SY9300266

REPORT ON SCIENTIFIC BIBLIOGRAPHIC STUDY

CELL FUSION BY IONIZING RADIATION

PREPARED BY :

DR. AL-MOUTASSEM BILLAH KHAIR

DEPARTMENT OF RADIOBIOLOGY AND HEALTH

AECS -B/RSS 58

AUGUST 1993

ATOMIC ENERGY COMMISSION

P.O. BOX 6091 DAMASCUS SYRIA

SY9300266

تقرير عن دراسة علمية مكتبية

الاندماج الخلوي بالأشعة المؤينة

اعداد :

الدكتور المعتصم بالله خير

قسم البيولوجيا والصحة الاشعاعية

هـ ط ذ س ـ ب / ت دع ٥٨

آب ١٩٩٢

هيئة الطاقة الذرية

سورية ـ دمشق ـ ص.ب ٦٠٩١.

الجمهورية العربية السورية
هيئة الطاقة الذرية
قسم البيولوجيا والصحة الاشعاعية

الاندماج الخلوي بالأشعة المؤينة

اعداد :
الدكتور المختص بالله خير

هـ ط ذ س ـ ب / ت دع ٥٨ آب ١٩٩٢

حقوق النشر

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

الفهـــرس

المقـدمـــــة 1

الاندمـاج الخلـوي 2

- الاندماج في الجمل الغشائيـة النموذجيـة 4

- الاندماج في الاغشية الحيويّـــة 5

- الاندماج بواسطة الـ PEG 6

- الاندماج الكهربائـي 8

- الاندماج بالاشعة المـؤينـة 12

المـراجـــــع 17

مقدمة :

تحاط الخلايا الحية بغشاء membrane . وفي كثير من الاحيان يدخل هذا الغشاء ضمن الخلية . مشكلا الشبكة السيتوبلاسمية خاصة في الخلايا حقيقيات النوى Eucariotes. تشكل الاغشية الخلوية بنى منظّمة للغاية تفصل بين طورين مختلفين ؛ تُحدّد شروط وجودهما المشترك . وهي لاتشكل حواجز ساكنة . بل تتفاعل بنشاط وإستمرار مع الوسط المحيط بها . تحدّد إلى درجة ما . عمل الاليات الغشائية للخلية (كالمستقبلات والمعقدات الخماثرية والتشكلات القنوية) مقدرة الخلية في المحافظة على إتزانها homeostasis وبان ترد على عوامل الوسط الخارجي بشكل لائق وكذلك على التبدلات في الجمل الخلوية الاخرى لنفس المتعضية . لاشك في ان تركيب الاغشيه الخلوية . المنسّق بنيوياً وفراغياً . يعكس التنوع الوظيفي لهذه العضيّات الخلوية . وإن الإحاطة التامة بالوظائف المتعددة التي تتم عن طريق الاغشية الخلوية . يتطلب فهماً لبنية وحركية العناصر المكونة لها والتركيز على التفاعلات بين هذه المكونات على المستوى الجزيئي.

تتكون الاغشية الحيوية biologicel membrane من مجموعة متنوعة من الليبيدات والبروتينات والسكريات ؛ وتوصف بنية الاغشية الحيوية حتى الوقت الحالي، بالنموذج الفسيفساني المائع" fluid mosaic model " الذي طوّره العالمان Singer و Nicolson (1). ووفقاً لهذا النموذج، فإن تنظيم البروتينات الداخلية transmembrane proteins والبروتينات المحيطية peripheral proteins، يعطي الاغشية الصفة الفسيفسائية ، آخذين بعين الإعتبار دور الطبقة الليبيدية المضاعفة . اما صفة المائعية فهي نتيجة للانتشار الحر . للّيبيدات والبروتينات. رُكز البحث بناءً على الخط العام هذا . خلال السنوات الخمس عشرة الاخيرة . على بنية الاغشية الخلوية وحركيتهما . وتمثل الفوسفوليبيدات المكون

الرئيس الذي يتشكل منه معقد الجزيئات الليبيدية المتنوعة التي تدخل في بنية الأغشية الخلوية. وقد تمّ تحديد بنى الجزيئات الفوسفوليبيدية شديدة الإنحلال: بواسطة انعراج الأشعة السينية x - ray diffraction والرنين المغناطيسي النووي (NMR) و كنتيجة لذلك، تكّون فهم منطقي تام للبنية الجزيئية لمكونات الطبقة الليبيدية المضاعفة ؛ أما بالنسبة لحالة البروتينات فلم تنته بعد نتيجة للتنوع الكبير في البروتينات الغشائية إذا ما قورنت بالليبيدات (2).

الإندماج الخلوي

إن شيوع ظاهرة اندماج الأغشية الخلوية واهميتها، موضع اهتمام العلماء في حقول المعرفة المختلفة لهذه الظاهرة. إذ يهتم الفيزيائيون الحيويون والكيمائيون الحيويون، بالتنسيقات الجزيئية المعقدة التي ستحدث من جديد اثناء اندماج الأغشية ثنائية الطبقة الليبيدية، بينما ينسر همّ علماء الخلية بالحوادث النوعية الخلوية الداخلية intracellular وتواترها بعد الاندماج. تشكل ظاهرة إندماج الأغشية الخلوية مفهوما متباينا فالأغشية الخلوية تفصل بين طورين مختلفين،ومن ناحية اخرى تحدّد وتصون شخصية كل خلية وكل عضيّة في الخلية. وبالتالي فإن إندماج غشائين، يبطل كيان كل منهما، بالسماح لمكونات هذين الغشائين المفصولين بالالتحام، فينتج مزيج من الجزئين المائيين المحصورين في عديين الغشائين. ومن الواضح، بان إندماج الأغشية الخلوية يتعارض مع التطور الخلوي، إلا في حال دقة إنضباطه في الزمان والمكان.

