

**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**



# FINAL REPORT FOR SCIENTIFIC RESEARCH

Sy 94 00 319

CELL FUSION INDUCED BY IONIZING  
RADIATION IN VARIOUS CELL LINES

---

DR. AL - MOUTASSEM BILLAH KHAIR

---

DEPARTMENT OF RADIOBIOLOGY AND HEALTH

AECB-B/YRSR 84

JULY 1994

ATOMIC ENERGY COMMISSION

P.O. BOX 6091 DAMASCUS SYRIA

549400319

تقرير نهائي عن بحث عليّ



الاندماج الخلوي المحرض بالأشعة  
المؤينة عند أنماط خلوية مختلفة

الدكتور الممتعم بالله خير

قسم البيولوجيا والصحة الإشعاعية

تموز ١٩٩٤

٨٤ ط ١ س - ب/ت ن ب ع

سورية - دمشق - ص.ب ٦٠٩١

بيت الطائفة الدرزية

AECS-B / FASR -- 84 .

الجمهورية العربية السورية  
هيئة الطاقة الذرية

قسم البيولوجيا والصحة الإشعاعية

الاندماج الخلوي المعرض بالأشعة  
المؤينة عند أنماط خلوية مختلفة

الدكتور الممتعم بالله خير

تموز ١٩٩٤

ه ط ذ س - ب/ت ن ب ع ٨٤

حقوق النشر

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

## 1- الخلاصة :

إن شئوع ظاهرة اندماج الخلايا الحية وأهميتها بشكل محور اهتمام عدد كبير من العلماء في حقول المعرفة المختلفة . ويحدث الاندماج بوساطة العوامل المؤثرة الخارجية المتحددة إلى جانب كونه ظاهرة بيولوجية طبيعية تحدث في أنواع من الفسج أثناء التمايز الطبيعي . ويمكن التوصل للاندماج الخلوي عن طريق المؤثرات الخارجية وفي شروط مخبرية . وقد استخدم الباحثون في دمج بعض نماط الخلايا الحية في الزجاج *In Vitro* البولوي إيتاين غليكول (PEG) (Knutton, 1979; Wojcieszyn, 1983) ، فروس Sendai (Loyter and Volsky, 1982) ، قتلر الكبريتي (Zimmermann, 1963; 1966) ، أشعة الليزر (Wiegand, et al., 1987) ، أشعة غاما (Fameleer, et al., 1987) ، وأشعة رونتجن (Srivastava and Deshpande, 1982) . كما لاحظنا في السنوات القليلة الماضية ظاهرة اندماج خلايا الكبد في الحي *In Vivo* عند الجرذ بوساطة الأشعة المؤينة (Gilliano et al., 1988; 1990) . حيث تم الاندماج بين الخلايا الكبدية بجرعات صغيرة من النيوترونات بحدود 2 غري ، بينما تطلب اندماج هذه الخلايا بأشعة غاما جرعات كبيرة جدا مقدرة بمئات الغري . وتشير هذه النتائج ونتائج الباحثين الآخرين حول الاندماج الخلوي بالأشعة المؤينة وكذلك آراء الاختصاصيين في مناسبات علمية عديدة ضرورة متابعة هذه الظاهرة ودراسة شروطها للتجريبية في الزجاج ك نموذج لتطبيقه في الاستخدامات المتعددة للاندماج ولمعرفة مقدرة الخلايا بعد الاندماج على البقاء والانقسام . حيث يمكن الاستفادة منها في بيولوجيا الإشعاع وتأثير الأشعة المؤينة على المستوى الخلوي، المعالجة الإشعاعية وتحديد الجرعات الفعالة لقتل الخلايا السرطانية دون حدوث اندماج، تقدير الجرعات الإشعاعية بيولوجيا، نقلات الحيوية مثل: علم المناعة، علم العقاقير، الإنتاج النباتي، التهجين وغير ذلك .

تم في هذا البحث دراسة اندماج الخلايا الحية بالأشعة المؤينة في خلايا كبد الجرذ في الحي وفي الزجاج لأنماط خلوية مختلفة : الخلايا السرطانية HeLa ، الخلايا الليفية للقارض قصيني من السلالة V-79 ، لمفويات الدم المحيطي البشري ، لمفويات الدم المحيطي للجرذ . وقد تم تعريض الخلايا في الطور البيني G0 باستخدام النيوترونات السريعة بنوعين: نيوترونات الأشطار بطاقة وسطى 0.85 MeV من المفاعل WWR-M، والنيوترونات السريعة وحيدة الطاقة 14 MeV من مولد النيوترونات كما استخدمت أشعة غاما من منبع كوبالت-60 بمعدل جرعة عالي جدا (186 Gy/min) . ودرست الخلايا بعد التشعيع باستخدام الملونات المقورة بالمجهر

المطور وباستخدام جهاز القياس الخلوي بالانتفاق ( FCM ) Flow Cytometre لقد تابعنا في هذا العمل اندماج الخلايا والفروق بين الأنماط المختلفة ومقدرة الخلايا بعد الاندماج على الانقسام والتجدد.

لقد دلت النتائج على وجود اندماج خلوي في الخلايا المستتبة في زجاج بدرجات مختلفة تعود الى طبيعة الخلايا والى درجة التماس فيما بينها من أجل تحقيق الاندماج . وقد لاحظنا الاندماج في خلايا HeLa السرطانية بنسبة أكبر منها عند الخلايا الطبيعية للقرص الصبغي 79-V. وتبين أن لمقويات الدم المحيطي للجرذ وللإنسان تندمج بنسبة أقل بكثير من الأنماط الأخرى. بينما تحقق خلايا كبد الجرذ في لحمي نسبة اندماج جيدة ولكن تتبع كما بينا سابقا طاقة النيوترونات المستخدمة وعمر الجرذ المشع . لدى دراسة مقدرة الخلايا الكبدية بعد التشعيع على دخول الدارة الخلوية وتركيب الـ DNA تبين عدم وجود تأثير للتشعيع وبالتالي اندماج جزء من الخلايا على تلك المقدرة بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة . طبقت هذه الدراسة على خلايا HeLa بعد تشعيعها أيضا وتبين أن الخلايا شكلت بعد لزراعة لمدة 72 ساعة مستنبتات خلوية طبيعية على شكل طبقة أحادية فوق السواثر الزجاجية. وهذا يدل على أن خلايا HeLa قادرة على الحياة بعد التشعيع وتشكل خلايا جديدة .

## 2- المقدمة :

تجرى الدراسات على الاندماج الخلوي عادة في الزجاج على السلالات الخلوية وباستخدام المركبات الكيميائية مثل البولي إيثيلين غليكول أو الكبريتات الكبريتية أو الليزر . وكل ما لدينا من دراسات حول الاندماج الخلوي بالأشعة المؤينة هو ثلاث نشرات:

الدراسة الأولى ( Srivastava and Deshpande, 1982 ) حيث تم دمج الخلايا البيضاء Oocytes والمنسليات البيضاء Oogonia لعضة Red Cotton Bug ، بوساطة أشعة X- بمعدل جرعة 4.44 غري / دقيقة . ولم تأت هذه الدراسة على ذكر آلية الاندماج ودور الأغشية الخلوية في ذلك ، كما أن النشر لم تذكر بالتحديد الجرعات المستخدمة من أشعة-X . ولكن من الواضح أن الجرعات المستخدمة كانت كبيرة جدا الى حد ما لتتاسب مع ظاهرة الاندماج كرد فعل خلوي على الأشعة.

الدراسة الثانية ( Farnelaer et . al. 1987 ) حول دمج طلائع Nicotiana plumbaginifolia ( N.P ) الطائفة مع الطلائع المشعمة لقمط الطائر Albino mutant لنبات Nicotiana Sylvestris . وقد استخدمت جرعات كبيرة 500 غري من أشعة غاما ، وكان تواتر الاندماج حوالي 1% . ولم تبحث النشر في تفسير وشروط الاندماج الخلوي .

الدراسة الثالثة ( Gleba, et al., 1987 ) درس فيها اندماج قنمط الطفر لنبات ( N.P ) ثنائي الصيغة الصبغية ( 2n ) المشع مسبقا مع نبات *Atropa belladonna* ثنائي الصيغة الصبغية ( 2n ) من قنمط البري. ولستخدم الباحثون جرعات من أشعة غاما تتراوح بين 100-1000 غري . فكانت المرة الأولى التي تنجح فيها تجربة الحصول على خلايا جسمية هجينة وظيفية تامة تحوي في داخلها المادة الوراثية للنباتين الأبوين التي تشكل منهما الهجين وكان تواتر الاندماج يتراوح بين 0,7 - 3,6 % .

وجدنا في بحوثنا السابقة ( Giliano et al., 1988; 1989; 1990 ) إمكانية اندماج خلايا كبد الجرذ في الحي بواسطة الأشعة المؤينة . وحصلنا على نسبة اندماج كبيرة لخلايا الكبد المستقرة في الطور البيني Go. فاستخدمنا جرعات من النيوترونات السريعة 0,25 , 0,5 , 1 , 2 , 4 وحتى 40 غري . لحصلنا على الحد الأعظمي عند الجرعة 2 غري تقريبا ولم تزد زيادة الجرعة إلى زيادة في نسبة الخلايا المندمجة . وتبين من التجارب التي أجريناها ما بين 1985 - 1989 أن ظاهرة اندماج الخلايا الكبدية نتيجة تأثير النيوترونات ترتبط بعدة شروط منها طاقة النيوترونات وعمر الجرذ . إذ تنخفض نسبة الخلايا المندمجة بالنيوترونات مع ازدياد عمر الجرذ . وتبين أن نيوترونات الانشطار بطاقة وسطى 0,85 MeV أكثر فعالية في إحداث اندماج الخلية من النيوترونات السريعة 14 MeV . كما ذلك اختبارنا أن أشعة غاما لفترة على إحداث اندماج الخلايا الكبدية ولكن باستخدام جرعات فوق مميتة وهي 700-1200 غري . وهذه تشابه الجرعات المستخدمة في منح الطلائع النباتية المذكورة أعلاه . وعليه فإن اندماج الخلايا الكبدية يتناسب مع نقل الطاقة الخطي للإشعاع ، الذي يتناسب بدوره عكسا مع طاقة الإشعاع المستخدم .

يمكن من حيث المبدأ تحقيق الاندماج الخليوي المعرض بمرور البروتونات شديدة التأيّن والنوى المانحة الأكثر ثقلا الناتجة عن التثقيب بالنيوترونات السريعة عبر الأغشية الخلية في منطقة تماس الخلايا المتجاورة . وبما أن طول مسار النوى المرتدة يلقو بكثير قطر الخلية فإن كل جسيمة مشحونة تخترق فعلا حدود الخلية. فعند جرعات كافية تخترق كل خلية من الخلايا مئات الجسيمات المشحونة ولكن في جميع الأحوال يكون عددا محدودا منها فقط ذو فعالية كما في الطاقة الممنوحة كذلك في ظروف تماس جيدة بين الأغشية الخلية . وبشكل وسطي في نخافة تتراوح بين 0,007 - 0,008 ميكرون لفصلتين خلوئيين متجاورين تمنح كمية من الطاقة حوالي 100 eV . ونظرا لتقلبات منح الطاقة في هذا المدى من الدرنبة الصغير جدا ، يمكن القول بأن الطاقة الممنوحة المؤثرة هامة إلى حد كبير ( Khair, 1989 ) . فلذا تزامن مرور الجسيمات المؤينة العاملة لطاقة كافية عبر منطقة التماس المحكم للأغشية الخلية المتجاورة مع نزع الماء dehydration في نقطة التماس هذه ، في تلك

الى حدوث عيوب في الجزيئات الليبيدية المكونة للأغشية في هذه النقطة وبالتالي الى اندماج الخليتين المتجاورتين . تشبه هذه الظاهرة اندماج الخلايا بواسطة التيار الكهربائي النبضي الذي بسبب تشوها مؤقتا في الأغشية الخلوية عند فرق كمون قدره 1 - 100 فولت ( Zimmermann , 1983 ) .

بين ( Zimmermann and Kuppers, 1983 ) في دراسة الاندماج الخلوي بواسطة الأمواج الكهرومغناطيسية *electromagnetic waves* علاقتها بالتطور لمكثية الاندماج الخلوي بالأمواج الكهرومغناطيسية عند البروتوبلاست *Protoplasts* المستخرجة من أوراق نبات *Avena sativa* . ولوحظ الاندماج عند تطبيق جهد حتى 4 فولت ( المطابقة 50 - 200 فولت / سم ) وبتردد 1 MHz وتحتاج عملية الاندماج وعودة كروية الخلايا الى دقيقتين . ويعتقد الباحثان أن هذه التجارب تظهر دون ترتيب لمكثية تحريض الاندماج بواسطة الأمواج الكهرومغناطيسية في مجال الأمواج الطويلة حتى القصيرة ( 10 Km وحتى 30m التي تطابق مجال ترددات الراديو وبالتالي 30 KHz وحتى 10 MHz ) . هذا المجال من الترددات للأمواج الكهرومغناطيسية ينبعث من الشمس عند الكثافة الضوئية المرتفعة حيث يبلغ الحقل الكهربائي على سطح الأرض 1 فولت / سم . ويضيف الباحثان أن الأرض خلال عملية التطور قد تعرضت في الأمواج الكهرومغناطيسية من الشمس والى الحقل الكهربائي القوية التي تشكل أثناء البرق في العواصف الرعدية . فالحقل الكهرومغناطيسية الناتجة في مثل هذه الظروف ( بمعدل 10 V / cm ، وباستمرارية 1 - 100 ميكرو ثانية ) أكثر من كافية لحدوث التنقيب الكهربائي للأغشية الخلوية اللازم للاندماج . وهكذا فالاندماج الكهربائي بشكل آلية فعالة لإنتاج الهجائن الخلوية وبصفات جديدة من الكائنات وحيدة الخلية أو البويضات ، كما أن بعض هذه الهجائن قادرة على الانقسام والتكاثر وذلك اعتمادا على زمن التعريض وشدة الحقل الكهربائي الذي تعرضت له . يمكن بنفس الشكل وبهذه الشروط أن يكون للأشعة المؤينة دورا في عملية التطور التي حدثت على سطح الأرض في ذلك الوقت.

