذ المتوسط الحسابي والانحراف العياري للنتائج ، واجريت التحاليل الاحصائية بين المجموعات باستخدام اختبار ستودنت ( Student t/test ) واعتبر الحد الادنى للدلالة الاحصائية هو ( $P < 0.05$ )

٤ ـ النتـائـــج :

٤ ـ أ ـ توزع الحموض الدسمة المدروسة ( 18:1 ، 18:2 ، 18:3 ) في القلب المعزول

تفاوتت النسبة التي اقتنصها القلب من كل من الحموض الدسمة المدروسة ، وكما يبين الجدول ـ ١ اتى 18:3 في المرتبة الاولى ، وتلاه 18:1 ، واخيراً 18:2 ، بحيث كان اختلاف 18:2 عن كل من 18:1 و 18:3 ذا دلالة احصائية ( $P< 0.001$ ) .

الجدول ( ١ )

| الحمض الدسم الداخل الى القلب | معدل القنص | معدل تشكل $CO_2$ | المشتقات المؤكسدة |
|---|---|---|---|
| 18:1 | 39.22 ± 3.6 (n=6) | 22.4 ± 15.8 (n=6) | 6495 ± 4618 (n=5) |
| 18:2 | 16.07 ± 6.4 (n=6) | 14.17 ± 9.2 (n=6) | 25724 ± 7282 (n=6) |
| 18:3 | 44.62 ± 14.1 (n=8) | 16.9 ± 10.97 (n=8) | 168580 ± 45066 (n=8) |

معدل القنص ، معدل تشكل $CO_2$ وتشكل المشتقات المؤكسدة ( الذوابة في الحموض ) بعد التروية بكل من 18:1 ، 18:2 و 18:3 الموسومة بالكربون ـ ١٤ ( المتوسط ± الانحراف المعياري ) يقدر القنص بشكل نسبة مئوية قياساً الى الكمية الواردة الى القلب ، ويقدر تشكل $CO_2$ كنسبة مئوية قياساً الى القنص . اما المشتقات المؤكسدة فتقدر بعدد عدات الكربون ـ ١٤ في الدقيقة لكل غرام نسيج رطب ( CPM/g wet weight ) .

كذلك اختلفت الحموض الدسمة في طريقة توزعها ضمن النسيج البطيني ، ففيما يخص المؤشر الاول لتفاعلات الاكسدة الذي هو تشكل $CO_2$ تدرج ترتيب الحموض كما يلي :

18:1 > 18:3 > 18:2 ( الجدول ـ ١ ـ ) ، الا ان النسب كانت متقاربة ولم يكن الاختلاف معنوياً ، في حين ظهرت اختلافات ذات دلالة احصائية في معدل تشكل المشتقات المؤكسدة سواء بين 18:1 - 18:2 ( $p<0.01$ ) ، بين 18:2 - 18:3 ( $p<0.01$ ) ، وبين 18:2 - 18:3 ( $p<0.01$ ) ، وكان ترتيب الحموض كما يلي :

18:3 > 18:2 > 18:1 ( الجدول ـ ١ ـ ) .

اما استرة الحموض الدسمة المشعة الواردة الى القلب فقد تبين ان اهم اشكالها هي ثلاثيات الغليسريد التي تشكل بمفردها حوالي ثلثي المركبات المؤسترة ، تليها الدسم الفوسفورية ( ١٦ ـ ١٨ ٪ من المركبات المؤسترة ) ، في حين تشكل الحموض الدسمة الحرة وثنائيات الغليسريد نسباً

| حمض الدسم الداخل الى القلب | ثلاثيات الغليسريد ( TG ) | الدسم الفوسفورية ( PL ) | ثنائيات الغليسريد DG | الحموض الدسمة الحرة FFA |
|---|---|---|---|---|
| 18:1 | 66.6 ± 5.9 (n=6) | 16.9 ± 2.9 (n=6) | 8.7 ± 6.3 (n=6) | 7.4 ± 4.8 (n=6) |
| 18:2 | 65.2 ± 5.4 (n=6) | 18.6 ± 5.9 (n=6) | 5.4 ± 3.7 (n=6) | 10.6 ± 4.9 (n=6) |
| 18:3 | 65.6 ± 10.8 (n=8) | 16.9 ± 3.4 (n=8) | 4.9 ± 1.8 (n=8) | 10.0 ± 7.0 (n=8) |

الجدول ( ٢ )

توزع الحموض الدسمة الموسومة بالكربون ـ ١٤ في دسم النسيج البطيني للقلب المعزول . يعبر عن النتائج بشكل نسب مئوية ( متوسط ± انحراف معياري ) .