يؤدي تنوع ظاهرة اندماج الأغشية الخلوية، إلى الإعتقاد بوجود عدد وافر من الآليات التي تفسر مثل هذا التنوع. وعلاوة على ذلك فمن الممكن بان يكون التنوع ناشئاً عن ضوابط عليا superimposed controls ضرورية من أجل الزمن والحالة المناسبة لحادثة الإندماج الجزيئية وفيما عدا هذه الضوابط، فإن آلية التفاعل الاندماجي تكون متشابهة في

أكثر أو في كل الحالات (2).

تشكل الطبقة الليبيدية المضاعفة ، العنصر البنائي الأساسي للأغشية الحيوية . وهي مستقرة تماماً وتقاوم بشكل واضح حوادث خروج المكونات الجماعية من هذه العضوية .تكون بنية الأغشية هذه على شكل حاجز . يفصل الخلية عمّن يحيط بها . فاي تبدّل بنيوي يطرا عليها ، يعيق بشدة وظيفتها الحاجزية . وقد سجّل علم الخلية عدداً من حوادث إنشطار وإندماج الأغشية التي تحدث في عمليات الإنتقال الضرورية للكتل والمعلومات بين الخلايا من جزء خلوي إلى آخر . وإن تطور الكائنات الراقية ، يبدا من حدوث اندماج خلية بخلية اخرى ، كما ان اندماج خلية بخلية اخرى يشكل ايضاً بداية تشكل الألياف العضلية متعددة النوى multinucleated muscle cells . ويشكل إندماج الأغشية مرحلة رئيسة لدخول الفيروسات ذوات الغلاف enveloped viruses إلى الخلايا عند الإصابة المرضية . تشترك الأغشية الخلوية التي تشترك في الإندماج بشكل واضح وظيفتها الرئيسة كحاجز غير نفوذ نسبياً . لفترة قصيرة جداً ، وهذا بالضبط اهم واول إختبار للتحقق من ظاهرة اندماج الأغشية الحيوية ؛ إذ كيف يمكن لغشائين متلاصقين تماماً ، ان ينجزا العملية الإندماجية المعقدة في نطاق التقييدات التي تفرضها الوظيفة الحاجزية ؟ فالمسالة مرتبطة بالآليات الجزيئية التي تدخل في حادثات الإندماج fusion processes وتتعلق ايضاً بالتحكم في حوادث الإندماج fusion events . ومن الواضح بان إحداث تفاعل إندماج محدد يكون مقيداً بزمن قصير جداً وبتوضّع نوعي ايضاً specific localization ايضا(3).

استخدمت طرائق منهجية متعددة لدراسة تفاعلات الإندماج الغشائي. ومن هذه التقنيات المستخدمة : الرنين المغناطيسي النووي (NMR) nuclear magnetic resonance ومطيافية الرنين السبيني الإلكتروني (ESR) electron spin resonance spectroscopy وكذلك تقنيات الفلورة والقياس الحراري الماسح المتباين differntial scanning

والمجهر الإلكتروني والترشيح بإستخدام الهلام gel calorimetry
filtration وقياسات الكثافة ; إلا أن إستخدام هذه التقنيات لا يشكل المحدد الدقيق الدائم للإندماج الغشائي.

- الإندماج في الجمل الغشائية النموذجية :

درس كثير من الباحثين (7,6,5,4) إندماج الأغشية الحيوية في الجمل النموذجية المؤلفة model systems من حويصلات ليبيدية (liposomes = lipid vesicles) وبمختلف الطرائق المذكورة آنفاً. ويعود فضل معرفتنا الحالية حول اندماج الأغشية الحيوية إلى الجمل النموذجية هذه. لأن دراسة الاندماج بين الجمل النموذجية أسهل من دراسة إندماج أغشية الخلايا الحية مباشرة ; فالحويصلات الليبيدية أبسط نسبياً وتتمتع ببنى محددة أيضاً بشكل جيد. كما أن شروط وجودها الفراغي والزماني يمكن أن يتحكم فيها الباحث نفسه وعليه فإن الإستنتاجات التي نحصل عليها من دراسات الجمل النموذجية لا يمكن أن تطبق بشكل دائم على الإندماج بين الأغشية الحيوية لسببين: أولهما إختلاف جوهر التفاعلات اللانوعية المتكونة بحضور الحويصلات الفوسفوليبيدية، عن التفاعلات النوعية والآليات المميزة التي تعمل بين الأغشية الحيوية، والثاني: لأن مميزات الإندماج في الجمل النموذجية تختلف عن تلك التي تبدو كنظير مشابه لها في البيولوجيا. درس الباحثون إندماج فيروس الحمة الراشحة influenza virus مع الحويصلات الليبيدية بشكل مكثف (9,8) . واصبح واضحاً من الدراسات هذه بأن الفيروس يندمج بشكل فعّال مع حويصلات الكارديوليبين CL (cardiolipin) ، وفي كل الأحوال فإن مميزات هذه العملية الإندماجية تعتبر بشكل جزئي، متعلقة بالحموضة PH، وهي تختلف عن فعالية الإندماج الحيوي للفيروس، وما دام اندماج الفيروسات ذوات الغلاف مع حويصلات CL يعكس الشروط العامة الوافية لإندماج الأغشية، فإنه يكون من الضروري اختيار تركيب لهذه الحويصلات liposomes يشبه بشكل كبير تركيب الأغشية الحيوية ; مما يسمح بإستنتاج

قواعد خاصة تتعلق بالفعالية الإندماجية الفيروسية المستخدمة في دخول الخلية المضيفة.