بناء على ما تكلم وعلى الأهمية البيولوجية لظاهرة الاندماج الخلوي بشكل عام كان من المناسب دراسة اندماج الخلايا بواسطة الأشعة المؤينة عند ألمات خطوية مختلفة في لزجاج . وذلك لمعرفة الشروط الأساسية لتحقيق الاندماج من الناحية الفيزيولوجية المتعلقة بطبيعة الخلايا وحالتها أثناء التشعيع ومن الناحية الفيزيائية المتعلقة بطبيعة الأشعة والجرعة وزمن التشعيع وزمن تسجيل الاندماج الناتج - كون هذا الموضوع لم يدرس حتى الآن بشكل موسع كما نشرنا سابقا . من ناحية أخرى يحقق التشعيع بالنيوترونات وجرعات صغيرة نسبة لاندماج كبيرة تصل الى 50% من الخلايا الأصلية مما يعايرها كضحية على الطرائق الأخرى في تحقيق الاندماج الخلوي باستخدام PEG ، التيار الكهربائي أو أشعة الليزر والتي لا يمكن استخدامها في دمج الخلايا في الحي . وتشكل



الأهمية التطبيقية لهذه الظاهرة إلى جانب الأهمية البيولوجية للبحث ، في مجال التفاعلات الحيوية المهمة بطم المناعة والخلايا والانتاج النباتي والتهجين وغير ذلك مما أثار لدراسة ظاهرة الاندماج الخلوي بالأشعة المؤينة بشكل أفضل ومعرفة طبيعتها ، ومقدرة الخلايا المنتمجة البيولوجية . وقد يكون عدم التوصل إلى نتائج مؤكدة في معالجة الأورام بالنيوترونات ناجم عن اندماج الخلايا الورمية مع بعضها البعض أو مع خلايا طبيعية بتأثير النيوترونات مما يؤدي إلى تشكل خلايا متعددة الصيغة الصبغية ذات مقدرة وظيفية ومقاومة لتفاعلية أكبر ( Brodskij and Uryvaeva, 1981 ) . حيث يعتبر ظهور الخلايا متعددة النوى في أنسج المتجددة بالتحريض أو في النمو الورمي ثباتا على إمكانية الاندماج الخلوي الأنوي عند الخلايا المنقسمة ( Kura et al., 1978 ) . كما لوحظ عند متابعة خلايا HeLa تشكل خلايا متعددة النوى من خلايا وحيدة لنوى نتيجة تعريضها لأشعة X ، ويعتقد الباحثان أنها تشكلت من اندماج الخلايا حديثة الانقسام ( Hurwitz and Tolmach, 1969 ) . وعليه كان لابد من دراسة ظاهرة الاندماج الخلوي المحرض بالأشعة المؤينة عند أنماط خلوية مختلفة وذلك لإثباتها كرد فعل خلوي على تأثير الأشعة المؤينة من جهة وتحديد كل شروط المنطقة بهذه الظاهرة من جهة أخرى . فمنا بدراسة اندماج الخلايا في مستنبتات أنواع مختلفة من الخلايا: الخلايا السرطانية HeLa ، الخلايا الليفية للقرص الصدني V-79 ، لمغويات الدم المحيطي للإنسان ولمغويات الدم المحيطي للجرذ . إلى جانب دراسة هذه الظاهرة في كبد الجرذ . وقد درس في هذا البحث دور: طبيعة الأشعة المؤينة المستخدمة، معدل الجرعة ، مقدار الجرعة ، زمن تسجيل ظاهرة الاندماج وذلك باستخدام مصادر نيوترونية مختلفة وأشعة غاما . كما استخدمت الطرائق الحديثة في تحليل الخلايا مثل جهاز قياس الخلوي بالتدفق FCM والمجهر المطور . وقد عولجت في هذا البحث النقاط التالية :

- 1- تشعيع الجرذون بنيوترونات المنبع Be /Am ذو نفاذ 710 من النيوترونات السريعة .
- 2- تشعيع الجرذون بجرعة مجزأة من نيوترونات الانشطار في لقاء البيولوجية للمفاعل VVR-M.
- 3- تشعيع الجرذون بمعدلات جرعة مختلفة من الأشعة المؤينة .
- 4 - تشعيع خلايا HeLa و V-79 للمستنبتة في تزاوج بنيوترونات الانشطار.
- 5- تشعيع لمغويات الدم المحيطي للجرذ وللإنسان بنيوترونات الانشطار والنيوترونات وحيدة طاقة 14 MeV.
- 6- دراسة قدرة خلايا كبد الجرذ على تركيب الـ DNA بعد الاندماج الخلوي المحرض بنيوترونات الانشطار.

### 3- المواد والطرائق والقياسات:

#### 1- المواد :

استخدمت في العمل المواد التالية : مطول Hank's ، مضادات حيوية ( بنسيلين وستربتومايسين ) ، وسط لزراع المغذي Iglu ، سيروم دم البقر وهي من إنتاج روسي ، كلور الصوديوم النقي ، أمونات الصوديوم المائية  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  ، حمض الخل لتلجي  $CH_3COOH$  ، تولوين ( ميرك الألمانية ) ، فيكول ( سينغا الأمريكية ) لفصل لمفويات الدم المحيطي ، كحول طبي ( سورية ) . استخدمت المستنبتات الخلوية Hela و V-79 المستنبتة في مخبر البيولوجيا الخلوية في قسم الفيزياء الجزيئية والاشعاعية التابع لمعهد بطرسبورغ للتيزياء النووية ، جردان بيضاء من السلالة Rappolovo الروسية ، لمفويات الدم المحيطي للجرذ وللإنسان . كما استخدمت الملونات التالية :

1- دلي [ 4,6 - Diamidino - 2 - phenylindole 2HCl ] ورمزه DAPI ( ميرك الألمانية )  
C16H15N5 2HCl .

2- إيثيديوم بروميد [ 2,7 Diamino - ethil - 9 - fenilfenan tridium bromide ] ورمزه EB  
C21H20N3Br ( روسيا ) .

3- هوست No.3334 Hoechst ( ميرك الألمانية ) .

4- رودامين Rhodamine 123 ( سينغا الأمريكية ) .  
[ 2 - ( 4 - Ethoxyphenyl ) - 5 - ( 4 - methyl - 1 - piperazinyl ) - 2,5 - bi - 1H - benzimidazole ] Trihydrochloride . C27H28N6O.3HCl .

5- ملون الأورسين Orcein ( ميرك الألمانية ) .  
[ 2 - ( 6 - Amino - 3 - imino - 3H - xanthen - 9 - yl ) benzoic acid methyl ester ]  
C21H17ClN2O3

6- ملون أزرق الميتيلين Methylene Blue ( روسيا ) . C16H18ClN3S

7- التيميدين  $^3H$  لكشف تركيب الـ DNA ( روسيا ) .

8- المستطاب الحساس لأشعة بيتا B نمط " P " ( روسيا ) .

\* التجهيزات التي استخدمت في البحث :

خيمة زرع عقمة ، مثقلة ، حاضنة ، حمام مائي ( إنتاج روسي ) ، مجهر منظور ( Opton - ألمانيا )  
مجهر ضوئي ( Olympus - اليابان ) ، جهاز لقياس الخلوي بالفلتق Flow cytometre معتمد على لمبة  
UV تطبيق قسم البيوفيزياء الجزئية الأشعاعية في معهد بطرسبورغ للفيزياء النووية . مفاعل لبحث من النمط  
VVR-M للروسي ، مولد النيوترونات السريعة 14 ميغا إلكترون فولت صناعة روسية ، جهاز أشعة غاما  
Issledovatel بمنبع كريات-60 تصميم روسي . منبع نيوترونات سريعة ( Be/Am ) بتدفق 710 n/sec.  
التابع لقسم الوقاية الإشعاعية والأمن النووي .

ب - الطرائق :

- تحضير المستنبتات الخلوية :

لما بتحضير مستنبتات الخلايا السرطانية HeLa والخلايا الليفية V-79 للفرض الصيني . هذه السلالات  
تستقبل منذ عشرون عاما في مخبر البيولوجيا الخلوية في قسم البيوفيزياء الجزئية والأشعاعية . استخدم وسط  
مغذي Iga باضائة مصلى البقر بنسبة 15% . يمكن تحقيق تزامن الخلايا في الدورة الخلوية بطرق مختلفة  
وخاصة باستخدام المثبطات الكيميائية ولكن الطريقة الأسهل والأفضل بحيث لاتعاني الخلايا أي تأثيرات أخرى  
هي الفصل المبتوزي والذي يعتمد على الاختلاف في التصاق الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة على جدار زجاجة  
الزراعة . حيث تفصل الخلايا بسهولة عن الجدار نتيجة رج بسيط للزجاجة . وتستخدم هذه الطريقة لأكثر  
الأنماط الخلوية التي تنمو بطبقة وحيدة ( Tolmach , 1990 ; Terasima and Tolmach , 1963 ) .  
تحضير معلق الخلايا من أجل التوسع لما يتبدل وسط لزراع الحلوي على المصل بوسط مغذ غير حاوي على  
المصل. بعد 24 ساعة من الحضانة في الوسط المغذي ( الأئسي ) لما ينزع الخلايا بوساطة مطول موالي  
( فيرسن ) ومن ثم التفتيل وتبديل المحلول الموالي بالمطول المغذي .

- عزل لمغلوبات الدم المحيطي :

تعزل للمغلوبات من الدم المحيطي بوساطة عمود الكاثالة . يؤخذ دم وريدي من الإنسان أو من القب الجرد  
مباشرة بوساطة محقن معقم مضبول بالهيبيرلين لمنع تخثر الدم. يمدد الدم الكلي بنفس الحجم من المحلول الموالي  
PBS . يحضر عمود الفصل في أنبوب تقوّل ( 10 - 15 ) بحوي على 3 مل فيكول - ميتريزوات . يضاف  
الدم الممدد إلى أنبوب التقوّل بوساطة ماصة باستور دقيقة النهاية بحيث تشكل الماصة زلوية للقمة مع جدار  
الأنبوب وبحيث يسيل الدم على الجدار وبشكل طبقة منفصلة فوق طبقة الفيكول . بعد ذلك يتم التفتيل بسرعة

1500g خلال 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة . تؤخذ بعد ذلك طبقة وحيدات النوى المتوضعة بين طبقة الكريات الحمراء ( المسطبة ) وطبقة السائل ( الخلوية ) . تنقل هذه الخلايا الى أنبوب تنقل نظيف ومعقم . يمدد المعلق بعد تلك بأربعة أضعاك حجمه على الأقل بالوسط المغذي المستخدم ، ويمزج بشكل جيد ومن ثم ينقل من جديد للحصول على المفلويات النظيفة في كسر الأنبوب ( Hunt , 1990 ) .

- طريقة القطع الجزئي للكبد :

تم تحريض خلايا الكبد على التجدد بوساطة القطع الجزئي للكبد . تعتمد هذه الطريقة على قطع فصين كاملين من الكبد ( الطويين ) وهذا يعادل ثلثي الكبد . قطع الفصين بعد أن تم شد رباط حول الفصين الأيسر والمركزي في نقطة التقاء الفصوص . أبقينا في الجوف الفص الأيمن الجنبى والفص الأثني من الكبد . تدخل الخلايا الكبدية بعد التحريض بشكل متزامن بالدارة الخلوية بعد أن كانت في حالة استقرار ( Go-Phase ) ( Gilliano and Malinovsky , 1976 ; Khair, 1989 ) .

- الحصول على معلق خلايا الكبد:

قتلت الحيوانات في فترات زمنية مناسبة من 17 - 28 ساعة بعد القطع الجزئي، لدراسة تركيب لـ DNA عبر الدارة الخلوية . فتح البطن والقض الصدري وعبر الأذينة القلبية اليمنى والوريد الباهي الكبدي ، حقن محلول ليمونات الصوديوم بتركيز 1.2% ودرجة حرارة 37° درجة مئوية . ينتج الكبد نتيجة مرور المحلول عبره ما يزيد الى تلك النسب وطرد الدم الموجود داخل الكبد . يغسل الكبد المتأصل من جديد بمحلول ليمونات الصوديوم ثم يوضع ضمن طبقة مضاعفة من الشاش الطبي وتجعل على شكل صرة . يتكك الكبد الى خلايا مفردة عن طريق ضغط بسيط على الصرة ضمن طبق بتري حلوي على ليمونات الصوديوم . يرشح المعلق الموجود في طبق بتري عبر أربع طبقات من الشاش الطبي الى أنبوب تنقل سعة 15مل وينقل بسرعة 1000g لمدة خمس دقائق . الخلايا الناتجة ثبتت بالكحول الايثيلي بالتراليز التالية 96% , 70% , 50% بالتركيز . أعيد التثبيت بالكحول 96% لعدة مرات للحصول على معلق خلوي نظيف . تم بعدها احصاء تركيز الخلايا في المعلق من أجل التكوين والتحليل الخلوي بالتلحق .