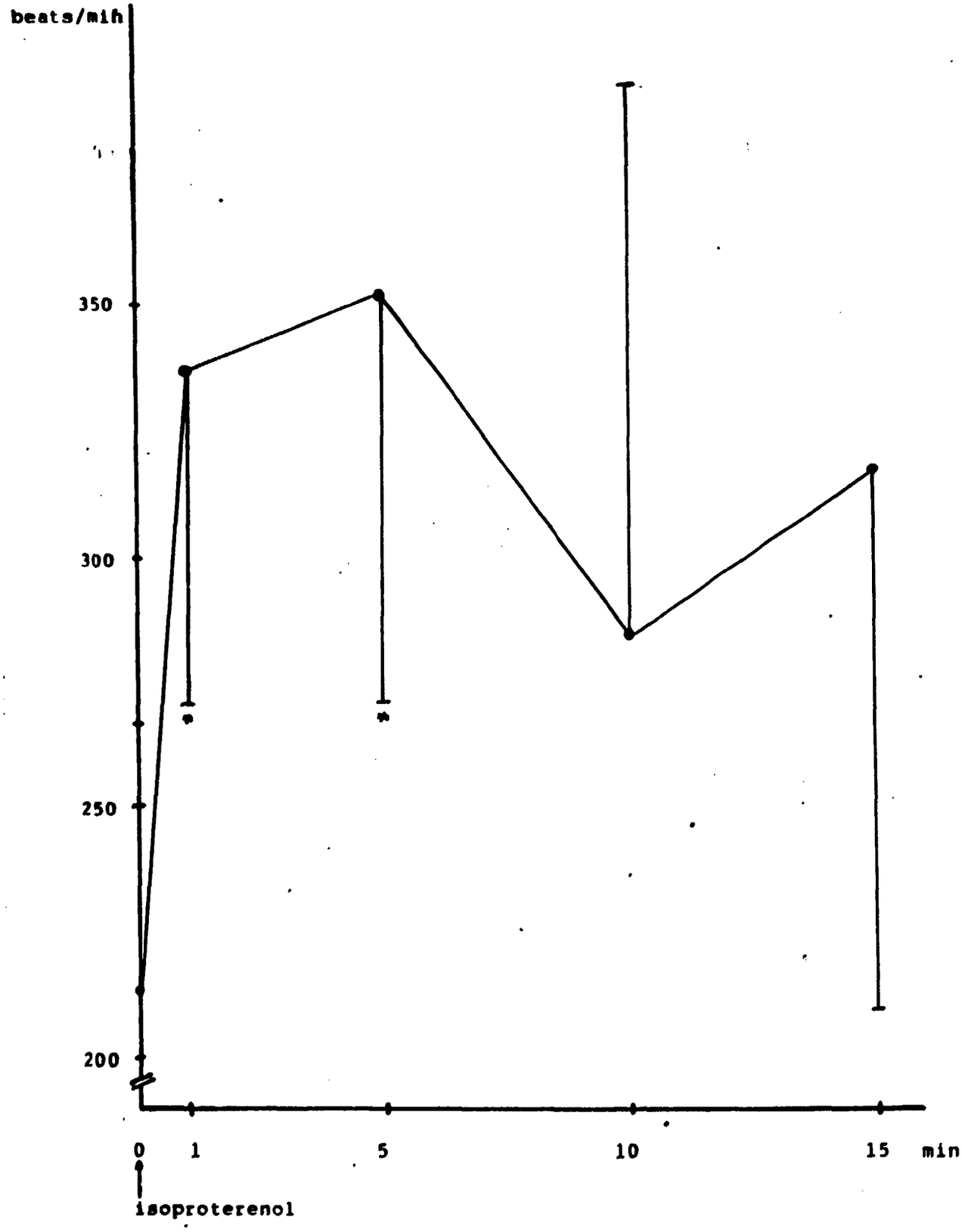
تشكل مشتقات الكارنتين ( شوائب ) تستخلص جزئياً مع الدسم وتتوضع فوق حزمة الدسم الفوسفورية نظراً لطابعها القطبي جزئياً . عند عزل هذه المشتقات وجد انها تمثل آثاراً تتراوح مقاديرها من صفر الى ١٥ ٪ ، لذا امكن الاستفادة من قيمها لمعرفة مقدار الاشعاع المتركز في الدسم الفوسفورية حصراً .