-الإندماج في الأغشية الحيوية :

يستدل من الدراسات بأن حادثة إندماج الأغشية موجودة في عالم الخلية. فكل غشاء حيوي في الحقيقة. يملك امكانية الإندماج، هذه الإمكانية تكون اكثر وضوحاً في بعض الأغشية عنها في البعض الآخر. تعرف حالياً عوامل كثيرة تتدخل في إندماج الأغشية الحيوية مثل: Ca^{+2} في exocytosis، الهرمونات، عوامل النمو والإفسداد في المستقبلات الوسيطة داخل الخلية ودرجة الحموضة PH اثناء دخول الفيروسات ذوات الغلاف إلى الخلية المضيفة. وقد سجّل دور لمواد اخرى تدخل في الإندماج مثل: ATP, cAMP, GTP ، العقاقير والبروتينات المرتبطة بالكالسيوم. وكما يظهر بان البروتينات الغشائية تشترك في الإندماج. إن حالة البروتينات الهيكلية cytoskeleton وحجم بروتينات الغليكوسيليشن glycosylation وتوزع البروتينات الغشائية الممتدة membrane spanning protiens يمكن ان تؤثر على العملية (10). ومع تقدير دور البروتينات الغشائية فإنه يظهر عموماً بأن كلا البروتينات الخارجية (البروتينات الهيكلية الغشائية) والبروتينات الداخلية الممتدة داخل الغشاء هي غير مشاركة (سليمة) في موقع الإندماج قبل حدوث الإندماج الفعلي المحتمل. ومن ناحية اخرى، لم يلاحظ عند إستخدام التجميد السريع عدم إشتراك البروتينات الغشائية او إعادة تنظيمها العرضي (الجانبي). ربما انه لا توجد تبدلات في توزع الجزيئات داخل الغشاء التي يمكن ملاحظتها بإستخدام التثبيت بالتجميد السريع (11). يظهر بان منطقة صغيرة فقط في الطبقة الليبيدية. يمكن ان تكون كافية من اجل الإندماج (اندماج نقطي موضعي local point fusion). ومن المهم الإشارة هنا إلى ان الإندماج الخلوي فائق السرعة. من درجة الميلي ثانية، ويخضع لتحكم صارم (12). وربما تتدخل في اندماج الأغشية، البروتينات وعوامل عديدة اخرى هامة، إلاّ ان الجزء

الليبيدي من الغشاء هو الذي يندمج فعلياً. وهذا يقتضي بأن تكون الليبيدات الغشائية المندمجة في حالة التصاق تام، وتتطلب انخفاضاً في تنافر الكهربائية الساكنة electrostatic repulsion وفي القوى المائية hydration forces بين السطحين المتقاربين؛ بعد ذلك تتحد ليبيدات الغشائين (join) التي تستدعي عدم استقرار موضعي في الطبقة الثنائية وعلى الليبيدات أن تفقد مؤقتاً الشكل ثنائي الطبقة bilayer configuration في نقطة الإندماج. وفي النهاية، تندمج الأغشية ليعود التشكيل من جديد ثنائي الطبقة المستقر.

أجريت دراسات متعددة على إندماج الأغشية الخلوية، بواسطة عوامل خارجية مثل: فيروس Sendai والبولي إيتيلين غليكول polyethylene glycol (PEG) والتيار الكهربائي، وذلك لدراسة ظاهرة الإندماج بحد ذاتها والإستفادة من هذا التطبيق في البحوث البيولوجية الأخرى. وعلى سبيل المثال: إنتاج الأضداد وحيدة النسيلة monoclonal antibodies والتعبير المورث gene expression والخريطة الوراثية genetic mapping.

- الإندماج بواسطة ال PEG :

تبيّن الدراسات المتعددة دور ال PEG, في إندماج الأغشية الخلوية. وهو يلعب دوراً في إحداث عدم إستقرار الأغشية الخلوية، نتيجة لصفاته المحبة للارتباط بجزيئة الماء. إذ يؤدي (PEG) إلى إزالة الماء من الأغشية عن طريق المنافسة على الماء الحر ويبدل صفات الماء اللاكهربائية dielectric properties للماء، كما يسهّل إنفصال الجزيئات الليبيدية بجعل الطور المائي aqueous phase "أقل قطبية"، ويخلق عيوباً في الطبقة الليبيدية المضاعفة. إزالة الماء ليس كافياً لإحداث إندماج الأغشية، وتبيّن ذلك من عدم مقدرة الديكستران dextrans والعوامل الأخرى المزيلة للماء، على دمج الحويصلات أو الخلايا بشكل فعّال. وإن إنفراد قدرة ال PEG على دمج الخلايا

- بالمقارنة مع العوامل الأخرى المزيلة للماء، تكمن في شراهته للبنية المائية وتعطيله للطبقة المضاعفة disrupt bilayers, وتشكيل المعقدات الملحية وتكتيل البروتينات الغشائية.

يمكن الإحاطة بأسلوب عمل ال PEG, من الدراسات التي تتم على نماذج الطبقات الليبيدية المضاعفة وعلى الأغشية الخلوية ودراسة العوامل المختلفة سواء التي تعزز او تثبّط المقدرة الإندماجية لها. إن تلاصق الخلايا أو الحويصلات، يتم بإبعاد الخلايا أو الحويصلات عن الشبكة المائية مع البولي إيثيلين غليكول PEG-water network كما ان إزالة الماء الموضعي local dehydration والتبديل في القطبية والمحيط الشاردي، يمكن أن يؤدي إلى التجمع العنقودي للبروتينات الغشائية. الأمر الذي يزيل العائق الفراغي، مؤدياً إلى التقارب التام (13), تاركاً القطع الصغيرة patches من الغشاء عارية من المكونات الليبيدية الكبيرة؛ هذا وإن إزالة الماء الموضعي وتبدل الثابت اللاكهربائي للماء يخلق عيوباً في الغلاف مضاعف الطبقة ويؤدي بالتالي إلى تعرية السلاسل الهيدروكربونية. يمكن ان يتم مثل هذا التأثير، عن طريق تشكل حقول مختلفة في الحالة الاتزانية؛ فمع الإنخفاض الكافي للكهربائية الساكنة electrostatic والتنافر المائي hydration repulsion فيما بين الطبقات المضاعفة لخفض قطبية الوسط، يزداد التماس وإندماج الطبقات الليبيدية المضاعفة. وإن وجود مناطق حرة، في الجزيئات الغشائية الداخلية intramembranous particles ضروري من اجل الإندماج المحرّض بالبولي إيثيلين غليكول. وهذا يتفق مع تعزيز فعالية ال PEG الإندماجية التي تتأثر بالمعالجة المسبقة للخلايا بالمستحضرات الحالّة للبروتين protease preparation (14). وقد لوحظت ايضا: مناطق معرّاة من البروتين في الاندماج الخلوي المحرض بفوسفات الكالسيوم (15) وبفيروس سينداي (16) وبالشاردة الموجبة ثنائية التكافؤ the divalent cation ionophore A23187 (17)، وبخلات اليورانيوم uranyl acetate (18), والتحطيم الكهربائي