في الدراسة المجهرية العادية والدراسة بالتصوير الأشعاعي الذاتي تم صنع محضرات على صفائح مجهرية من المعلق الخلوي بعد التثاق الأول ( قبل التثبيت بالكحول ) على شكل لطخات Smears وبعد جفاف المحضرات تم تثبيتها بالكحول الايثيلي 96% وتلوينها بالأورسين ولزرق الميتالين أو بأحدهما.

## - طريقة التصوير الأشعاعي الذاتي :

تعتمد طريقة التصوير الأشعاعي الذاتي على إدخال مادة استقلابية موسومة بنظير مشع إلى الخلايا المراد دراسة التركيب الحيوي فيها ومن ثم اظهار مكان وجود النظير عن طريق فيلم أو مستطب حساس تغطي به المحضرات . حيث تؤدي جزيئات B المنبعثة من النظير المشع إلى لرجاع حبيبات الفضة في الطبقة الصلبة فوق الخلايا الحاملة للنظير المشع .

لقد استخدمنا هذه الطريقة لتحديد تركيب الـ DNA في خلايا كبد الجرذ بعد التشعيع . حيث عرضت خلايا الكبد بالقطع الجزئي للدخول في الدارة الخلوية بعد التشعيع بجرعة واحد غري من نترونات الانشطار بطاقة وسطى 0.85 MeV بأربع ساعات وهي المدة الكافية لانتهاؤ عملية الاندماج ( Gilliano et al., 1988 ) ثم حقن الحيوانات المشعة والشاهدة بالتيميدين-<sup>3</sup>H وجرعة 0.3 ميكروكوري / غ وزن قبل ساعة من قتلها . قُلت الحيوانات في فترات متباعدة من مرحلة تركيب الـ DNA ( S-Phase ) . أخذ منها الكبد وحضرت المحضرات المجهرية التي لونت بعد تثبيتها بالكحول بملون الأورسين . بعد ذلك غطيت المحضرات بطبقة متجانسة من المستطب الحساس من النمط ( P ) وحفظت في الظلام بدرجة حرارة 4+ م لمدة أسبوعين . بعد اظهار المحضرات تم احصاء الخلايا الموسومة في كل محضر على حدة من أصل مئة خلية . قبل احصاء الخلايا الموسومة تم احصاء الرسم الصناعي في المحضرات وذلك باحصاء حبيبات الفضة في مساحة من الميتوبلازما تعادل مساحة الفتوة رابعة الصيغة الصبغية . وبذلك اخذت بعين الاعتبار القوى الموسومة بعدد من حبيبات الفضة أكبر من عدد حبيبات الفضة في الرسم الصناعي ( Gilliano and Malinovsky, 1976; Khair, 1989 ).

## - عمليات التشعيع :

### • التشعيع بالنترونات السريعة من المفاعل VVR-M :

تم التشعيع في القناة البيولوجية للمفاعل VVR-M المخصصة لذلك والمتوضعة عموديا على قلب المفاعل. تتوضع القناة البيولوجية على بعد 1.5 متر من مركز المنطقة النشطة. ان النترونات في القناة البيولوجية هي نترونات الانشطار في المنطقة النشطة للمفاعل وطاقتها الوسطى 0.85 ميجا إلكترون فولت . تم التشعيع في الشدة المعتدلة للمفاعل 16 - 18 مليون واط وبالتالي شدة جرعة النترونات كانت بحدود 0.3 - 0.33 غري / دقيقة أما جرعة أشعة غاما المختلطة بها اشكلت 0.11 - 0.12 غري / دقيقة.

• التشعيع بالنترونات السريعة ووحدة الطاقة من مولد أنترونات :

استخدم مولد النترونات السريعة ووحدة الطاقة 14 MeV الذي يعتمد على التفاعل بين الديتريوم  $^2D$  والنتريوم  $^3H$  والذي تنطلق بنتيجته النترونات السريعة ووحدة الطاقة وجزينات الهيليوم  $^4He$  لهذا المولد مخرج 1210 نترون / ثانية وبذلك يؤمن جرعة النترونات المطلوبة في زمن قصير وبمعدل 0.12 غري / دقيقة.

• التشعيع بمنبع النترونات السريعة من الليريسيوم - ليرثيوم :

استخدم المنبع الموجود في قسم الوقاية الإشعاعية والأمان النووي المؤلف من ذرات الاميرثيوم والبيرليوم (Be / Am) ذو الكثافة 1.1 710 نترون / ثانية بكامل الفراغ . وضع المنبع وهو على شكل اسطوانة بطول 6 سم وقطر 3 سم في حوض من البرلين صنع خصيصا لذلك . تم وضع الحويون في اسطوانة بلاستيكية متقبة على تماس مع المنبع بحيث كان المنبع يغطي منطقة الكبد . حسبت الجرعة الممتصة وقدرت بحدود 0.7 غري / ساعة .

• التشعيع بأشعة غاما:

استخدم جهاز Isstedovatel للتشعيع وهو يعتمد على الكوبالت -60. تشكلت الجرعة الممتصة 134 غري / دقيقة في المركز بضاف لها 52 غري الجرعة الممتصة في زمن دخول وخروج العينة في أنبوبة التشعيع أي الجرعة النهائية 186 غري / دقيقة .

- التلوين:

• التلوين المضاعف:

حضر ملون الأورسين بحل 2 غرام من الملون في 45 مل من حمض الكلثجي المسخن مسبقا لدرجة 60 مئوية ثم أضيف الماء المقطر ليصبح الحجم الكلي 100 مل . لونت الصفائح المثبتة بالأورسين لمدة خمس دقائق ، بعدها غسلت المحضرات بمطول حمض الكلثجي تركيزه 45% . بعد ذلك وضعت المحضرات في الكحول الإيثيلي بتركيز 70% ، 95% ، 100% لمدة دقيقتين في كل منها على التتابع . ثم وضعت لمدة خمس دقائق في حوض التلوين 1 ومثلها في حوض التلوين 2 .

حضر ملون أزرق الميتالين بحل 0.5 غرام من الملون في 100 مل من مطول بورات الصوديوم بتركيز 1% غطيت المحضرات بالملون وسخننت حتى الدرجة 50 مئوية لمدة 1-3 دقيقة بعد ذلك غسلت المحضرات بالماء المقطر لازالة الملون الزائد .

• تلوين بملون DAPI :

تضلل الخلايا المثبتة بالكحول في 5 مل من المطول المولي SSC ( 0.15 مول من مطول كلور الصوديوم + 0.015 مول من ليونات الصوديوم ) . يضاف الملون المحضر في الماء ثنائي التقطير بتركيز 0.1 ميكروغرام / مل إلى الخلايا . تحضن الخلايا في الملون لمدة 15-30 دقيقة في الدرجة 37 مئوية . يتوضع هذا الملون على الـ DNA الخلوي وخاصة على الثنائيات T-A ويتأق عند طول موجة امتصاص أعظمي 350 نانومتر ( Waggoner ,1990 ; Crissman and Steinkamp , 1990 ) .

• تلوين بملون الأينديوم برومايد EB :

تضلل الخلايا المثبتة بالكحول في 5 مل من المطول المولي SSC. يضاف مطول أنزيم RNase ( 1 مغ / مل ) للمسخن مسبقا للدرجة 95 مئوية والمبرد حتى 37 مئوية ، يضاف إلى الخلايا وتحضن في الدرجة 37° مئوية لمدة 60 دقيقة للتخلص من التشويش الذي يحدثه الـ RNA نتيجة لتبدله بالملون . تضلل الخلايا بعد ذلك بالمطول المولي ثم يضاف الملون بتركيز 0.001 مول . تحضن بعدها الخلايا في حمام مائي بدرجة 55 مئوية لمدة عشرين دقيقة . يعطي EB تالقا في اللون الأحمر وعند طول موجة امتصاص أعظمي 510 نانومتر . ويعتبر ملون نوعي لسلاسل DNA و RNA ، حيث يدخل Intercalate ما بين الثنائيات الاسمية في السلسلتين المتقابلتين ويرتبط بها دون تمييز نوعي . ويستخدم لدراسة DNA الخلايا المثبتة ( Crissman and Steinkamp , 1990 ) .

• تلوين بملون HO 33342 :

من المعروف أن هذا الملون يستخدم لتلوين DNA في الخلايا الحية ويتوضع بشكل خاص على الثنائيات T-A من الخارج ولا يدخل بينها ويتأق بشكل أعظمي عند طول موجة 340 نانومتر . يضاف الملون إلى المستنبت الخلوي مباشرة بحيث يصبح التركيز النهائي للملون في المستنبت ما بين 2 و 5 ميكرو غرام / مل وبحضن في الدرجة 37 مئوية لمدة 30 - 90 دقيقة حسب نمط الخلايا ، حضنا لمدة 60 دقيقة ( Crissman and Steinkamp , 1990 ) .

• تلوين بملون R 123 :

يستخدم R123 كلون حيوي مفلور للخلايا الحية حيث يمكن بواسطته متابعة تجدد الكنيدرات Mitochondria . وقد استخدمنا هذا الملون لتلوين الميتوبلازما الخلوية حيث يتوضع على الكنيدرات ( Crissman and Steinkamp , 1990 ) . يختلف التركيز المستخدم من هذا الملون حسب نمط الخلايا

المدرسة وحسب طبيعة الدراسة . وقد استخدمنا الملون بتركيز 2 ميكروغرام / مل وذلك لتحقيق قلوقة كافية تكشف عند طول موجة 511 نانومتر .

- التحليل بالمقياس الخلوي بالتألق FCM :

تم تحليل الملققات الخلوية على جهاز القياس الخلوي بالتألق المصنع في قسم البيوفيزياء الجزيئية والأشعاعية لمعهد بطرسبورغ للفيزياء النووية والمشابه للأجهزة الأخرى المعروفة من هذا النمط. وهو جهاز وحيد المعيار ذو نظام ذاتي لتسجيل وجمع المعلومات . الجهاز مصنع حسب النظام التجاري " CAMAC " . يعتمد هذا الجهاز على الأشعة فوق البنفسجية -UV في إثارة تألق الملون . تصحب العينة من أنبوب بواسطة ساحة آلية إلى حجرة التألق ذات النمط المظلم . يتألق الملقق الخلوي في نقطة تقاطعه مع الأشعاع الصادر من المنبع الضوئي . وتكون شدة التألق متناسبة مع كمية الملون الموجودة في الخلية ويعكس ذلك كمية الـ DNA التي تحتويها كل خلية على حدة . يسجل التألق الحاصل بواسطة مستقبل ضوئي ينقل الإشارة إلى محل إلى الكتروني يسجل المخطط البياني للعينة وتوزع الخلايا حسب محتواها من الـ DNA وكمية كل فئة منها والتي تخزن في الحاسوب. يؤمن نظام تمرير العينات مرور الخلايا عبر الساحة الفعالة ونقطة ثابتة لتسجيل النبضة الضوئية . يمكن لأجهزة القياس الخلوي بالتألق أن تؤمن سرعة قياس كبيرة كما تؤمن نتائج قياس دقيقة جدا .

- معالجة النتائج:

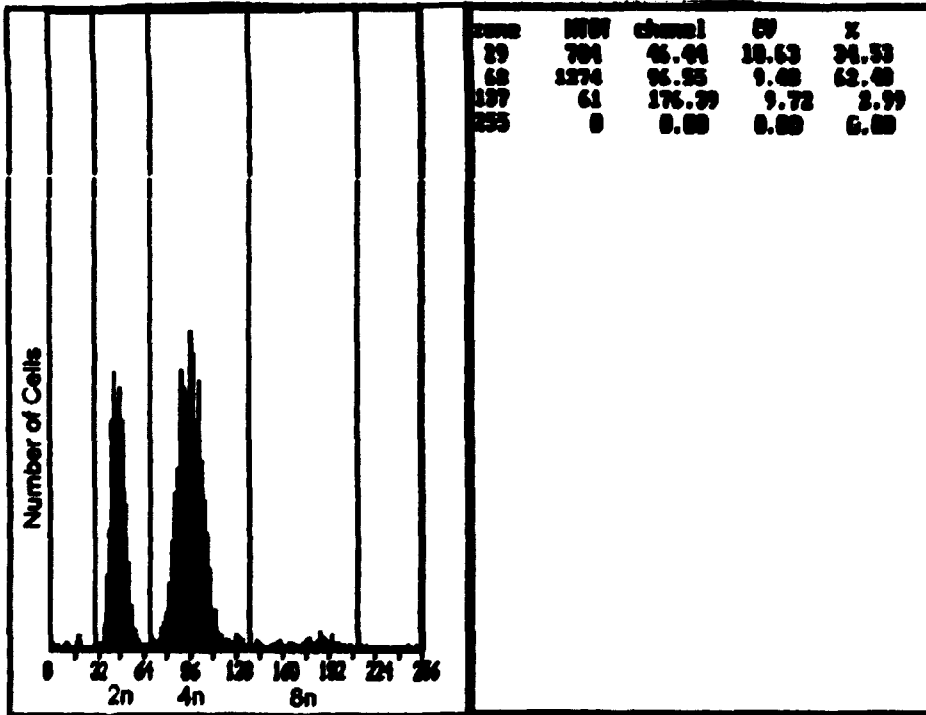
يتصل المحلل الإلكتروني الآلي لجهاز القياس الخلوي بحاسوب يؤمن نقل المخططات البيانية المسجلة في ذاكرة الجهاز إلى ذاكرة الحاسوب أو إلى اسطوانات مرنة . يمكن أن تنقل المخططات البيانية المحفوظة على الاسطوانات المرنة في أي وقت إلى شاشة الحاسوب من أجل معالجتها . تعتمد المعالجة الرياضية على تقسيم المخطط البياني إلى مناطق غير متداخلة تقابل هذه المناطق مجموعات الخلايا حسب محتواها من الـ DNA . يتم تقسيم المخططات إلى مجموعات من قبل المشغل بواسطة محددات تظهر على الشاشة عن طريق أزرار لوحة المفاتيح . يعطي بعد ذلك أمر البرنامج من أجل حساب القيم في كل مخطط . يعطي البرنامج القيم التالية على شاشة الحاسوب إلى جانب كل مخطط ( لشكل 1 ) :

- العدد الكلي للخلايا المسجلة .
- عدد الخلايا في كل منطقة من المخطط البياني على حدة ( NTOT ) .
- النسبة المئوية لكل مجموعة من الخلايا ( % ) .
- مكان تواضع كل مستو من الـ DNA في المخطط ( Channel ) .