درست تفاعلات نزع الرابط المضاعف على زمرة ثلاثيات الغليسريد فقط ذلك ان مقدار الاشعاع المتركز في الزمر الاخرى كان أضعف من الحد الادنى اللازم لتجاوز الا ماع على صفائح نترات الفضة . لم تكشف اية تفاعلات من هذا النمط لدى حمض 18:2 بينما امكن كشفها بوضوح في خلاصات الانسجة التي ادخل اليها الحمضان الآخران ، اذ تبين من جهة ان 18:1٪ يتحول جزئياً ضمن ثلاثيات الغليسريد الى حموض ثلاثية الرابط المضاعف تشكل 38.2 ± 18.2% (n=6) من مجمل الحموض الدسمة المؤسترة في هذه الزمرة . اما في خلاصات الانسجة المروية بحمض 18:3 ، فقد كشف عن الاشعاع في الحزم الموافقة لكل من الحموض ثلاثية الرابط ( 58.4 ± 2.8 %.n=8 ) ، رباعيــة الرابط ( 32.5 ± 25.4%, n=8 ) ، خماسية الرابط ( 4.75 ± 4.2 %, n=8 ) سداسية الرابط ( 4.3 ± 6.8 % , n=8 ) .

٤ – ٢ـ تأثير تنشيط B على استقلاب 18:1 ، 18:2 ، و 18:3 في القلب المعزول

ادت اضافة الايزوبروتيرينول الى سائل التروية الى زيادة آنية في سرعة النبض كانت ذات دلالة احصائية منذ الدقيقة الاولى ( P<0.02 ) وبقيت هكذا في الدقيقة الخامسة ( P < 0.02 ) كما هو مبين في (الشكل ـ ٥ ـ) وبغض النظر عن الحمض المدروس . كذلك لوحظت زيادة واضحة جداً في قوة التقلص منذ الدقيقة الخامسة لبداية التروية .

ترافق تنشيط B مع اختلاف في معدل قنص الحموض الدسمة المدروسة ، ففي حين ارتفع معدل قنص 18:2 بشكل بسيط (الجدول ـ ٢ ـ) انخفض قنص كل من 18:1 ( p < 0.001 ) و 18:3 ( P < 0.05 )



الشكل - ه
تأثير تنشيط بيتا على نظم القلب . تمثل كل نقطة المتوسط ± الانحراف المعياري (n=7) . تشير * الى $p < 0.02$

الجـدول ( ٢ )

| الحمض الدسم الداخل الى القلب | معدل القنص | المشتقات المؤكسدة |
|---|---|---|
| 18:1 | 39.22 ± 3.6 (n=6) | 6495 ± 4618 (n= 5) |
| 18:1+تنشيط B | 14.5 ± 5.2 (n=7) | 21 337 ± 7783 (n=6) |
| النتيجة الاحصائية | $p < 0.001$ | $P < 0.01$ |
| 18:2 | 16.07 ± 6.4 (n=6) | 25 337 ± 7783 (n=6) |
| 18:2+تنشيط B | 22.54 ± 6.78 (n=7) | 32321 ± 11699 (n=6) |
| النتيجة الاحصائية | / | / |
| 18:3 | 44.62 ± 14.1 (n=8) | 168 580 ± 45065 (n=8) |
| 18:3+تنشيط B | 29.39 ± 6.09 (n=6) | 102 858 ± 14429 (n=6) |
| النتيجة الاحصائية | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |

تأثير تنشيط B على معدل قنص وعلى تشكل المشتقات المؤكسدة بعد التروية بكل من 18:1، 18:2، 18:3 الموسومة بالكربون ـ ١٤ ( متوسط ± انحراف معياري ) .

يقدر معدل القنص بشكل نسبة مئوية قياساً الى كمية الاشعاع الواردة الى القلب ، وتقدر المشتقات المؤكسدة بشكل عدد عدات الكربون ـ ١٤ في الدقيقة لكل غرام نسيج رطب CPM / g wet weight .

اما التغيرات الاستقلابية المرافقة فكانت على النحو التالي :

لم يتأثر معدل تشكل $CO_2$ باضافة الايزوبروتيرينول في حين كانت التغيرات واسعة على مستوى تشكل المشتقات المؤكسدة ( الجدول ـ ٢ ) ، اذ لوحظت زيادة ذات دلالة ( $P < 0.01$ ) مع حمض 18:1، وزيادة ابسط مع حمض 18:2 ، في حين لوحظ انخفاض ( $P < 0.005$ ) مع حمض 18:3 . كذلك تغيرت نسب استرة الحموض الدسمة المشعة في كل من الدسم الفوسفورية وثلاثيات الغليسريد ( الجدول ـ ) ـ ) بينما بقيت ثنائيات الغليسريد والحموض الدسمة الحرة تشكل نسباً ضعيفة ( ٢ ـ ١٠ ٪ ) لم تختلف عن نسبها السابقة . كان الاتجاه بالنسبة الى الحموض الثلاثة المدروسة نحو زيادة ادخالها ضمن زمرة الدسم الفوسفورية ، وكانت هذه الزيادة ذات دلالة ( $p < 0.05$ ) بالنسبة الى كل من 18:1 و 18:2 . بالمقابل انخفض معدل ادخال 18:2 في ثلاثيات الغليسريد ( $P < 0.01$ ) في حين زاد ادخال 18:1 في هذه الزمرة بشكل طفيف ، اما 18:3 فلم يتغير توزعه بشكل ملحوظ .