.(19) electrical breakdown

المرحلة الأخيرة، هي إزالة ال PEG بطريق التمديد، ولها وظيفتان: إزالة العيوب في مناطق الإندماج من الطبقة المضاعفة والانتشار الجانبي الحلولي في الخلايا او الحويصلات. مما يوسع منطقة التماس وتدفق الإندماج Fusion lumen (23,22,21,20). وبالتالي تندمج الخلايا ذات نقاط التماس الشديدة مع الإنتزاع الذي يؤدي لازمي التمام. ونخلص إلى القول بان ال PEG يؤدي الإندماج الغشائي، بواسطة تهيئة الأغشية في الوسط الفيزيائي الضروري للإندماج الطبيعي، بطريقة المعالجة البسيطة.

-الإندماج الكهربائي:

استخدام الحقول الكهربائية النبضية electric field pulses بشدة مرتفعة وباستمرارية قصيرة جداً، لتحقيق إندماج خلية مع خلية اخرى ونقل المورثات gene transfer، يشكل عاملاً فعّالاً وطريقة واعدة لتكوين الخلايا الجسدية والهندسة الوراثية للمتعضيات، فاصبحت تطبيقات الإندماج الخلوي الكهربائي متعددة، وستؤمن البحوث الاساسية في مجال تفاعلات الحقول الكهربائية مع الجمل البيولوجية معلومات اكثر وتطبيقات كثيرة، وان تطبيق تقنية النبضات الكهربائية في البحث العلمي وفي المشاكل الصناعية واسع جداً. إلا ان معرفتنا بالعديد من المتغيرات الخلوية التي تتدخل في الإندماج الكهربائي electrofusion وفي النفوذية الكهربائية electropermeabilizatoin مازالت فقيرة جداً .(24)

إن كل من الإندماج الكهربائي والنفوذية الكهربائية، مبني على زيادة النفوذية الغشائية المعكوسة، كإستجابة للتثقيب الكهربائي في الغشاء، بوجود حقل كهربائي خارجي. [التحطيم الكهربائي electrical breakdowns او مايدعى بالتثقيب الكهربائي electroporation بحسب Neumann (25)] ويمكن اللجوء لنفس الالية لكلا الإستخدامين، لان الإختلاف بين التطبيقين يكمن في ان الإندماج الكهربائي يتطلب تماس

الأغشية بين خليتين على الأقل، بينما النفوذية الكهربائية يمكن ان تحدث في الخلايا الحرة في معلق ذي كثافة خلوية قليلة نسبياً. ويتطلب تدقيق التماس الجيد للإندماج بين الأغشية، إستخدام اداة إضافية ووسط مختلف التركيب، بالمقارنة مع النفوذية الكهربائية. ولوحظ بان تطبيق حقل نبضي على معلقات الخلايا ذات الكثافة الخلوية العالية، يؤدي إلى حدوث ثقوب في الغشاء تكفي لحدوث الإندماج في حال كون المسافة بين الخلايا صغيرة جداً. وقد شكلت هذه الظاهرة نقطة البداية لتحقيق الإندماج الكهربائي للخلايا للمرة الأولى (26).

ويحصل التثقيب الكهربائي للبيبيدات او المعقدات الغشائية الليبيد - بروتين، إذا ماطبق عليها حقل كهربائي بشدة كافية (27). وبفضل الفصل الشاردي عبر المكثف الغشائي membrane capacitor (أي الطبقتين الموصلتين للتيار التي تفصل بينهما طبقة عازلة) يحدث فرق كمون، نتيجة للحقل الكهربائي الخارجي، وتعتمد قيمة الكمون المولّد على الظرف المستخدم في تطبيق الحقل الخارجي، فعند وضع الكترودين على جانبي الغشاء، فإن فرق الكمون المولّد يتناسب طرداً مع الحقل المطبق.

لدى تمرير حقل نبضي في معلق يحوي على دقائق صغيرة محاطة بغشاء مغلق(خلايا او حويصلات) بواسطة الكترودين خارجيين، فإن الكمون الغشائي المولّد Vg يمكن ان يعطى بمعادلة لابلاس التكاملية :

$$Vg = 1.5 * a * E * \cos\theta$$

حيث: Vg- فرق الكمون المتولد عبر الغشاء.

a- نصف قطر الخلية.

E- شدة الحقل المطبق.

θ- الزاوية المحصورة بين الموقع المدروس من الغشاء واتجاه الحقل المطبق. تطبّق هذه المعادلة على خلايا كروية الشكل. أما الخلايا الاهليلجية فلها علاقة مشابهة ولكن اكثر تعقيداً (24).

فرق الجهد المطلوب للتثقيب الكهربائي لأكثر الأغشية 1 فولت(26) وعليه فإن شدة الحقل الأعظمي للتثقيب breakdown يقع في المجال 1 25

كيلو فولت/سم، بحسب: نصف قطر الخلية ودرجة الحرارة وزمن تعريض الخلايا للحقل الكهربائي الخارجي.وبالتالي فإن زمن استمرارية النبضة تكون اقصر للخلايا الصغيرة منها للخلايا الأكبر. وبناءً على الشروط المذكورة اعلاه، فإن استمرارية النبضات تكون عادة في حدود 20 - 50 ميكرو ثانية، اما بالنسبة للخلايا الكبيرة او البويضات فإن إستمرارية النبضة الكهربائية وتبعاً للشروط السابقة تكون من مرتبة بضع المیلي ثانية (28).