- معامل التبدل لكل مجموعة من الخلايا (CV).

وضع برنامج معالجة البيانات الدكتور البيروت فالريف من معهد بطرسبورغ للتغذية النووية .



الشكل ( 1 ) : مخطط توضيحي يبين كيفية ظهور ومعالجة نتائج التحليل بجهاز القياس الخلوي بالتحقق.

استخدم من أجل التكرار الأحصائي ( 4 - 8 ) حروفات أو ( 2 - 3 ) مستطبت لكل نوع من الخلايا .

وذلك للنقطة المدروسة الواحدة . وحسب المتوسط الحسابي لكل نقطة بالمعالجة التالية :

$$X = \sum X_i / n$$

وحدد الخطأ النسبي للمتوسط الحسابي بعلاقة التالية:

$$\frac{(X - \bar{X})^2}{n(n-1)}$$

$$n(n-1)$$

حيث  $\bar{X}$  - المتوسط الحسابي للقيم التجريبية.

$\bar{X}$  - القيم التجريبية للمكررات.

$n$  - عدد المكررات .

جميع النتائج في الجدول هي متوسطات حسابية للأرقام التجريبية لكل نقطة دراسية .

#### 4 - النتائج والمناقشة:

##### 1 - تشعيع الجرذان بتقنيات المنبع $Be/Am$ :

تم تشعيع ذكور جرذان ببضء ذات عمر واحد تقريبا بحدود 90 - 100 يوم بواسطة المنبع النيوتروني  $Be/Am$  . حيث استخدمنا جرعتين مدة الأولى 3 ساعات والثانية 6 ساعات وتعادل هاتين جرعتين ممتصتين 2.1 و 4.2 غري حسب قياسات قسم الفوقية الأشعاعية والأمان النووي . بعد عشرين ساعة قتلنا الحيوانات وهذا زمن كاف جدا لتحقيق الانسماج الخلوي وحضرت من الكبد مطلقات خلوية . صنع منها لطاخات على صفائح زجاجية من أجل الدراسة المجهرية والقسم الآخر من المعطوق ثبت بالكحول تدرجيا من أجل التحليل الخلوي بالتعلق .

درست المحضرات المجهرية بالمجهر الضوئي العادي وأصبحت النسبة المئوية لكل فئة من الخلايا حسب حجم لنوى وعدها في كل خلية والتي تعكس بشكل غير مباشر محتواها من الـ DNA أجريت لدراسة على الحيوانات المشعة والحيوانات لشاهدة . وهي مبينة في الجدول ( 1 ) . لا يلاحظ فروق بين خلايا الكبد لشاهدة والمشعة بكلا الجرعتين في نسب كل فئة من الخلايا حسب محتواها من الـ DNA .

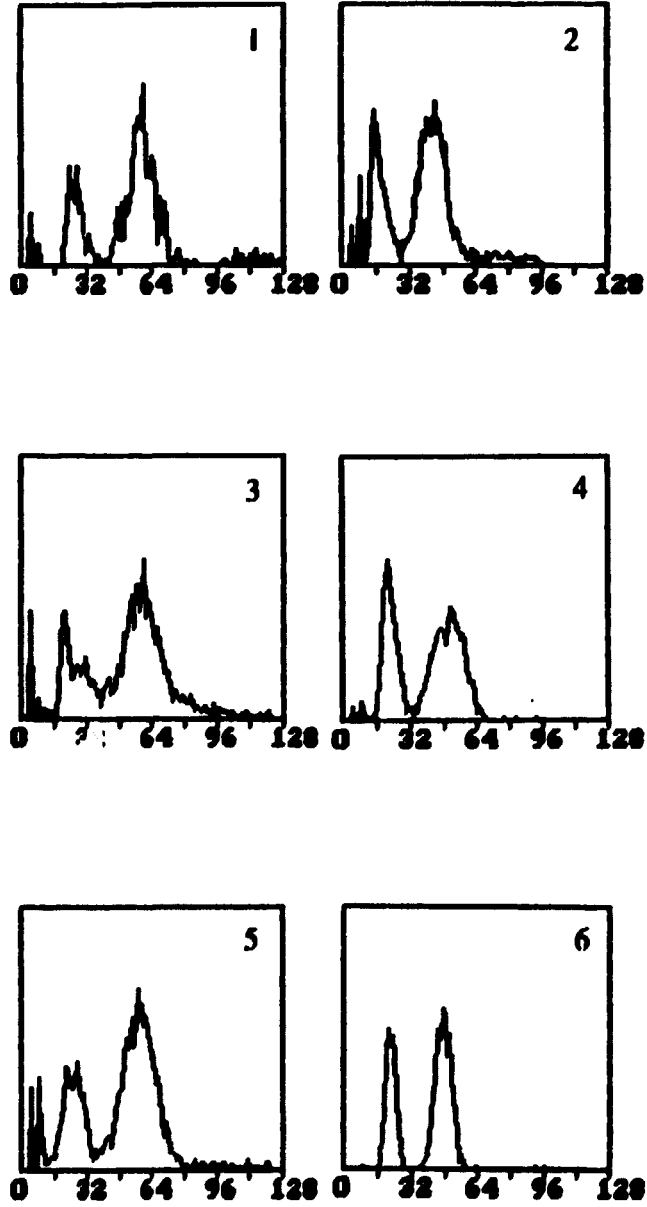
جدول 1: النسب المئوية لتوزيع خلايا كبد الجرذان بعمر 90 - 100 يوم ، حسب محتواها من الـ DNA بعد تعرضها لنترونات المنبع Be/Am لسريمة .

الجرعة	النسب المئوية لتوزيع الخلايا حسب محتواها من الـ DNA			
	2n	4n	8n	%
Control	24,6 ± 1,5	63,1 ± 1,7	12,3 ± 1,5	100
2,1 Gy	30,3 ± 4,5	63,1 ± 2,7	6,6 ± 1,7	100
4,2 Gy	26,7 ± 1,2	66,9 ± 1,0	6,4 ± 0,2	100

لدى دراسة الملق الخلوي بالمعزس الخلوي بالتكثف بعد تلويها بملون DAPI ، تبين أيضا عدم وجود لروق في كل مستو صبغى بين الشاهد والمشع . يتضح ذلك من الجدول ( 2 ) ، والشكل 2 الذي يبين المخططات البيئية للخلايا الكبدية بعد تطاها بالمعزس الخلوي بالتكثف .

جدول 2: النسب المئوية لتوزيع خلايا كبد الجرذان بعمر 90 - 100 يوم ، حسب محتواها من الـ DNA بعد تشعيعها بنترونات المنبع Be / Am لسريمة .

الجرعة	النسب المئوية لتوزيع الخلايا حسب محتواها من الـ DNA			
	2n	4n	8n	%
Control	26,9 ± 1,5	63,8 ± 2,3	9,3 ± 0,8	100
2,1 Gy	30,5 ± 4,0	64,0 ± 1,5	5,5 ± 2,5	100
4,2 Gy	31,7 ± 5,3	63,3 ± 3,8	5,0 ± 1,5	100



الشكل (2) مخططات القياس الخلوي بالتدفق لتوزيع خلايا كبد الجرذون حسب محتواها من الـ DNA بعد  
 تعرض جرذون بعمر 90-100 يوم لنترونات المنبع  $Ba/Am$  لسريعة. 1 و 2 جرذون غير مشععة (شاهدة)،  
 3 و 4 جرذون مشععة بجرعة 2,1 غري، 5 و 6 جرذون مشععة بجرعة 4,2 غري.

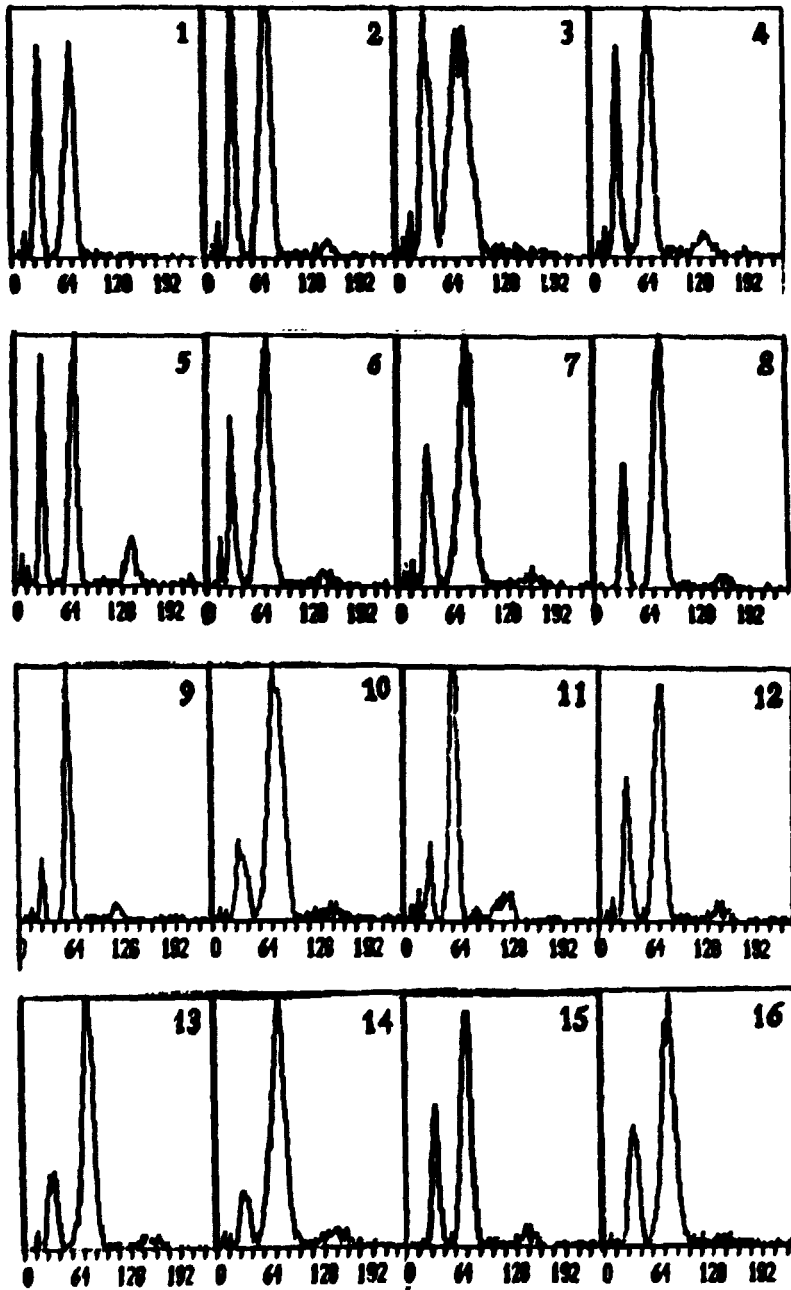
- محور السينات: المحتوى من الـ DNA.

- محور العيقات: عدد الخلايا.

نلاحظ في هذا الاختبار أن النيوترونات السريعة لهذا المنبع لم تؤد إلى حدوث اندماج بين خلايا كبد الجرذ ويمكن تطويل ذلك بأن عدد النيوترونات غير كاف لحدوث الاندماج. من جهة أخرى إن الحيوانات المستخدمة متقدمة بالعمر نسبياً ( 100 يوم ) وبالتالي فإن تحقيق الاندماج في كبدها صعب. حيث نلت دراستنا السابقة على نسبة اندماج قليلة لا تتجاوز 5% عند تشعيع جردان بهذا العمر ( Gilliano et al., 1990 ). ومن الجدير بالذكر أن كبد الجرذان يحوي خلايا مختلفة الصيغة الصبغية ( 8n, 4n, 2n ) وتزداد نسبة الخلايا متعددة الصيغة الصبغية ( 8n, 4n ) مع تقدم الجردان بالعمر ( Brodskij and Uryvaeva, 1981 ).