| الحمض الدسم الداخل الى القلب | الدسم الفوسفورية PL | ثلاثيات الغليسريد TG |
|---|---|---|
| 18:1 | 16.9 ± 2.9 (n=6) | 66.6 ± 5.9 (n=6) |
| 18:1 تنشيط B | 24.7 ± 5.0(n=6) | 69.0 ± 4.3 (n=6) |
| النتيجة الاحصائية | $p < 0.05$ | / |
| 18:2 | 18.6 ± 5.9(n=6) | 65.2 ± 5.4 (n=6) |
| 18:2 تنشيط B | 30.3 ± 9.4(n=6) | 54.8 ± 10.1 (n=6) |
| النتيجة الاحصائية | $p < 0.05$ | $p < 0.01$ |
| 18:3 | 16.9 ± 3.4(n=8) | 65.6 ± 10.8 (n=8) |
| 18:3 تنشيط B | 19.6 ± 5.9 (n=6) | 63.9 ± 7.2 (n=6) |
| النتيجة الاحصائية | / | / |

الجدول ( ٤ )

تأثير تنشيط B على استرة كل من 18:1 ، 18:2 ، 18:3 الموسومة بالكربون

– ١٤ في كل من الدسم الفوسفورية و ثلاثيات الغليسريد ٪

النتائج بشكل نسب مئوية ( متوسط ± انحراف معياري ) .

الى جانب ذلك لوحظت زيادة في الحموض منزوعة الرابط المضاعف بعد التزوية بكل من 18:1 و 18:3 ، الا ان هذه الزيادات لم تصل الى حدود الدلالة الاحصائية .

## ٥ ـ المناقشة :

يستخلص القلب الحموض الدسمة الواردة اليه بشكل يتناسب من جهة مع تراكيزها في السائل خارج الخلايا ومن جهة اخرى مع حاجته الاستقلابية لها ( Evans et al;1963 )

وتشير نتائجنا الى وجود تنص اصطفائي بحيث كان معدل استخلاص 18:1 و 18:3 من قبل القلب اعلى من معدل استخلاص 18:2 ، وقد ذكر ( vasdev and kako,1977 ) نسب تنص اعلى بقليل مما ورد لدينا ، الا ان المقارنة المباشرة غير ممكنة نظراً لاختلاف نظام التروية .

يدخل الحمض الدسم الخلية بشكل حر الا انه لايستمر طويلاً على هذه الحالة ، كما يمكن ان نستنتج من خلال نسب الاشعاع المنخفضة التي وجدت في زمرة الحموض الدسمة الحرة ، وهذه النتيجة متوافقة تماماً مع ماسبق ونشر ، سواء بخصوص الحموض الموسومة ( vasdev and kako,1976;vasdev and kako,1977) او غير الموسومة (van der vusse and Reneman 1984 ; Al Makdessi et al;1987) ، اذ ان الحمض الدسم الحر سرعان ما يرتبط بالـ CoA ليشكل الـ Acyl CoA (Van der vusse and Reneman ; 1984 ) الذي هو الشكل القابل للاستقلاب داخل الخلية .

يتجه الـ Acyl CoA باحد اتجاهين : اما الاكسدة التي هي الشكل المباشر لانتاج القدرة او الاسترة التي هي الشكل التخزيني . وقد دلت النتائج المبينة في الجدول ـ ١ ـ على وجود اختلاف في معدلات انتاج $CO_2$ وفي تشكيل المشتقات المؤكسدة التي هي مركبات وسيطة في سلسلة تفاعلات انتاج $CO_2$ ففي حين نتجت اعلى نسبة $CO_2$ عن التروية بحمض 18:1 فان المشتقات المؤكسدة كانت اعظمية بعد التروية بحمض 18:3 ، وبامكاننا ان نستنتج بالتالي ان اكسدة حمض 18:1 هي الاسرع ، تليها اكسدة 18:2 بينما يأتي 18:3 في المرتبة الاخيرة ، وبفارق كبير نظراً لتراكم كميات كبيرة جداً من المشتقات المؤكسدة نسبة الى الحمضين الآخرين . وقد سبق وتوصل باحثون اخرون ( vasdev and kako ,1977 ) الى الاستنتاج نفسه من خلال نموذج تروية مختلف بعض الشئ ، الا انه لم تنشر بعد ـ ضمن حدود معرفتنا نتائج حول تجارب اجريت بشروط مماثلة .