يتم تشكّل التماس بين الأغشية الخلوية، في تقنية الإندماج الكهربائي الإعتيادي، لخليتين مرتين على الأقل في المعلق الخلوي بتطبيق حقل كهربائي متناوب غير متجانس inhomogeneous alternating electric field ذو تردد يقع ما بين 10 كيلوهرتز و2 ميغاهرتز وسعة الذروة peak amplitude تتراوح من 1 - 100 فولت (بحسب الحجم).و تتحرك الخلايا في الحقل المتناوب غير المتجانس، لتعطي تشكيلات سلاسلية كالسبحة pearl chains (29 ، 30). ومن الممكن بان تفيد المحاليل الناقلة conductive solutions كوسائط أخرى لتحقيق تماس الأغشية membrane contact في الأغراض الخاصة، على سبيل المثال: استخدم الباحثون (31 ، 32) جزيئات اكسيد الحديد المغناطيسي (Fe_3O_4) لتشكيل طبقة مغناطيسية رقيقة حول الكريات الحمراء magnetically coated erythrocytes ، ثم بوساطة حقلين مغناطيسيين متعامدين، تنجذب الخلايا المغلفة coated cells لتجتمع في حجم صغير جداً. كانت القوة الموجهة عبر مركز الحقل، كافية لتحقق تلامقاً بين الخلايا.وبتطبيق حقلين كهربائيين، حدث الإندماج الخلوي للخلايا المتجاورة. هناك طريقة تستخدم الحقل الصوتي sonic field في التصاق الخلايا (33) تعتمد على فرق الكثافة بين الجزيئات والوسط الموجودة فيه. اما في حالة الحقل الكهربائي المتناوب غير المتجانس، فإن الفرق في الثوابت اللاكهربائية dielectric constants هو المهم. وقد استخدم صوت فائق التردد ultrasound بقوة 1 ميغاهرتز (طول الموجة 1ملم) لتحقيق الإلتصاق

بين: خلايا الدم الحمراء وخلايا الميلوما أو بين خلايا الديلوما واللمفاويات.

تذكر النشرات طرائق أخرى لتحقيق التماس بين الخلايا. إذ عوملت الخلايا بالنبضات في المعلقات مرتفعة الكثافة الخلوية أو في المعلقات قليلة الكثافة الخلوية. ومن ثمة وضعت في تماس تام بطريقة التثفيل. وبذلك امكن دمج كميات كبيرة من الخلايا دون اللجوء لمواد الإندماج الكيماوية (26 ، 34). وفي حالات أخرى استخدمت مركبات كيمائية مثل ال PEG إلى جانب الحقل الكهربائي النبضي لإحداث التماس بين الخلايا.

تشير التقارير التي نشرت في السنوات الأخيرة بأن تقنية الإندماج الكهربائي، يمكن أن تطبّق على الخلايا الحية، والحويصلات والطبقات الليبيدية المضاعفة. ونذكر من هذه التطبيقات: الإندماج الكهربائي للأغشية الليبيدية العائمة المسطحة المؤلفة من ليبيدات مختلفة، وكذلك دُمجت الحويصلات الليبيدية. وقد وصف الباحثون عملية دمج البكتريا Bacillus thuringiensis بواسطة الحقل الكهربائي بوجود مركب ال PEG وكذلك دمجت بكتريا الأمعاء E.coli ذات الواسمات الوراثية المختلفة، ومع السالمونيلا S.typhimurium وأما في مجال الفطريات فقد طبّق الدمج الكهربائي على طلائع الفطريات fungal protoplasts في شروط الإندماج والوسط المناسب. كما جرى ذلك أيضاً في مجال الخمائر Yeast. وذكرت النشرات، إمكان الإندماج الكهربائي عند طلائع النباتات plant protoplasts ولدى الخلايا الحيوانية في الزجاج بالنسبة لأنواع كثيرة منها، وتشكيل الخلايا الهجينة hybriodoma وأيضاً دمج blastomeres، والخلايا البيضية (24). خلاصة القول، تتشكل الخلايا العملاقة giant cells من الكريات الحمراء أو من الخلايا ذات النوى، بتعريض كثافات كبيرة من الخلايا إلى حقل كهربائي متناوب dielectrophoresis، قبل تطبيق عدة نبضات من حقل شدته عالية جداً. وهذه المعالجة تؤدي إلى تثقيب الغشاء ليس في منطقة التماس بين

الخلايا المتجاورة في الأنسجة الخلوية فحسب، بل في المناطق الأخرى من الغشاء، إعتماداً على زاوية فرق الكمون الغشائي المتولد. وبالتالي فإن الإندماج الغشائي الإنجمادي يحدث بين الخلايا في الأنسجة الزراعية وبين النسيجات المتجاورة. وفي هذه الظروف تأخذ عملية تشكل الخلايا العملاقة (بقطر عدة مئات من الميكرومتر) عدة دقائق من الزمن. ومن الممكن أن يتم دمج الخلايا العملاقة فيما بينها إذا ما تمّ دفعها ببساطة مع بعض، وهذا يشير بوضوح إلى حالة ما إندماجية في الأغشية. وتشكل الخلايا العملاقة المندمجة، جُملاً مفيدة في بحوث الأغشية الخلوية لإمكان زرع الالكترودات الدقيقة داخل الخلايا لإجراء القياسات المباشرة للعطاءات الكهربائية للأغشية الخلوية، الأمر الذي يفتح طريق في الدراسات المباشرة لعمل المواد المنشطة للأغشية بما فيها العقاقير.

وتشير إحدى الدراسات (35) إلى دمج طلائع النبات مع بعضها أو دمج اللمفاويات البائية مع خلايا الميلوما. وتشكّل هجائن باستخدام نبضات حزمة دقيقة من ليزر الأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 340 نانومتر. وحصل الباحثون على إندماج ثنائيات خلوية مطردة تحت المجهر. وخلال زمن 30 ثانية لدمج طلائع النبات، وحوالي خمس دقائق لدمج اللمفاويات البائية مع الميلوما. وهذه الظاهرة تشبه الإندماج الكهربائي من حيث المبدأ، كما وضح الباحثون.