#### ب - تشعيع الجرذان بجرعة مجزأة بواسطة المقاعل VVR - M :

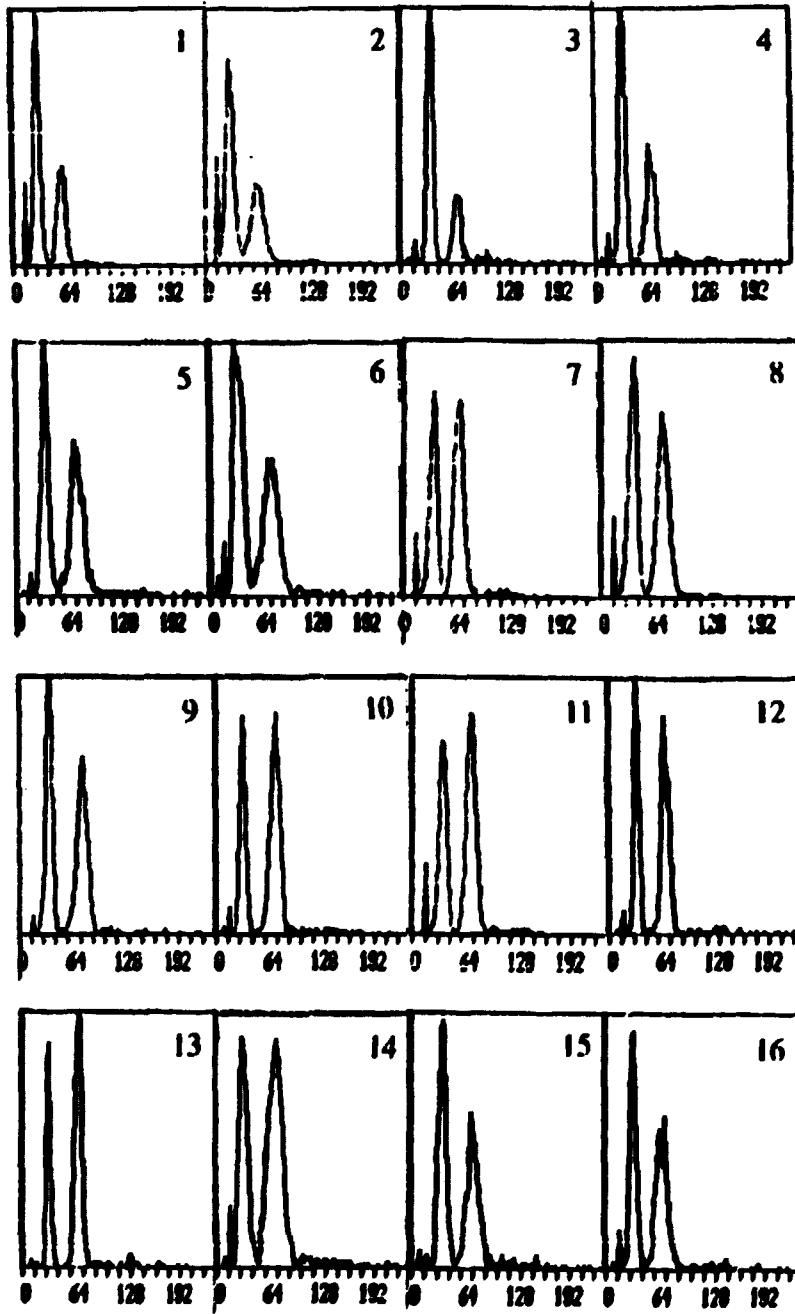
لستخدما مجموعتين من الجرذان بعمرين مختلفين . المجموعة لأولى بعمر 90-100 يوم والمجموعة الثانية بعمر 35-40 يوم. تم تشعيع بنيوترونات الانشطار بطاقة وسطى ( 0.85 MeV ) ، لستخدما لجرعات لثانية في كلا الاختبارين : 0.5 غري ، 1 غري ، 0.5 + 0.5 غري بفارق زمني ثلاث أيام بين الجرعة الأولى والثانية من أجل اعطاء زمن كاف لكي تستقر الخلايا المنتمجة بعد التشعيع الأول وبالتالي تحديد أثر التشعيع الثاني بشكل مستقل . في كلا الاختبارين أخذنا أربعة جردان لكل نقطة دراسة. نتائج هذه التجارب مبينة في الجدول 3 و 4 والأشكال 3 و 4 . نلاحظ من الأرقام زيادة في نسب الخلايا متعددة الصيغة الصبغية ( 8n , 4n ) في الحيوانات المشععة بالمقارنة مع الحيوانات الشاهدة وهذه لزيادة واضحة بشكل كبير عند الحيوانات الفتية . كما أن الجرعة واحد غري أدت إلى اندماج خلوي بنسبة تسوي نسبة الاندماج المحقق لدى تجزئة الجرعة إلى نصفين. وعليه فإن ظاهرة الاندماج ترتبط بمقدار الجرعة أي بعدد النيوترونات التي تخترق الكبد ولكن إلى حد معين لا تؤدي بعده زيادة الجرعة إلى لزيد نسبة الاندماج. كما أن الاندماج يتناسب مع عدد الخلايا القابلة للاندماج في الكبد والتي تتناقص مع العمر ( الشكل 5 ) .



الشكل (3): مخططات للقياس الطوري بالتفلق لتوزيع خلايا كبد الجرذان بعصر 90-100 يوم حسب محتواها من  $\lambda$  DNA بعد تعريضها لتفرونات الانشطار بجرعة مستمرة وجرعة مجزأة.  
 1 - 4 جرذان غير مشععة (شاهدة)، 5 - 8 جرذان مشععة بجرعة 0,5 غري، 9 - 12 جرذان مشععة بجرعة مجزئة 0,5+0,5 غري، 13 - 16 جرذان مشععة بجرعة 1 غري.

- محور السينات: للمحتوى من  $\lambda$  DNA.

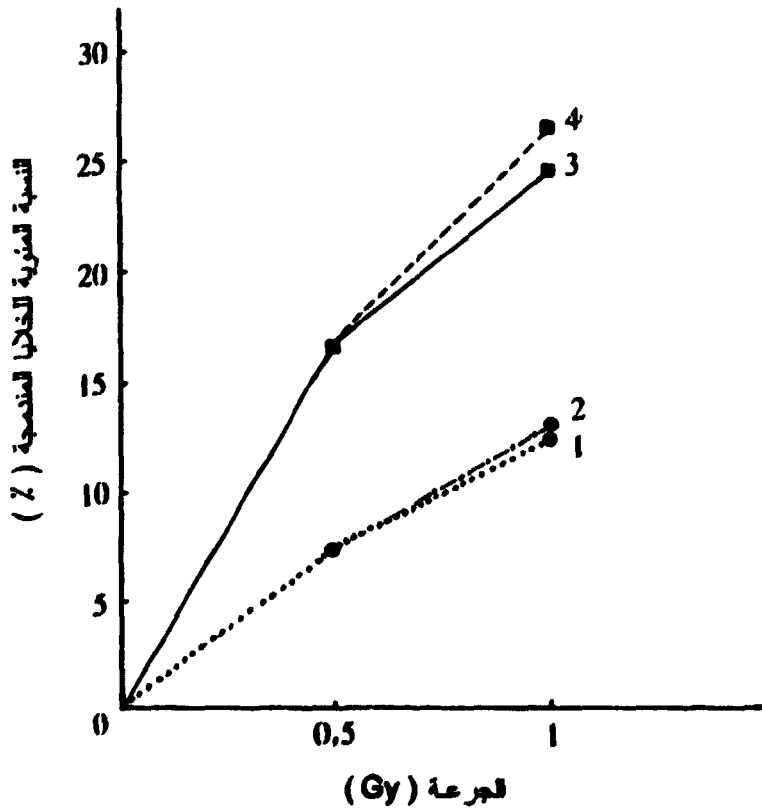
- محور المعينات: عدد الخلايا.



الشكل (4): مخططات القياس الخلوي بالتدفق لتوزيع خلايا كبد الجرذان بعمر 35 - 40 يوم حسب محتواها من DNA بعد تعريضها لتتروونات الانشطار بجرعة مستمرة وجرعة مجزأة.  
 1 - 4 جرذان غير مشععة (شاهدة)، 5 - 8 جرذان مشععة بجرعة 0,5 غري، 9 - 12 جرذان مشععة بجرعة مجزأة 0,5+0,5 غري، 13 - 16 جرذان مشععة بجرعة 1 غري.

- محور السينات: المحتوى من DNA.

- محور العنات: عدد الخلايا.



الشكل ( 5 ) : المنحنيات البيانية لعلاقة الجرعة بنسبة الخلايا المتضررة في كبد جرذان بعمر (90-100) يوم و المعرضة لنترونات الاشطار بجرعة مستمرة ( 1 ) و بجرعة مجزأة ( 2 ) ، وفي كبد جرذان بعمر 35-40 يوم و المعرضة لنترونات الاشطار بجرعة مستمرة ( 3 ) و بجرعة مجزأة ( 4 ) .



جدول 3: النسب المئوية لتوزيع خلايا كبد الجرذان بعمر 90-100 يوم حسب محتواها من الـ DNA ، بعد تعرضها لترونات الانشطار بطاقة وسطى 0.85 MeV المدروسة بجهاز القياس الخلوي بالتفوق .

الجرعة	النسب المئوية لتوزيع الخلايا حسب محتواها من الـ DNA			
	2n	4n	8n	%
Control	29,2 ± 2,2	64,7 ± 1,1	6,1 ± 1,2	100
0,5 Gy	25,2 ± 1,6	65,6 ± 2,5	9,2 ± 1,4	100
F Gy	20,8 ± 5,1	68,6 ± 3,6	10,6 ± 1,7	100
1 Gy	19,0 ± 1,9	72,7 ± 2,0	8,3 ± 0,7	100

جدول 4: النسب المئوية لتوزيع خلايا كبد الجرذان بعمر 35-40 يوم حسب محتواها من الـ DNA ، بعد تعرضها لترونات الانشطار بطاقة وسطى 0.85 MeV المدروسة بجهاز القياس الخلوي بالتفوق .

الجرعة	النسب المئوية لتوزيع الخلايا حسب محتواها من الـ DNA			
	2n	4n	8n	%
Control	66,4 ± 1,4	30,5 ± 1,6	3,1 ± 0,3	100
0,5 Gy	50,9 ± 1,5	45,0 ± 1,7	4,1 ± 0,7	100
F Gy	41,0 ± 3,4	54,8 ± 3,2	4,2 ± 0,6	100
1 Gy	43,3 ± 3,3	52,5 ± 3,2	4,2 ± 0,2	100

حيث  $F = 0.5 + 0.5 = 1$  ( الجرعة المجرأة ) .

ج - تشعيع الجرذان بالأشعة المؤينة ذات معدلات جرعة مختلفة :

درسنا في هذه الاختبارات دور معدل الجرعة الإشعاعية في إحداث الاندماج الخطوي في كبد الجرذان بعمر وسطي 60 يوم تقريبا . استخدمنا النيوترونات السريعة 14 MeV من مولد النيوترونات . حيث عرضت الحيوانات الى جرعة مقدارها 0.75 غري . أعطيت الجرعة بمعدلين مختلفين كالآتي :

- 0.75 غري خلال زمن قدره 9.4 دقيقة أي بمعدل 0.08 غري / دقيقة.

- 0.72 غري خلال زمن قدره خمس ساعات و 42 دقيقة أي بمعدل 0.0021 غري / دقيقة .

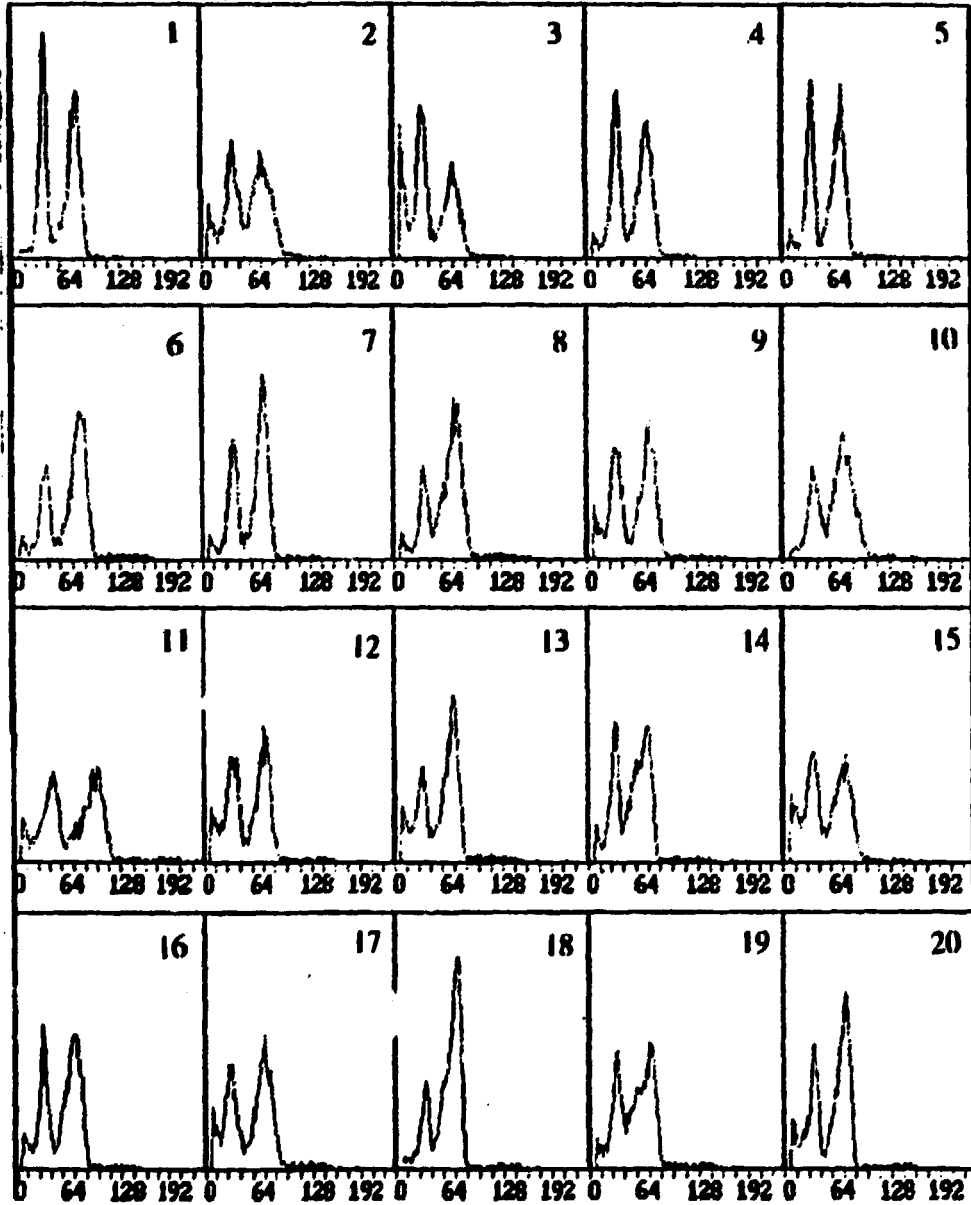
استخدمنا لكل نقطة دراسة ثمانية جرذان وكذلك ثمانية جرذان للشاهد . تشير النتائج الإحصائية الموجودة في الجدول 5 الى وجود اختلاف في النسب المنوية لكل صيغة صبغية بين الحيوانات الشاهدة والحيوانات المشععة والى عدم وجود فروق في النسب المنوية لكل صيغة صبغية بين الحيوانات المشععة بمعدل جرعة مرتفع ( 0.08 غري / دقيقة ) والمشععة بمعدل جرعة منخفض ( 0.0021 غري / دقيقة ) . ويتضح ذلك أيضا من المخططات البيانية للدراسة الخطوية بالتفاني في الشكل 6 .