شكلت ثنائيات الغليسريد ، مثلها مثل الحموض الدسمة الحرة ، مقادير ضئيلة ، ذلك انها هي بدورها مراحل وسيطة في سلسلة الاسترة ، في حين تركز الاشعاع بصورة خاصة في ثلاثيات الغليسريد ، الامر الذي لوحظ بشدة سواء في القلب المعزول ( Crass et al;1971;vasdev and kako 1976,vasdev andkako1977 ) او في الخلايا القلبية المعزولة ( Hagve and sprecher, 1989) . كذلك توافقت نتائجنا الخاصة بالاسترة ضمن زمرة الدسم الفوسفورية مع نتائج ( vasdev and kako ,1977 ).تؤكد هذه المعطيات على ان ثلاثيات الغليسريد تشكل مستودعات للقدرة ( schoonderwoerd etal;1989 )

والجدير بالذكر هنا انه لم تلاحظ اية اصطفائية بين الحموض الدسمة المدروسة .

٥ ـ ١ تأثير تنشيط B

يستدعي تنشيط مستقبلات B القلبية طلب مصادر قدرة اضافية لتلبية الحاجة المتزايدة الناجمة عن زيادة سرعة النبض وقوة التقلص ، كذلك تزيد الحاجة الى الاوكسجين . وقد تم ضبط هذا الموضوع تماماً في ، اثناء اجراء التجارب بحيث اشبعت سوائل التروية بالاوكسجين لمدة ٢٠ ـ ٦٠ دقيقة قبل تعليق القلب . ومن الضروري ان نكون شديدي الحذر في تفسير نتائجنا ومقارنتها مع نتائج الآخرين ، ذلك لان استهلاك القدرة من قبل القلب متعلق مباشرة بشروط الحيوان ، بشروط التروية ( ارتفاع المستودعات ، طريقة ادخال السائل ... ) ، بصيغة الحمض الدسم ، وبتركيزه ، وبتركيز الغلوكوز .

بامكاننا ان نعزو انخفاض معدل انقنص الملاحظ في اثناء تنشيط B والذي خص كلاً من 18:1 و18:3 الى وجود تنافس بين الحمض الدسم الوارد ( خارجي المصدر ) والحمض الدسم المخزن ضمن النسيج ( داخلي المصدر ) ، ذلك ان تنشيط B يحرك ثلاثيات الغليسريد المخزنة في النسيج وينشط حلمهتها ( Crass et al,1975;Al Makdessi et al1987 ) . ويبدو ان الحموض الدسمة تختلف في هذه النقطة ، فقنص حمض 18:2 لم يتناقص ، لابل مال نحو الزيادة ، كذلك لاحظ آخرون ( Crass et al, 1975 ) بالنسبة الى 16:0 . ويبدو من مجمل المعطيات الخاصة بحمض 18:3 ان هذا الاخير لايشكل مصدراً مباشراً للطاقة في حالة تنشيط B نظراً لانخفاض نسبة قنصه ونسبة تحوله الى مشتقات مؤكسدة دون ان يرافق ذلك تغير في توزعه ضمن الزمر المؤستسرة .

على العكس من ذلك تماماً لوحظت زيادة في استهلاك حمض 18:1 ، سواء باتجاه الاكسدة او الاسترة ، بحيث ارتفعت نسبة ادخاله في كل من الدسم الفوسفورية وثلاثيات الغليسريد . اما الملاحظ بالنسبة الى 18:2 ، فهو انعكاس في اتجاه الاسترة بحيث توجهت بشكل خاص نحو الدسم الفوسفورية ، والتي يعرف عنها انها من مكونات الاغشية الخلوية ، ومن المنطقي ان تستقطب هذه الزمرة اليها المزيد من الحموض الدسمة في حالة زيادة قوة التقلص وتسريع النبض والجدير بالذكر ان العكس هو الذي يحدث في حالات الخلل ، اذ يؤدي قصور التروية الى حلمهة الدسم الفوسفوريسة وتحرر الحموض الدسمة الحرة التي لها آثار مخربة ضمن الخلية ( van der vusse et al,1984 Chien et al ;1984 ) ويدل الاختلاف في اتجاه الاسترة مابين حمضي 18:1 و18:2 على وجود تنظيم نوعي على مستوى نقل ثنائيات الغليسريد التي هي المنعطف بين تشكل كل من الدسم الفوسفورية وثلاثيات الغليسريد ( vasdev and kako ;1977 ) .

هناك سؤال قيد الطرح وهو : كيف يوازن القلب بين مصادر الطاقة الخارجية ومصادر الطاقة المخزنة لديه في حالة تنشيط B ؟ لايمكن الاجابة عن هذا السؤال الا باجراء وسم مزدوج بحيث نتمكن من متابعة المصدرين بآن واحد .