. الإندماج بالأشعة المؤينة :

سجل عدد قليل من الباحثين، ظاهرة الإندماج الخلوي بتأثير الأشعة المؤينة، بحسب ما هو متوافر لدينا حتى الآن. وقد قام فاميلاير وآخرون (36) بإستخدام جرعات كبيرة من أشعة غاما، تتراوح بين 100 - 2000 غري لدمج طلائع Nicotiana plumbaginifolia الطافرة (NR) مع الطلائع المشععة للنمط الطافر (albino mutant) لنبات Nicotiana sylvestris, فكانت أفضل النتائج في دراسة الهندسة الخلوية لهذه الأنواع، عند

إستخدام جرعة تفوق 500 غري من اشعة غاما ؛ إلا أن أصحاب هذه الإختبارات لم يبحثوا الآلية التي تم فيها الإندماج بين النمطين النباتيين، علماً بأن تواتر الإندماج حوالي 1 %. وفي دراسة أخرى للباحثة " غليبا " ومن اعدوها (37) دمج النمط البري الاخضر من Nicotiana plumbaginifolia ثنائي الصيغة الصبغية (2n) مع نبات Atroba belladonna ثنائي الصيغة الصبغية (2n) من النمط البري. واستخدم الباحثون جرعات من اشعة غاما 100، 300، 500، و 1000 غري، صادرة عن منبع كوبالت 60. فكانت المرة الاولى التي تنجح فيها تجربة الحصول على خلايا جسمية هجينة somatic hybrid cells وظيفية ثابتة تحوي في داخلها المادة الوراثية النووية للأنماط الأبوية التي تشكل منها الهجين. وقد اقترح أولئك الباحثين هذه الطريقة، بإستخدام الجرعات فوق المميتة من اشعة غاما لكشف حرية المادة الوراثية للخلايا، كما ويسمح ذلك بدراسة الحوادث المظفرة وغيرها التي تحدث في الخلايا بعد عملية التشعيع بجرعات تفوق عشرات وحتى مئات المرات الجرعات المميتة. وسجل العلماء ظاهرة الاندماج في عالم الحيوان بحديث استطاع بعضهم (38) دمج الخلايا البيضية oocytes والمنسليات البيضية oogonia لحشرة Red Cotton Bug ؛ وتم هذا الاندماج بوساطة استخدام اشعة - X بمعدل جرعة 4.44 غري / دقيقة، بين المنسليات البيضية الطبيعية normal oogonia وبين المنسليات البيضية المتضخمة hypertrophied oogonia، بين منسلية بيضية وخلية برعمية وبين الخلايا البيضية مع بعضها . ولم تأت هذه الدراسة على ذكر ميكانيكية الإندماج ودور الأغشية الخلوية في ذلك . كما أن النشرة لم تذكر بالتحديد الجرعات المستخدمة من اشعة - X، بل إكتفت بذكر معدل الجرعة . ومن الواضح بأن الجرعات المستخدمة كانت كبيرة الى حد ما لتتناسب مع ظاهرة الاندماج، كاثر إشعاعي radiation effect .

وجدنا في بحوثنا السابقة (39، 40) إمكان إندماج خلايا كبد الجرذ في الحي in vivo بواسطة الاشعة المؤينة، وحصلنا على نسبة كبيرة

من الخلايا متعددة الصيغة الصبغية نتيجة لإندماج الخلايا المستقرة intact hepatocytes (G0-phase) وقد إستخدمنا جرعات من النترونات السريعة 0.25 ، 0.5 ، 1 ، 2 ، 4 وحتى 40 غري، فحصلنا على الحد الأعظمي عند الجرعة واحد غري، ولم تؤد زيادة الجرعة إلى زيادة في نسبة الخلايا المندمجة. ومن التجارب التي أجريناها مابين 1985-1989، تبين بان ظاهرة إندماج الخلايا الكبدية نتيجة لتأثير النترونات عليها. ترتبط بعدة شروط ومنها عمر الجرذ. إذ تنخفض نسبة الخلايا المندمجة بالنترونات، مع إزدياد عمر الجرذ. وقد يكون ذلك نتيجة لتبدل في خصائص الأغشية الخلوية مع إزدياد العمر (41) الشرط الآخر الذي يلعب دوراً كبيراً في إندماج الخلايا بالأشعة المؤينة، فإنه نوع الإشعاع المستخدم ونقل الطاقة الخطي LET لهذا الإشعاع. وتبيّن بان نترونات الإنشطار بطاقة وسطى 0.85 ميغا الكترون فولت، اكثر فعالية من النترونات السريعة 14 ميغا الكترون فولت في إحداث إندماج الخلايا الكبدية للجرذ في الحي (41). كما دلت إختباراتنا في الفترة المذكورة آنفاً، بان أشعة غاما قادرة أيضاً على إحداث إندماج الخلايا الكبدية، بإستخدام جرعات فوق المميتة وهي 720 و1200 غري (39، 40). وهذه تشابه الجرعات المستخدمة في دمج الطلائع النباتية المذكورة سابقاً (37،36) وعليه فإن إندماج الخلايا الكبدية يتناسب مع نقل الطاقة الخطي للإشعاع، الذي بدوره يتناسب عكساً مع طاقة الإشعاع المستخدم.