جدول 5 : نسب المنوية لتوزع خلايا كبد الجرذان بعمر 60 يوم حسب محتواها من الـ DNA، بعد تعريضها للنيوترونات السريعة 14 MeV بمعدل جرعة مختلفين .

الجرعة	النسب المنوية لتوزع الخلايا حسب محتواها من الـ DNA			
	2n	4n	8n	%
Control	45,2 ± 2,9	53,6 ± 2,9	1,2 ± 0,2	100
0,75 Gy	32,4 ± 2,3	65,4 ± 2,2	2,2 ± 0,3	100
0,72 Gy	31,1 ± 2,0	66,1 ± 2,0	2,8 ± 0,2	100

لدراسة دور معدل الجرعة أيضا قمنا بتشعيع جرذان ( من نفس المجموعة السابقة ) بأشعة غاما من منبع

كربونات 60- بمعدل جرعة 186 غري / دقيقة. استخدمنا جرعتين الأولى 186 غري والثانية 454 غري. تبين



شكل (6): مخططات القياس الخلوي بالتعلق لتوزيع خلايا كبد الجرذان حسب محتواها من الـ DNA بعد

تعرض الجرذان لجرعة 0,75 غري من النيوترونات السريعة 14 MeV بمغلي جرعة مختلفين.

1 - 5 جرذان غير مشععة (شامدة)، 6 - 12 جرذان مشععة بمعدل جرعة 0,08 غري/ دقيقة،

13 - 20 جرذان مشععة بمعدل جرعة 0,0021 غري / دقيقة.

- محور السينات: المحتوى من الـ DNA.

- محور المعينات: عدد الخلايا.

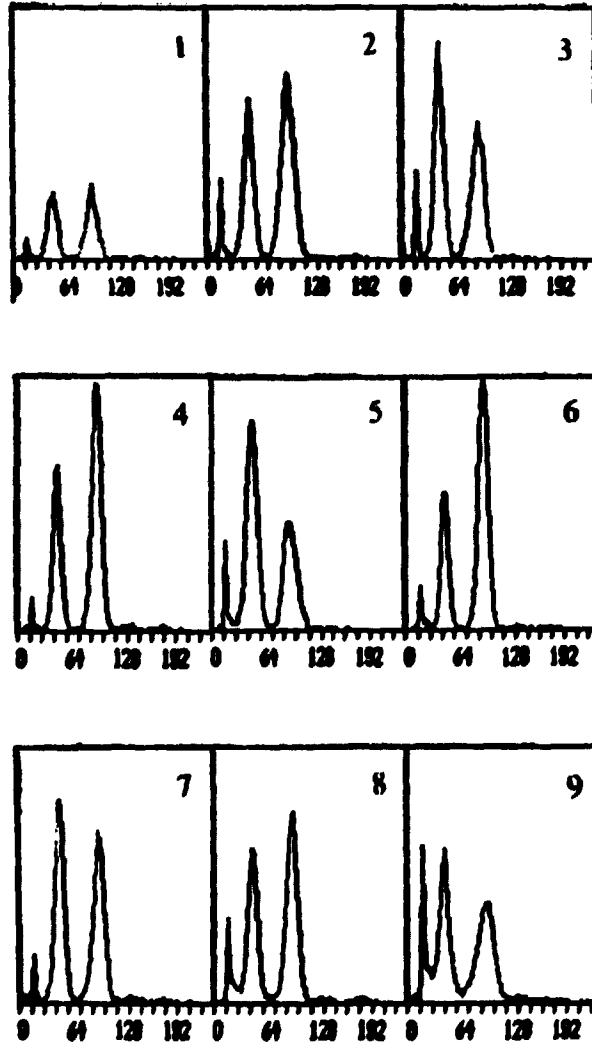
النتائج الاحصائية لهذه الدراسة ( جدول 6 ) عدم وجود فروق في النسب المئوية لكل صبغية بين خلايا الكبد الشاهد والمشمع بكلا الجرعتين . كما يتضح ذلك أيضا من المخططات البيانية للدراسة الخلوية بالتفوق في الشكل 7 مما يدل على عدم وجود اندماج خلوي بتأثير هذه الجرعت من أشعة غاما .

جدول 6: النسب المئوية لتوزيع خلايا كبد الجرذان بعمر 60 يوم حسب محتواها من الـ DNA بعد تعريضها لأشعة غاما .

الجرعة	النسب المئوية لتوزيع الخلايا حسب محتواها من الـ DNA			
	2n	4n	8n	%
Control	44,4 ± 4,1	53,0 ± 4,0	2,6 ± 0,7	100
186 Gy	41,3 ± 9,1	56,5 ± 8,6	2,2 ± 0,6	100
454 Gy	45,4 ± 3,0	51,1 ± 3,1	3,5 ± 0,08	100

أجري هذا الاختبار لمقارنة نتائج التشعيع بمعدل الجرعة المرتفع هذا مع دراستنا السابقة ( Gilliano et al., 1988 ) حيث كان معدل الجرعة 48 غري/ دقيقة والتي بينت عدم وجود اندماج بجرعات تصل إلى 500 غري. ولم يتضح الاندماج الا عند جرعات تفوق 700 غري ( الجرعة 720 غري حققت نسبة اندماج حوالي 20% ، 1200 غري حققت 45% ) .

لم يتمكن من دراسة دور معدل جرعة نترونات الانشطار نتيجة لتصميم المفاعل ووجود لقناة البيولوجية بشكل عمودي على قلب المفاعل والتي لا تسمح بتغيير معدل الجرعة. تكل هذه الاختبارات بشكل واضح على عدم أهمية معدل الجرعة في حدوث اندماج خلايا كبد الجرذ. وإن حدوث الاندماج يتعلق بنوع الاشعاع وبطاقة الجسم المشعون الذي يمر عبر الخلايا. فكل جسم يحمل طاقة كافية لتتغيب غشائين خلويين متجاورين في نقطة تماسهما يستطيع حدوث الاندماج بين هاتين الخليتين المتجاورين وهذا يشابه تماما الاندماج الكهربائي ( Zimmermann, 1983 ) .



الشكل (7): مضططات القياس الخلوي بالتتابع لتوزع خلايا كبد الجرذ من حسب محتواها من لـ DNA بعد تعرض الجرذ لأشعة غاما بمعدل جرعة 186 غري/ دقيقة.  
 1-3 جرذ غير مشععة (شامدة)، 4-6 جرذ مشععة بجرعة 186 غري، 7-9 جرذ مشععة بجرعة 454 غري.

- محور السينات: المحتوى من لـ DNA.

- محور العنات: عدد لخلايا.

د - تشعب خلايا **Hela** و **V-79** المستنبطة في لزجاج بواسطة المفاعل **VVR-M** :

تم تشعب خلايا **Hela** المستنبطة في لوساط زرع حلوية على الملوثة المظورة من أجل متابعة ظاهرة الاندماج الخلوي فيها عن طريق ملاحظة الملون القوي **HO 33342** والملون السيترولاسمي **R 123** في الخلايا المندمجة معا . حيث استخدمنا مطقن خلويين ملونين كالآتي :

مطق ملون بالملون **HO 33342** ، مطق ليه خلايا ملونة بالملون **HO** وخلايا ملونة بالملون **R 123** .

شعب المطقن في أنابيب اختبار معقمة بجرعة **0.5** غري من نترونات الانشطار بطاقة وسطى **0.85** .

بعد التشعب مباشرة ( **15** دقيقة ) قمنا بزرع نصف كل مطق من المطقات الخلوية لثلاث في زجاجات زرع حلوية على سواقر زجاجية لمدة **72** ساعة ، أما النصف الأخر من كل مطق قمنا بدراسته مباشرة تحت المجهر المظور لمتابعة الخلايا الملونة بكل ملون على حدة وبالملونين معا ، حيث أحصينا عدد الخلايا ثابتة القوي والخلايا أحادية القوي في كل مطق . وحصلنا على النتائج التالية :

المطق الملون بالملون **HO** : أحصيت **700** خلية وكانت النسبة المئوية لثابتات القوي (  $1.3 \pm 27.9$  ) مقابل (  $1.3 \pm 72.1$  ) أحاديات قوي .

المطق الملون بالملون **HO + R** : أحصيت **400** خلية وكانت النسبة المئوية لثابتات القوي الملونة بملونين (  $20.3 \pm 0.3$  ) مقابل (  $0.3 \pm 79.7$  ) أحاديات قوي . علما بأن ثابتات القوي في المطقات الشاهدة (غير المشععة ) شكلت نسبة بحدود **6%** .

درمنا بعد **72** ساعة لمطقات الخلوية المشععة التي زرعت في شروط زرع نظامية وتبين أن الخلايا المشععة قد انقسمت وشكلت طبقة أحادية على السواقر الزجاجية ولكن لا يمكن بالطرق المجهرية تحديد أي منها هي الخلايا التي اندمجت بالاشعاع . ولكن لقد هذا الأختبار بتحديد مقدرة الخلايا بعد التشعب بالنترونات على الانقسام وتشكيل مستنبات خلوية .

قمنا أيضا بدراسة تأثير جرعة **0.5** غري من نترونات الانشطار على مستنبات خلايا **Hela** وخلايا **V-79** شععت الخلايا وهي في حالة استقرار مؤقت (  $G_1$  ) وذلك عن طريق وضعها في وسط مغذ كاف للحياة وغير كاف في شروطه للانقسام الخلوي . قمنا بدراسة المطقات بعد حضنها في الوسط ذاته بدرجة  $37^{\circ}$  مئوية لمدة ساعتين بعد التشعب ، وذلك نتيجة لبحوثنا السابقة على خلايا كبد الجرذ والتي تكل على أن أعلى مستوى من ثابتات القوي يظهر بعد ساعتين من التشعب ( *Gillano, et al., 1988* ) . تبين من الدراسة المجهرية واعتمادا على ملون **EB** ، عدم وجود فروق محسوسة بين الشاهد والمشع في عدد ثابتات القوي . فكل ما يبدو أن الزمن

الأفضل لتسجيل ثلاث لنوى لهذه الأنواع من الخلايا كل من ساعتين ، حيث سجلنا نسبة مئوية لابس بها عند دراسة المحضرات بعد 15 دقيقة من التشعيع . ونتيجة لذلك كان لابد من متابعة ظاهرة الانماج عند هذه الخلايا مع الزمن .

وطيه لنا باختبار آخر لدراسة تبدل نسبة الخلايا ثلاث لنوى بعد التشعيع مع الزمن . حيث شمعنا ثلاث مستحبات لخلايا **Hela** وثلاث مستحبات لخلايا **V-79** بجرعة واحد غري من ترونات الانشطار . كانت خلايا كلا النمطين أثناء التشعيع في حالة استقرار مؤقت ( $G_1$ ) . درست للخلايا في فترات 6,3,1 ساعة بواسطة المجهر المطور بعد تلويدها بملون ليناديوم بروميد EB، وقد تبين أن النسبة المئوية للخلايا ثلاث لنوى في المطقات المشععة المختلفة أعلى بمرتين على الأقل من الشاهد وتتخلص نسبتها مع الزمن بعد التشعيع عند خلايا **Hela** حتى تصل تقريبا إلى الحد الذي وجدناه في الشاهد بينما لم نلاحظ ذلك في خلايا **V-79** كما في الجدول 7.

جدول 7 : لنسب المئوية للخلايا أحاديات وثلاثيات لنوى في فترات زمنية مختلفة بعد التشعيع.

الزمن بعد التشعيع	النسب المئوية لتوزيع الخلايا حسب عدد لنوى فيها			
	<b>Hela</b>		<b>V-79</b>	
	ثلاثيات لنوى	أحاديات لنوى	ثلاثيات لنوى	أحاديات لنوى
<b>Control</b>	$6,8 \pm 1,3$	$93,2 \pm 1,3$	$4,4 \pm 0,4$	$95,6 \pm 0,4$
<b>1 hr</b>	$17,0 \pm 1,5$	$83,0 \pm 1,5$	$11,3 \pm 1,7$	$88,7 \pm 1,7$
<b>3 hr</b>	$13,8 \pm 0,8$	$86,2 \pm 0,8$	$8,2 \pm 1,0$	$91,8 \pm 1,0$
<b>6 hr</b>	$8,8 \pm 1,1$	$91,2 \pm 1,1$	$9,2 \pm 0,5$	$90,8 \pm 0,5$

إن هذه المجموعة من الاختبارات تبين وجود انماج خلوي واضح بين خلايا **Hela** وبشكل أقل وضوحا بين خلايا **V-79**. وقد يعود الفرق في شدة الانماج بين الأنواع الخلوية المختلفة إلى اختلافات فيزيولوجية في طبيعة الأغشية الخلوية وكذلك إلى درجة التماس المحقة بين الخلايا وبحاج هذا إلى دراسة أوسع.