ومن خلال مجمل الملاحظات التجريبية ( Masters and Glaviano ,1972 ) يرجح وجود حلقة مستمرة ( استرة ـ حلمهة ) ، بحيث تكون المرحلة الاولى من الاستقلاب هي ادخال الـ Acyl CoA ضمن ثلاثيات الغليسريد ثم يعاد الحمض الدسم ويحلمه ومن ثم يدخل سلسلة

الاكسدة ، وهذه الحلقة نوعية وتكون انشط ما يمكن بالنسبة الى احاديات الرابط المضاعف ( Al Makdessi et al ,1987 ) . اما الاسترة ضمن زمر الدسم الفوسفورية فهي ما تزال موضع الدراسة .

٥ - تفاعلات نزع الرابط المضاعف

اختبرت هذه التفاعلات لمعرفة ما اذا كان القلب يستخدم الحمض الدسم الوارد اليه كما هو ام انه يحوله الى حموض اخرى لدى استرته .

لم يكن بالامكان ، ضمن الطرق التحليلية المستخدمة الا ان نجيب جزئياً عن هذا السؤال وذلك لسببين :

١ - يتطلب التفريق على صفائح نترات الفضة كميات كبيرة نسبياً من العينة لم يكن بالامكان توفيرها الا بالنسبة ثلاثيات الغليسريد ، في حين كان من الضروري اختبار زمر الدسم الفوسفوريية .

٢ - لم يكن بالامكان اختبار تفاعلات اطالة السلسلة التي هي ملازمة لنزع الرابط المضاعف ذلك ان نترات الفضة تقوم بالتفريق على اساس عدد الاربطة المضاعفة وليس على عدد ذرات الكربون فالحزمة الموافقة مثلاً لرباعيات الرابط المضاعف هي مزيج من ( 18:4 + 20:4 + 22:4 ) لذا لم تتم متابعة تحولات الحموض المدروسة بشكل كامل .

بالرغم من ذلك تبين لنا ان كلاً من 18:1 و 18:3 يخضع الى تفاعلات نزع رابط مضاعف اثناء ادخاله في ثلاثيات الغليسريد في حين لم يكن ذلك حال 18:2 .

كذلك لم يكشف ( Hagve and sprecher , 1989 ) عن تفاعلات نزع رابط بالنسبة الى 18:2 ، لافي القلب المعزول ولافي الخلايا القلبية المزروعة . وبالنظر الى وجود مشتقات ثلاثية الرابط المضاعف بكميات لايستهان بها في ثلاثيات الغليسريد الناتجة عن 18:1 ، بالامكان طرح فكرة وجود مرحلة استقلابية ( او اكثر ؟ ) مشتركة بين كل من 18:1 و 18:3 الا ان التحقق من هذه الفكرة يستدعي دراسات اكثر تعمقاً واستخدام طرائق تحليلية ادق .

## ٦ ـ التوصيات

ان تنشيط B هو الحالة التي تزداد فيها الحاجة الى القدرة ، وتفيد دراسته في الناحيتين الاساسية والتطبيقية على حد سواء :

ـ الناحية الاساسية : من اجل معرفة الطرق الاستقلابية للحموض الدسمة .

ـ الناحية التطبيقية : لان حالة زيادة الجهد هي حالة فيزيولوجية ، وقد تكون مرضية احياناً ومن الضروري ان تعرف آلياتها من اجل وضع خطة علاجية سليمة اذا لزم الامر .

يعتبر هذا البحث مسحاً اولياً للموضوع ، استطاع ان يشير الى وجود فروق في الطرق التي يستخدم القلب بواسطتها الحموض الدسمة الاساسية ( التي ترده عن طريق الغذاء في الحالة العادية ) ، وبالتالي الى وجود فروق في الدور الذي يلعبه كل حمض داخل الخلية . من اجل تعميق وتثبيت هذه الملاحظات الاولية من الضروري القيام بالمزيد من التجارب استخدام نموذج القلب المعزول في حالة العمل Working heart ، والذي يفترض وجود سلالات حيوانية متجانسة تماماً ، كذلك يجب اللجوء الى تقنيات تحليلية اكثر دقة من كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من اجل متابعة تحولات كل حمض بدقة .

يمكن الافادة من هذا النموذج التجريبي في تطبيقات بيولوجية ، مرضية ودوائية لاحصر لها لان معظم نتائجه تطبق مباشرة على القلب داخل العضوية .

## ٧ ـ كلمة شكر :

اود ان اتقدم بجزيل شكري الى كل من ساهم في انجاز هذا العمل المتواضع . واخص بالذكر :

ـ السيد رئيس قسم الكيمياء الدكتور محمد سبيع مراد ، الذي سمح لي باجراء التجارب على الجرذ واتمام التحاليل الكيميائية في قسم الكيمياء بالرغم من ضيق المكان .