يمكن من حيث المبدأ تفسير آلية الإندماج الخلوي المحرض بمرور البروتونات شديدة التأيين والنوى المرتدة الأكبر ثقلاً، الناتجة عن التشعيع بالنترونات السريعة عبر الأغشية الخلوية في منطقة تماس الخلايا المتجاورة، كون طول مسار النوى المرتدة يفوق بكثير قطر الخلية. وبذلك فإن كل جسيمة مشحونة تخترق فعلاً حدود الخلية. فعند جرعات ذات قيمة، تخترق كل خلية من الخلايا مئات الجسيمات المشحونة

ولكن في جميع الأحوال يكون حدوث الاندماج ممكناً فقط في حالة كون الطاقة الممنوحة كذلك في ظروف تماس جيدة بين الأغشية الخلوية. وبشكل وسطي لمسافة تتراوح بين 0.007 - 0.008 ميكرون من الأغشية الخلوية المتجاورة، تمنح كمية من الطاقة حوالي 100 الكترون فولت. ونظراً لتقلبات منح الطاقة في هذا المدى من الدريئة الصغير جداً، يمكن القول بأن الطاقة الممنوحة المؤثرة هامة إلى حد كبير (42) فإذا تزامن مرور الجسيمات المؤينة الحاملة لطاقة كافية عبر منطقة التماس الحديثة للأغشية الخلوية المتجاورة، مع إزالة الماء dehydration في نقطة التماس، أدى ذلك إلى حدوث عيوب في الجزيئات الليبيدية المكونة للأغشية في هذه النقطة وبالتالي إلى اندماج الخليتين المتجاورتين. تشبه هذه الظاهرة اندماج الخلايا بوساطة التيار الكهربائي النبضي الذي يسبب تشوهاً مؤقتاً في الأغشية الخلوية، عند فرق كمون قدره واحد فولت (26). لاحظنا في دراستنا الحالية على المستنبتات in vitro (خلايا Hela , V-79 , لمفاويات الدم المحيطي) اندماج الخلايا بتأثير النترونات السريعة بنسب متفاوتة *. وتتحكم في هذه الظاهرة عوامل متعددة، منها: الجرعة الممتصة من النترونات وشرط التماس المحكم الأفضل وزمن تسجيل ومتابعة الظاهرة ؛ لأن تفاعل الاندماج كما سبق ونوهنا يستغرق زمناً قصيراً يقدر ببضع ثوان وحتى ببضع دقائق. وبالتالي فنحن نحتاج إلى طرائق تجريبية أخرى غير متوافرة لدينا حالياً، لمتابعة هذه الظاهرة البيولوجية الهامة.

ويمكن للأشعة المؤينة أن تؤدي إلى تبدلات مختلفة في طبيعة وبنية الأغشية الخلوية (43، 44) وحتى الآن لم يسجل أي تأثير ملحوظ على المستوى الخلوي كظاهرة الاندماج التي لاحظناها ؛ فإذا أثبتت الطبيعة الغشائية للاندماج الخلوي المحرض فسيكون ذلك بشكل قاطع مثالاً على الأهمية البيولوجية لإصابة الأغشية الخلوية الإشعاعية. وتشكل النتائج التي حصلنا عليها حول علاقة الاندماج الخلوي بعمر الحيوان.

---

* دراسة غير منشورة

إثباتاً غير مباشر على الآلية الغشائية للإندماج المحرض بالأشعة المؤينة. إلى جانب الإثبات غير المباشر الآخر ألا وهو تحقيق الإندماج بجرعات مرتفعة من أشعة غاما كما تقدم: هذه الجرعات مطلوبة لتحقيق منح طاقي في الحجم الميكروي من الأغشية الخلوية في منطقة تماسها المحكم، كافٍ لحدوث التثقيب الإشعاعي الذي يؤدي إلى إندماج مشابه لظاهرة التثقيب الكهربائي electroporation .

يشكّل بحث دور الأغشية الخلوية في ظاهرة الإندماج بالأشعة المؤينة، مجالاً واسعاً أمام المهتمين بميكانيكية هذه الظاهرة، كما ويشكّل هدفاً هاماً للتقنيات الحيوية biotechnology الحديثة: بالهندسة وعلم العقاقير والإنتاج النباتي plant breeding والتهجين وغير ذلك.

References

1- Singer, S.J., and Nicolson, G.L.(1972). The Fluid mosaic model of the Structure of cell membranes. Science 175: 720-731.

2- Membrane Fusion. (1991). Edited by Jan Wilschut, Dick hoekstra. Marcel Dekker, Inc., New York.

3 Wilschut J. (1991). Membrane Fusion in Lipid Vesicle Systems. In: Membrane Fusion (J. Wilschut and D. Hoekstra, ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, PP.89-126

4- Nir. S., Bentz J. et. al.(1983). Aggregation and fusion of phospholipid vesicles. Prog. Surf. Sci. 13: 1-124.

5- Szoka. F.C.(1987). Lipid vesicles: Model systems to Study membrane-membrane destabilization and fusion. In: Cell Fusion (A.E. Sowers, ed.). Plenum Press, New York, pp.209-240.

6 Hoekstra D., and Wilschut J.(1989). Membrane fusion of artifficial and biological membranes. In: Water Transport in Biological Membranes, Vol. I (G.Benga, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL , pp. 143 176.

7 Bentz J., and Ellens H. (1988). Membrane fusion: Kinetics and mechanisms. Colloids Surfaces 30: 65-112 .

8- Hoekstra D.(1991). Fusion of enveloped viruses. In: Membrane Fusion (J.Wilschut and D.Hoekstra, ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp.289-311 .

9- Doms, R.W., White J, et . al. (1991). Influenza virus hemagglutinin and membrane fusion . In: Membrane Fusion (J.Wilschut and D.Hoekstra, ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, pp.313 335.

10- Schramm M., Oates J., et. al. (1982). Fusion and Implantation in biological membranes. Trends Pharmacol. Sci. 3:221- 229.

11- Schmidt A., Patzak A., et. al. (1983). Membrane events in adrenal chromaffin cells during exocytosis: a freeze-etching

analysis after rapid cryofixation. Eur. J. Cell Biol. 32:31-37.

12 Hauser J.E., Riese T.S., et. al. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. J. Cell Biol. 81: 275-300.

13 Marondas N.G.(1975). Polymer exclusion, cell adhesion and membrane fusion. Nature 254:695.

14 Hartmann J. X., Calla J. D., et.al.(1976). The fusion of erythrocytes by treatement with proteolytic enzymes and polyethylene glycol. Can. J.Genet. Cytol. 18: 503-512.