ويمكن ملاحظة هذا الاندماج بشكل جيد عن طريق ثنائيات النوى وذلك بعد فترة من التشعيع لانتجولوز ساعة واحدة حيث ينخفض عدد ثنائيات النوى بعد ذلك الى الحد الموجود في الخلايا الشاهدة . ويحل ذلك بالاندماج للنوى اللاحق بعد ان اندمجت السيتوبلازما.

#### د- تشعيع لمفاويات الدم المحيطي للجرذ والانسان :

بعد عزل للمفاويات من الدم لكامل بالطريقة المذكورة آنفا وضعت في انابيب تتحمل معمة حلوية على وسط مغذ كاث للحفاظ عليها حية . شععت للمفاويات ثم درست بعد تلويها بالمجهر المظور وبجهاز القياس الخلوي بالتلق .

تم تشعيع لمفاويات دم للجرذ بجرعة 0.5 و 1 غري من نترونات الانشطار بطاقة وسطى 0.85 MeV .  
كرر الاختبار مرتين ودرست الخلايا المشععة والشاهدة بعد ساعتين من التشعيع بطريقة القياس الخلوي بالتلق باستخدام ملون DAPI . نلت النتائج على نسبة اندماج خلوي قليلة ليست ذات دلالة معنوية nonsignificat (جدول 8) .

جدول 8 : النسب المئوية لتوزيع لمفاويات الجرذ حسب محتواها من الـ DNA بعد تشعيعها بنترونات الانشطار.

الجرعة	النسب المئوية لتوزيع لمفاويات الجرذ حسب محتواها من الـ DNA		
	2n	4n	%
Control	96,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2	100
0,5 Gy	95,8 ± 0,4	4,2 ± 0,4	100
1 Gy	93,1 ± 0,6	6,9 ± 0,6	100

في اختبار آخر تم تشعيع لمفاويات الجرذ وبنفس الشروط السابقة بجرعة واحد غري من النترونات لجرعة 14 ميغا إلكترون فولت . درست الخلايا بعد نصف ساعة من التشعيع بالمجهر المظور بعد تلويها بملون E.B. كانت النتيجة وجود عدد قليل من الخلايا ثنائية النوى حيث تتراوح نسبتها 2 - 3 % .



لما نتج تشعب للمفلوبات البشرية بجرعة 0.5 و 1 غري من النيوترونات السريعة 14 MeV، فكانت وجود نسبة غير كبيرة من الخلايا رباعية الصيغة الصبغية (4n) بالمقارنة مع الشاهد. بين الجدول 9 لنسب المتوية لكل صيغة صبغية في المفلوبات قبل وبعد التشعب والمدرسة بطريقة القياس الطوي بالتحقق بعد تلويها بملون DAPI.

جدول 9 : نسب المتوية لتوزع المفلوبات البشرية حسب محتواها من الـ DNA بعد تشعبها بالنيوترونات السريعة 14 MeV.

الجرعة	نسب المتوية لتوزع المفلوبات البشرية حسب محتواها من الـ DNA		
	2n	4n	%
Control	97,8 ± 0,6	2,2 ± 0,6	100
0,5 Gy	92,5 ± 0,05	7,5 ± 0,05	100
1 Gy	83,3 ± 0,2	6,7 ± 0,2	100

نلاحظ من الجدول أن المفلوبات عند الجرذ والاسنان تدمج وتشكل خلايا رباعية الصيغة الصبغية ولكن بنسبة متوية لا تتجاوز 7% وتماثل نسبة الانماج عند خلايا V-79 وهذا على ملودر متعلق بطبيعة الخلايا. و- دراسة تركيب الـ DNA في خلايا كبد الجرذ بعد الانماج الطوي المعرض بنيوترونات الانشطار : كما سبق ذكره فإن خلايا كبد الجرذ تكون ذات صيغ صبغية مختلفة. فهي تعوي على ثلاث ألساط من الخلايا ثنائية ورباعية وثلاثية الصيغة الصبغية. وتزداد نسبة الخلايا الرباعية بعد الولادة ومع تقدم العمر إلى حدود تصبح عندها شبه ثلثة وذلك في عمر يقارب أربعة أشهر ( Brodskij and Uryvaeva, 1981 ) ( Gilliano and Malinovsky, 1984a ). وتكرر الدراسات أن ظهور الخلايا متعددة الصيغة الصبغية في الكبد الطبيعي والسليم للجرذ يكون بطورك ألبت مختلفة منها الأنسام الخطي غير القام حيث تتولف الخلايا في طور - G<sub>2</sub> من الدورة الخلوية وتخرج إلى طور - G<sub>0</sub> مشكلة خلايا متعددة الصيغة الصبغية أو أن تكحل في طور - G<sub>1</sub> دون المرور في طور - M<sub>1</sub> من الدورة الخلوية وبالتالي تكحل دورة خلوية جديدة وقد تشكل خلايا

متعددة الصيغة الصبغية لدرجة كبيرة ( Lord, 1966; Khair, 1969 ). ويكون ذلك نتيجة الأضرار في جزيئات الـ DNA وتشكل روابط DNA - DNA أو DNA - RNA أو DNA - Protien ( Nakanishi and Fujita, 1977; Gilliano et al., 1967 ). الألية لثابتة هي حدوث انقسام لاجركي ( Uryvaeva et al., 1960; Nadal and Zajdela, 1966 ) وينتج خلايا ثلثة لنوى ( Amitosis ) ( Brunk, 1979; Wheatley, 1972 ). ولا بين ( Uryvaeva and Lange, 1971 ) أن تراكم الخلايا ثلثة لنوى له علاقة بالانقسام ولا يلعب الانقسام للاخطي ولا لانماج الخلايا دورا محسوسا في ظاهرة تعدد الصيغة الصبغية لخلايا الكبد خلال تطور الكائن الطبيعي ( Ontogenes ).

تحدث في عملية تجدد الكبد بعد قطع الجزئي زيادة في الصيغة الصبغية للخلايا والمقدرة بالطرائق المعتمدة على دراسة النمط النووي karyotype وعلى طريقة القياس الخلوي cytometry ( James et al., 1966; Sidorova et al., 1966 ). يمكن بمقارنة دليل الوسم مع الدليل الانسالمي تحديد دليل تعدد الصيغة الصبغية في عملية تجدد الكبد وهذا الدليل دائما أقل من 2 وأكثر من 1 ، وهكذا:

- لا تقسم جميع الخلايا التي تضاعف محتواها من الـ DNA في الميتوز والا كان في هذه الحالة دليل تعدد الصيغة الصبغية يساوي 1.

- لا تتحول جميع الخلايا التي تضاعف محتواها من الـ DNA إلى خلايا متعددة الصيغة الصبغية والا كان في هذه الحالة دليل تعدد الصيغة الصبغية يساوي 2.

- لم من الخلايا التي تضاعف محتواها من الـ DNA يصبح خلايا متعددة الصيغة الصبغية والقسم الآخر ينقسم. وبهذا الشكل فإن تعدد الصيغة الصبغية في خلايا كبد الجرذ هو نتيجة لتعاقب الانقسام الخطي والانقسام للاجركي ( Acytokinetic mitosis ) ( لمزيد من التفاصيل حول ظاهرة تعدد الصيغة الصبغية لرجع إلى Khair, 1969 ).

لدراسة متغرة خلايا كبد الجرذ على تركيب الـ DNA وبالتالي مكررتها على الانقسام بعد تشبع الجرذون بالنترونات وحدث الانماج بين جزء من خلايا الكبد، فمنا بتعرض جرذون بجرعة واحد غري من نترونات الانشطار بطاقة وسطى 0.85 MeV . تم بعد أربع ساعات من التعرض للنترونات اجراء عملية لقطع الجزئي للكبد من أجل تحفيز الخلايا على الانقسام. تم لقطع في الحوانات الشاهدة والمشعة في نفس الوقت . أعطيت

فترة أربع ساعات بعد التعرض لكي تنتهي عملية الانماج الخلوي المحرض بالإشعاع وتعود الخلايا إلى طبيعتها ( Giliano et al., 1988 ).

ترك الحوانات بعد هذا القطع الجزئي لفترات زمنية مختلفة 17 ، 18 ، 19 ، 20 ، 21 ، 22 ، 23 ، 24 ، 25 ، 26 ، 27 ، 28 ساعة وهي فترة تركيب الـ DNA قبل ساعة من قتل الحوانات في الفترات الزمنية المذكورة كما يحقها بالتمديد -34. بعد ساعة من الحن قتل حوانات المجموعة وحضر من الكبد المطلق الخلوي . صنعت من المقلات الخلوية محضرات مجهرية على شكل لطاخات وطبقت عليها طريقة التصوير الإشعاعي الذاتي. وقد استخدمنا طريقة النوى الموسومة لأنه لا يمكن تقدير الشدة الانقسامية لخلايا الكبد المحرصة بالقطع الجزئي بصورة جيدة في الدارة الخلوية الأولى عن طريق الدليل الانقسامي. فجزء من الخلايا الكبدية التي تركيب الـ DNA لا تنقسم وتتوقف في المرحلة  $G_2$  من الدارة الخلوية وتشكل خلايا وظيفية متعددة الصيغة الصبغية وقد ينقسم جزء منها في الدارة الخلوية الثانية وأن قسم آخر من الخلايا التي كانت وظيفة تبدأ دورتها الخلوية بعد عودة الخلايا التي كانت تركيب DNA إلى وظيفتها وهذا القلوب من أجل الحفاظ على استمرار وظيفة الكبد ( Giliano and Malinovsky, 1984a ). كما أن قسم من الخلايا يدخل الدارة الخلوية مرتين بعد قطع الجزئي ( Giliano and Malinovsky, 1984b ) وفي هذه الحالة لابد من دراسة الدليل الورسي والدليل الانقسامي خلال فترة زمنية لا تقل عن 72 ساعة بعد قطع الجزئي لكي تصل الخلايا إلى مرحلة عدم الانقسام وبالتالي معرفة نسبة الخلايا المتجددة بشكل دقيق نتيجة لقطع الجزئي. فقد بينت ( Giliano, 1977 ) أن هناك دورتين تضاميتين بعد قطع الجزئي يتوقف بعدها الكبد عن الانقسام. لذلك كان تحديد مقدرة الخلايا على الانقسام عن طريق النوى الموسومة في المرحلة S- من الدارة الخلوية الأولى هو الأصح لكي لا يحدث تدخل وخطأ كبير في تقدير النسبة المئوية للخلايا المنقسمة. تبين نتيجة الدراسة المجهرية للمحضرات أن نسبة الخلايا الموسومة عند الحوانات الشاهدة وعند الحوانات المشععة بواحد عري من النيوترونات متقاربة جدا مما يشير إلى أن خلايا الكبد في الحوانات المشععة قادرة على دخول الدارة الخلوية وتركيب DNA بنفس المقدرة التي تمتلكها الحوانات الشاهدة غير المشععة . وبالتالي فإن مقدرة الخلايا على الانقسام لم تتأثر بظاهرة الانماج الخلوي المحرض بالأشعة المؤينة التي عانت منها خلايا الكبد ( جدول 10 ) .

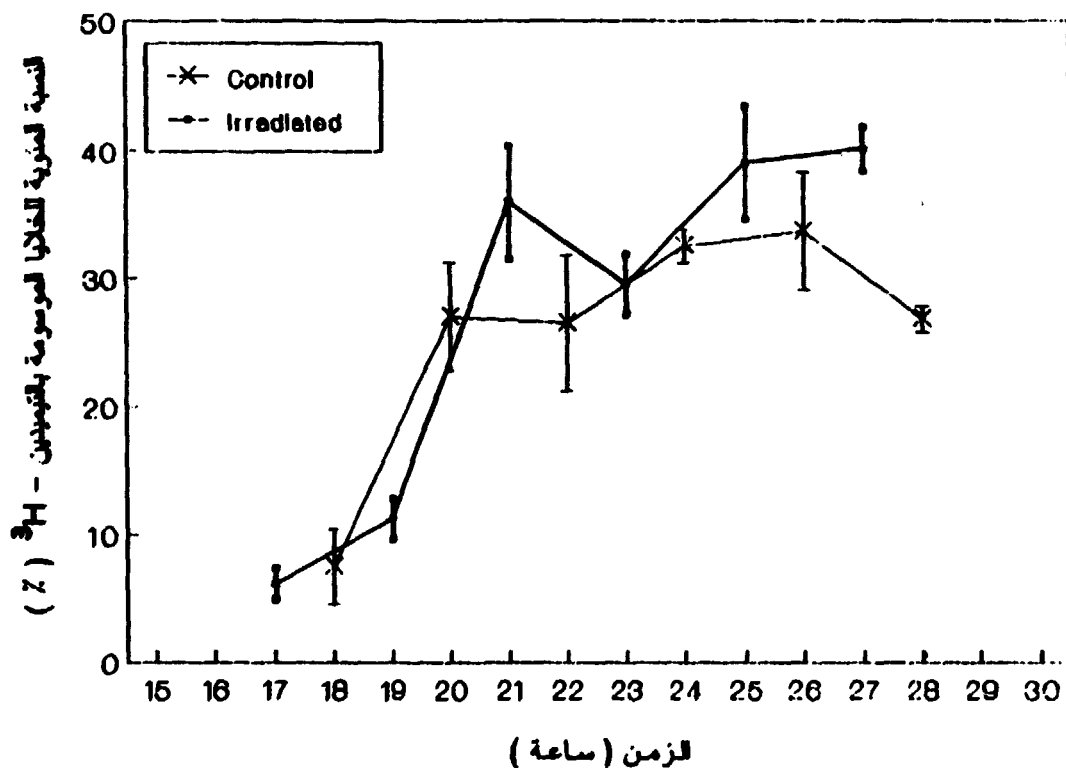
جدول 10 : نسب المنوية للخلايا الموسومة بالتمديدين 344 في كبد الجرذان المشععة بولاد غري من نترات الانشطار وغير المشععة.