ـ السيد رئيس قسم الوقاية والامان ، الدكتور ابراهيم عثمان الذي ابدى كل تعاون طوال فترة انجاز البحث ، وكذلك عناصر دائرة النفايات الذين اشرفوا على سلامة مكان العمل .

ـ السيد رئيس قسم التطبيقات الزراعية ، الدكتور نجم الدين شرابي ، الذي سمح لي باجراء القياسات في مخابر الزراعة على عداد الومضان السائل ، وبالاستفادة من ملحقات الجهاز ( زجاجات العد ، ورق للطابعة ) .

ـ السيد رئيس قسم البيولوجيا ، الدكتور محمد عثمان . وكل زملاء القسم الذين عملوا ما بوسعهم لتسهيل عملي .

ـ الدكتور توفيق ياسين الذي ساهم في تزويدي بالمعلومات اللازمة لاجراء القياسات بواسطة عداد الومضان السائل .

ـ السيد توفيق حسن الذي قام بتأمين الآزوت السائل بشكل مستمر .

ـ الانسة نجاح ابراهيم التي قامت بطباعة التقرير .

.....وشكراً من الاعماق الى السيد هشام سويدان الذي لازم هذا العمل منذ بدايته ، وحمل كل اعبائه وحرص على اتمامه بالرغم من الظروف التي كانت احياناً اقرب الى المستحيلة .

## ٨ـ المـــــراجـــــع

1 - AL MAKDESSI S., ANDREIEU J.-L., HERILIER H., FAUCON G.

Effect of isoproterenol on the metabolism of myocardial fatty acids J.Mol Cell Cardiol., 1987, 19, 141-149.

2 - BREMER J. , NORUM K.R.

Metabolism of very long- chain monounsaturated fatty acids( :1) and the adaptation to their presence in the diet .

J. Lipid Res., 1982 , 23, 243- 256

3 -CHERN J.C., KINSELLA J.E.

the effects of unsaturated fatty acids on the synthesis of arachidonic acid in rat kidney cells.

Biochm. Biophys Acta, 1983, 750, 465- 471.

4 - CHIEN K.R., HAN A., SEN A., BUJA L.M., WILLERSON J.T.,

Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic myocardium.

Circ . Res. 1984, 54, 313- 322.

5 - CRASS M.F., Mc CASKILL E.S., SHIPP J.C.

Effect of pressure development on glucose and palmitate metabolism in perfused heart.

Am. J. Physiol; 1969, 216 , 1569-1576.

6- CRASS M.F. , Mc CASKILL E.S. , SHIPP J.C.

Glucose - free fatty acid interactions in the working heart.

J. Appl. Physiol, 1970, 29 , 87-91.

7 - CRASS M.F. , Mc CASKILL E.S., SHIPP J.C., MURTHY V.K.

Metabolism of endogenous lipids in cardiac muscle: effect of pressure development.

Am. J. Physiol., 1971, 220, 428-435

8 - CRASS M.F., SHIPP J.C., PIEPER G.M.

Effects of catecholamines on myocardial endogenous substrates and contractility

Am. J.Physiol., 1975, 228, 618, - 627

9- EMILSSON A., GUDBJAR NASON S.
Changes in fatty acyl chain composition of rat heart phospholipids induced by noradenaline.
Biochim. Biophys. Acta, 1981, 664, 82-88.

10- EVANS J.R., OPIE L.H., SHIPP J.C.
Metabolism of palmitic acid in perfused rat heart.
Am. J. Physiol; 1963, 205, 766-770.

11 - FOLCH J., LEES M., STANLEY G.H.S.
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. chem., 1957, 226, 497-210.

12 - HAGVE T.A., CHRISTOPHERSEN B.C.
Linolenic acid desaturation and chain elongation and rapid turnover phospholipid n-3 fatty acids in isolated rat liver cells.

13- HAGVE T.-A., SPRECHER H.
Metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids in isolated cardiac myocytes.
Biochim. Biophys. Acta , 1989, 1001, 332-344.

14 - JAEGER H., KLOR H.U., DITSCHUNEIT H.
Automated glass capillary gas- liquid chromatography of fatty acid methyl esters with reference to cis and trans isomers.
J. Lipid Res., 1976, 17, 185-190.

15 - JEFFCOAT R., JAMES A.T.
The regulation of desaturation and elongation of fatty acids in mammals.
Numa S.(Ed): Fatty acid metabolism and regulation ,pp. 85-112 Elsevier ( 1984 ) .

16- LAGARDE M., DROUET B., GUICHARDANT M., DECHAVANNE M.
In vitro incorporation and metabolism of some icosaenoic acids in platelets. Effect of arachidonic acid oxygenation.
Biochim . Biophys. Acta, 1989, 833, 52- 58 .