15 Zakai N., Kulka R.G., and Loyter A. (1977). Membrane ultrastructural changes during calcium phosphate-induced fusion of human erythrocyte ghosts.Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 74: 2417-2421.

16 Bachi T., Deas J.E., and Howe C. (1977). Virus-erythrocyte membrane interactoin. In: Cell Surface Reviews. Vol. 2(G.Poste and G.L.Nicolson. eds.) North - Holland, Amsterdam, pp.83-127

17 Vos J., Ahkong Q.F., et. al. (1976). Changes in the distribution of intramembranous particles in hen erthrocytes during cell fusion induced by the bivalent-cation ionophore A23187. Biochem. J. 158: 651 653.

18 Majumdar S., Baker R.F., and Kalfra V.K.(1980). Fusion of Human erythrocytes induced by uranyl acetate and rare earth metals. Biochm. Biophys. Acta 598: 411-416.

19 Stenger D. A., and Hui S.W. (1986). Kinetics of ultrastructural changes during electrically-induced fusion of erythrocytes. J. Membrane Biol. 93: 43 53.

20 Pinto da Silva P., Kazufumi S., and Parkinson C. (1980). Fusion of human erythrocytes by Sendai Virus: Freeze-fracture aspects. J. Cell Sci 43: 119-132.

21 Hui S.W., Isac T., Boni L.T., and Sen A.(1985). Action of

polyethylene glycol on the fusion of human erythrocytes membranes. J. Membrane Biol. 84: 137-146.

22 Knutton S., and Bachi T. (1980). The role of cell swelling and haemolysis in Sendai virus-induced cell fusion and the diffusion of incorporated viral antigens. J. Cell Sci. 42: 153 167.

23 Lucy J.A., and Ahkong Q.F. (1988). Osmotic forces and the fusion of biomembranes. In: Molecular Mechanism of Membrane Fusion (S. Ohki, D. Doyle, T. Flanagan, S.W. Hui, and E. Mayhew, eds.). Academic Press, New York, pp. 163-179.

24 Zimmermann U. (1991). Electrofusion and Electro - permeabilization in Genetic Engineering. In: Membrane Fusion (J. Wilschut, and D. Hockstra, eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 665-695.

25 Neumann E., Schaeffer-Ridder M., et. al. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO. J. 1:841-845.

26 Zimmermann U. (1982). Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim. Biophys. Acta 694: 227 277.

27 Zimmermann U.,Pilwat G., andRiemann F.(1981). Dielectric breakdown of cell membranes. Biophys. J. 14: 881-889.

28 Zimmermann U.(1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol 105: 175-256.

29- Sauer F.A. (1985). Interaction forces between microscopic particles in an external electromagnetic field. In: Interactions Between Electromagnetic Fields and Cells (A. Chiabrera , C. Nicolini and H.P. Schwan, eds.).Plenum Press, New York, pp. 181-202.

30- Mehrle W., Hampp R., et. al. (1988). Mapping of the field distribution around dielectrophoretically aligned cells by means of small particles as field probes. Biochem. Biophys. Acta 939: 561-568

31- Kramer I., Vienken K.,et.al. (1984). Magneto-electrofusion of human erythrocytes.Biochem. Biophys. Acta 772: 407-410.

32 Arnold W.M., and Zimmermann U. (1986). Cell fusion and measurement of membrane properties using electric fields and other forces. Biochem. Soc. Trans. 14: 246-249.

33 Vienken J., Zimmermann U. et.al. (1985). Electro-acoustic fusion of erythrocytes and myeloma cells. Biochem. Biophys. Acta 820: 259-264.

34 Zimmermann U., Vienken J., et. al. (1985). Electrofusion: Anovel hybridization technique. In: Advances in Biotechnological Processes. Vol.4 (A. Mizrahi and A.L.van Wezel, eds.). Alan R. Liss, New York, pp. 79-151

35 Wiegand R., Weber G., and et. al. (1987). Laser induced fusion of mammalian cells and plant protoplasts. J. Cell Science 88, p. 145 - 149

36- Fauclaer Y., Caumaerts D., et. al. (1987). Cellular engineering by "Gamma Fusion" and " Egg Transformation ".IAEA-282/11, PP.453 - 461.

37 Глеба Ю.Ю., Каледа В.А., и. др. (1987). Фертильные ядерные межтрибные гибриды Nicotiana+Atropa, полученные слиянием нормальной и инактивированной облучением соматических клеток. Доклады Акад. Наук СССР, Том. 297, №. 6, с. 1473-1475.

38- Srivastava K.P. and Deshpande D.J.(1982). Induction of oogonial / oocyte fusion by X - irradiation in the ovaries of the red cotton bug, Dysdercus Koenigii Fabr. (Heteroptera: Pyrrhocoridae) . Current Science, Vol.15, No.23, pp. 1121

1122.

39 Ciliano N.Ya., Malinovsky O.V., Khair M.B., et. al. (1988). Polyploidization of rat hepatocytes due to cell fusion Under the effect of radiation of different LET. Radiobiologiya, Vol. 28 , No 1, pp. 68-73.

40 Ciliano N. Ya., Malinovsky O.V., Khair M.B. (1989). On The mechanisms of induction of the cells polyploidization. Biolog. J. of Armenia , Vol. 42, pp. 852 - 858.

41 Ciliano N.Ya., Malinovsky O.V., Khair M.B. (1990). Induction of hepatocyte polyploidization in rats of different age by ionizing radiation of different LET. Radiobiologiya, Vol.30, No.2, pp.194 - 198.

42 Хаир М.Б. (1989). Выход геномных мутаций, индуцированных ионизирующим излучением с различной ЛПЭ в гепатоцитах крыс. Диссе. канд. био. наук, ЛИЯФ АН СССР, Ленинград.

43 Сунгуров А.Ю. (1988). Радиобиология клеточной поверхности. Итоги науки и техники, Радиоционная биология, Т.7.

44 Поливода Б.И., Конев В.В. и Попов Г.А. (1990). Биофизические аспекты радиоционного поражения биомембран. Энергоатомиздат, Москва.