17 - LAWSON L.D., KUMMEROW F.A.

β- oxidation of coenzyme A esters of elaidic, oleic, and stearic acids and their full- cycle intermediates by rat heart mitochondria.

Biochim. Biophys. Acta, 1979, 573, 245-254.

18- MASTERS T.N., GLAVIANO V.V.

The effects of norepinephrine and propranolol on myocardial subcellular distribution of triglycerides and free fatty acids.

J.Pharmacol. Exp. Ther., 1972, 182, 246-255.

19- MJØS O.D.

Effect of inhibition of lipolysis on myocardial oxygen consumption in the presence of isoproterenol.

J.clin. Invest., 1971 , 50, 1869 - 1873.

20 - MOONEY R.A., LANE M.D.

Formation and turnover of triglyceride - rich vesicles in the chick liver cell.

J.Biol.chem., 1981, 256(22), 11724-11733.

21- MORRISON W.R., SMITH L.M.

Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride- methanol,

J.Lipid Res., 1964, 5 , 600-608.

22- MURAWSKI U., EGGE H.

Technology for the identification of unusual cis,cis ocxadeca-dienoic fatty acids.

J.Chromatogr. Sci, 1975, 13, 497-504.

23- NEELY J.R., LIEBERMEISTER H., BATTERSBY E.J., MORGAN H.E.

Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart ;

Am J. Physiol. , 1967, 212, 815 -822

24- NEELY J.R., MORGAN H.E.

Relationship between carbohydrate metabolism and the energy

balance of the heart.
Ann Rev. Physiol ., 1974, 36, 413- 459.

25- ORAM J.F., BENNETCH S.L. NEELY J.R.
Regulation of fatty acid utilzation in isolated perfused rat hearts.
J.Biol. Chem., 1973, 248, 5299- 5309.

26- ROBINSON B.S., JOHNSON D.W., POULOS A.
Metabolism of hexacosatetraenoic acid ( $C_{26}$:4, n-6) in immature rat brain.
Biochem. J., 1990, 267, 561-564.

27- SCHOONDERWOERD K., VAN KRAAIJ T., HULSMANN W.C., STAM H.
Hormones and triacylglycerol metabolism under normoxic and ischemic conditions.
Mol. Cell Biochem., 1989, 88, 129-137.

28- SOLTYS B.J., HSIA J.C.
Fatty acid enhancement of human serum albumin binding properties. A spin label study .
J. Biol. Chem., 1977, 252 , 4043-4048.

29- SPRECHER H.
Biochemistry of essential fatty acids.
Progr. Lipid Res., 1981, 20, 13-22.

30- TAKENAKA F., TAKEO S.
Effects of isoproterenol on myocardial lipid metabolism in rat hearts perfused with and without exogenous substrates.
J. Mol. Cell Cardiol., 1976, 8 , 925- 940.

31- THOMAS G., LORIETTE C., PEPIN D., CHAMBAZ J., BEREZIAT G.
Selective channelling of arachidonic and linoleic acids into glycerolipids of rat hepatocytes in primary culture.

32- VAN DER VUSSE G.J., ROEMEN T.H.M., RENEMAN R.S.
Assessment of fatty acids in dog left ventricular myocardium.
Biochim . Biophys. Acta, 1980, 617, 347-352

33- VAN DER VUSSE G.J., ROEMEN T.H.M., PRINZEN F.W., COUMANS W.A., RENEMAN R.S.
Uptake and tissue content of fatty acids in dog myocardium under normoxic and ischemic conditions.
Circ. Res ., 1982, 50, 538 - 546.

34- VAN DER VUSSE G.J., RENEMAN R.S.
The myocardial non- esterified fatty acid controversy.
J. Mol. Cell Cardiol., 1984, 16, 677-682.

35- VASDEV S.C., KAKO K.J.
Metabolism of erucic acid in the isolated perfused rat heart.
Biochim. Biophys. Acto ,1976, 431, 22-32

36- VASDEV S.C., KAKO K.J.
Incorporation of fatty acids into rat heart lipids. In vivo and in vitro studies.
J.Mol. Cell Cardiol., 1977, 9,617-631

37- WILLIAMSON J.R., KOBAYASHI K.
Use of the perfused rat heart to study cardiac metabolism: retrospective and prospective views.
Basic Res. Cardiol., 1984, 79, 283-291

38- WITTELS B., DRESSLER R.
Two- dimensional thin- layer chromatographic isolation of fatty acyl carnitines.
J.Lipid Res; 1965 , 6, 313- 314.

39- Biologie et physiologie cellulaires . II . Cellules et virus,...
Hermann , Paris ( 1978 ) .