الزمن	النسب المنوية للخلايا الموسومة بالتمديدين 344	
	عدد الحيوانات الشاهدة	عدد الحيوانات المشععة
17 hr	--	6,1 ± 1,2
18 hr	7,5 ± 2,9	--
19 hr	--	11,2 ± 1,6
20 hr	27,0 ± 4,2	--
21 hr	--	35,9 ± 4,4
22 hr	26,5 ± 5,3	--
23 hr	--	29,5 ± 2,3
24 hr	32,5 ± 1,3	--
25 hr	--	39,0 ± 4,4
26 hr	33,7 ± 4,8	--
27 hr	--	40,1 ± 1,7
28 hr	26,8 ± 1,0	--

لدى تمثيل بيانات الجدول 10 في منحنيات بيانية لملائمة النسبة المنوية للخلايا الموسومة مع الزمن . نلاحظ من الشكل 8 وجود تطابق جزئي للمنحنين البيانيين مع زيادة طفيفة في قمة المنحنى العائد للحيوانات المشععة بالمقارنة مع الشاهد . لكن هذين المنحنين يتداخلان في مجال الأخطاء الصافية للقيم المسجلة .

#### 5- الاستنتاجات:

1- ان نتائج هذا البحث تشير بوضوح الى ان حادثة الانماج الخلوي المعرض بالأشعة المؤينة هي ظاهرة بيولوجية مشتركة بين أكثر الأنماط الخلوية وتختلف شدة الانماج حسب نوع الخلايا المشععة والفترة الكامنة في كل نوع منها.



الشكل ( 8 ) : المنحنيات البيانية لعلاقة النسبة المئوية للخلايا الموسومة بالثيميدين -  $^3\text{H}$  مع الزمن.

1 - عند الجرذان غير المشععة (شاهدة).

2 - عند الجرذان المشععة بجرعة 1 غري من نوترونات الانشطار قبل التحريض على دخول الدارة الخلوية والرابع ساعات.

- 2- تؤكد النتائج على أهمية نوع الأشعة المستخدمة والمرتبطة بنقل الطاقة للخلي فكما كان نقل الطاقة الخلي لكر كلما كانت الأشعة أكثر مقدرة على إحداث الاندماج.
- 3- كذلك بينت النتائج عدم وجود دور لمعدل الجرعة المستخدم في التشعيع.
- 4- لا بد من التأكيد على دور زمن تسجيل الاندماج بعد التشعيع، فقد لاحظنا لاختلاف سرعة الاندماج من نمط خلوي لآخر. ففي حالة الخلايا الكبدية قومة أعظمية للخلايا ثنائية القوى بعد ساعتين من التشعيع ( Gilliano et al., 1988 ) بينما نلاحظ في البحث الحالي أن القومة الأعظمية لثلاثيات القوى في خلايا HeLa بعد 15 دقيقة من التشعيع وتتخلص بعد ساعة بشكل ملحوظ ( لم تتمكن من دراسة ثلاثيات القوى بعد التشعيع بأل من 15 دقيقة لأنه لايسمح بأخذ العينة قبل ذلك الوقت ). وهذا يمكن مقلارنته مع نتائج البحوث الأخرى حيث تحتاج عملية اندماج البروتوبلاست بواسطة أشعة الليزر حوالي 30 ثانية، بينما يحتاج دمج الخلايا للمغلوبة B مع خلايا الميولوما بالليزر حوالي 5 دقائق ( Wiegand, et al., 1987 ). كذلك يحتاج دمج البروتوبلاست بالأمواج الكهروستاتية زمن قدره دقيقتين ( Zimmermann and Kuppers, 1983 ).
- وعليه يكون الاندماج أعظما في حال اختيار الجرعة المناسبة من النيوترونات لكل نمط خلوي ووجود مواد تساعد على تماس الخلايا للمحكم .

## 5- التوصيات :

ان هذا البحث يفيد في مجالات عدة:

- 1-زيادة المعرفة عن رد الفعل الخلوي على الأشعة المؤينة، وعلاوة نقل الطاقة الخلي بالفعالية البيولوجية النسبية.
- 2- نتائج البحث تفتح المجال لدراسة آلية الاندماج وطبيعة الاصابة الأشعاعية على مستوى الأغشية الخلوية .
- 3- توليد نتائج البحث وتعميقها مستقبلا في تفسير دور الأشعة المؤينة في التطور البيولوجي الذي حدث على سطح الأرض.
- 4- يمكن أن تستخدم نتائج هذا البحث كمتواس بيولوجي لتقدير الجرعة الأشعاعية Biological Dosimetry .
- 5- يمكن الاستفادة من النتائج في تقويم نجاعة معالجة الأورام بالنيوترونات حيث يمكن أن تتشكل هجائن بين خلايا الخبيثة والسليمة في منطقة الورم نتيجة التشعيع .
- 6- يمكن استخدام الاندماج الخلوي بالأشعة المؤينة في مجال التفاتل الحيوية؛ علم المناعة ، علم العقاقير، الإنتاج النباتي ، التهجين وغير ذلك .

من المفيد جدا متابعة هذه الظاهرة وخاصة بوجود المواد المساعدة على تقارب الخلايا وتماسها مثل الديكستران و PEG . ويتوجب دراسة عملية تهجين أنماط مختلفة من الخلايا فيما بينها فادرة على الحياة والتكاثر . كما أن دراسة تبدل النفوذية الغشائية بعد التشعيع سيساعد على معرفة آلية الاندماج ، والتي يعتقد أنها تشابه التقريب بالتيار الكهربائي النبضي والضروري لعملية الاندماج في نقطة تماس خليتين متجاورتين . وأخيرا من الضروري لجراء دراسة حركية خلوية كاملة بعد قطع الجزئي للدليل الانقسامي ولدليل الوسم خلال عدة أيام بعد قطع الجزئي للوصول الى صورة واضحة عن سلوك الخلايا وعدد الانقسامات التي تقوم بها ونسبتها بتأثير التشعيع.

### كلمة شكر :

يسعدني أن أقدم بالشكر السيد الأستاذ الدكتور ابراهيم حنّان المدير العام لهيئة الطاقة الذرية السورية على التسهيلات التي قدمت لاجراء البحث . كما أقدم بجزيل الشكر للسادة العاملين في قسم البيوفيزياء الجزئية والأشعاعية وخاصة الدكتورة غزلينا ، الأستاذ الدكتور مانيولفسكي ، الأستاذ الدكتور نوسكين ، الفيزيقي بالتشيف ، والسيد نائب مدير معهد الفيزياء النووية في بطرسبورغ الأستاذ الدكتور نازارينكو على التسهيلات والمساعدات التقنية والطبية من أجل تجاوز البحث واخلائه . وأشكر السيد الدكتور ابراهيم عثمان على مساعدته في عمليات التشعيع الأولية، والأسمة لمل عمر على المساعدة في بعض الأعمال المتعلقة بالبحث ، وأشكر السادة الدكتور محمد عثمان ومحمد النعمة المشرفين على قسم البيولوجيا والصحة الإشعاعية على التسهيلات والتوجيهات المتعلقة بالبحث.

## References :

- 1- Brodskii V. Ya. and Uryvaeva I. V. ( 1981 ). In Russian : Kletochnaya poliploidiya . Proliferatsiya i differentsirovka . Izd . Nauka, Moscow, pp. 24-37.
- 2- Brunk C. F. ( 1979 ). Quantal division and postmitotic state in myoblast differentiation. *Differentiation*, 14: 95-99.
- 3- Crissman H. A. and Steinkamp J. A. ( 1990 ). Cytochemical techniques for multivariate analysis of DNA and other cellular constituents. In : *Flow Cytometry and Sorting* ( M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn, eds. ) . Wiley - Liss, Inc., New York, pp. 227-247 .
- 4- Famelear Y., Camaerts , D., et. al. (1987) . Cellular engineering by " Gamma-fusion " and " Egg Transformation " . IAEA - 282 / 44: 543-461 .
- 5- Gilliano N. Ya. ( 1977 ). In Russian: Generatsionnyj tsikl i radiatsionnye efekty regeneriruyushchej pecheni krys. Dissertatsiya, Leningrad.
- 6- Gilliano N. Ya., Khair M. B., Landa E. I., Malinovsky O. V. ( 1987 ). Polyploidy of rat hepatocytes induced by X- radiation at different cell cycle stages. ( In Russian). *Radiobiologiya*, 27, 3: 375-377.
- 7- Gilliano N. Ya. and Malinovsky O. V. ( 1976 ). In Russian: Sintez DNK i mitoticheskaya aktivnost v kletkakh regeneriruyushchej pecheni krys posle rentgenovskogo obлучeniya na Stadiyakh G<sub>0</sub> i G<sub>1</sub>. *Tsitologiya*, 18, 10 : 1284 - 1288 .
- 8- Gilliano N.Ya. and Malinovsky O.V. ( 1984 a. ) . The yield of genome mutations in cells of intact and regenerating rat liver in normal conditions and after y-irradiation. ( In Russian ) . *Radiobiologiya* , 24, 1: 35 - 38 .



- 9- Giliano N. Ya. and Malinovsky O. V. ( 1984 b. ). In Russian: Kinetika kletочноj proliferatsii v regeneriruyushchej pecheni krysa po dannym protočnoj tsitofotometrii. Tsitologiya i genetika, No. 4: 256 - 259.
- 10- Giliano 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. ( In Russian ). Radiobiologiya, 28, 1: 68 - 73.
- 11- Giliano N. Ya., Malinovsky O.V., and Khair M. B. ( 1989 ) . On the mechanisms of induction of the cells polyploidization . ( In Russian ). Biolog. J. Armenia, 42 : 852 - 858 .
- 12- Giliano N. Ya., Malinovsky O.V., and Khair M.B. ( 1990 ). Induction of hepatocyte polyploidization in rats of different age by ionizing radiation of different LET. ( In Russian ) . Radiobiologiya, 30 , 2: 194 - 198 .
- 13- Gleba U. U. , et. al. ( 1987 ). In Russian : Fertilnye yadernye mezhtribnye gibridy " Nicotiana + Atropa ", poluchennye sliyaniem normalnoj i inaktivirovannoj obluchenniem somati-cheskikh kletok . Doklady Akad. Nauk SSSR, 297, 6: 1473-1475.
- 14- Hunt S. V. ( 1990 ). In Russian: Vydelenie limfotsitov : vspomogatelnykh kletok. In: Limfotsity ( Mosco, Mir ), pp. 15-68. ( Translated form : Lymphocytes. A practical approach, G. G. B. Klaus, ed., IRL press, Oxford, Washington DC, 1987 ) .
- 15- Hurwitz C. and Tolmach L.J. ( 1969 ) . Time - lapse cinemicrographic studies of X - irradiated HeLa S3 cells. II . cell fusion. Biophys. J., 9: 1131 - 1143 .
- 16- James J., Schopman M., Delfgaauw P. ( 1966 ). The nuclear pattern of the parenchymal cells of the liver after partial hepatectomy. Exper. Cell Res., 42: 375-379.
- 17- Khair M.B. ( 1989 ) In Russian: Vychod genomnykh mutatsij, indutsirovannykh ioniziruyushchim izlucheniem s razlichnoj LET v gepatotsitakh krysa. Dissertatsiya, Leningrad .

- 18- Knutton S. ( 1979 ) . Studies of membrane fusion. III . fusion of erthrocytes with polyethylene glycol. *J. Cell Sci.* 36: 61 - 72 .
- 19- Kura S., Sasaki H., Aramaki R., and Yoshinaga H. ( 1978 ). Binucleate cell formation induced by X - irradiation . *Radiat. Res.*, 76: 83 - 94 .
- 20- Lord B. I. ( 1986 ). Controls on the cell cycle. *Int. J. Radiat. Biol.*, 14: 425-431 .
- 21- Loyter A., and Volsky D.J. ( 1982 ). Reconstituted Sendai virus envelopes as carriers for the introduction of biological material into animal cells . In: *Membrane reconstitution* ( G. Poste and G.L. Nicolson, eds. ) . Elsevier / North Holland Press, Amsterdam, pp. 215 - 266 .
- 22- Nadal C. and Zajadela F. ( 1966 ). Polyploidie somatique dans le foie de rat. I-Le role des cellules binucleées dans la genese des cellules polyploides. *Exper. Cell Res.*, 42: 99-116 .
- 23- Nakanishi K. and Fujita S. ( 1977 ). Molecular Mechanism of polyploidization and binucleate formation of the hepatocytes. *Cell Struc. Func.*, 2, 3: 261-265.
- 24- Sidorova V. F., Ryabinina Z. A., Lejkina E.M. (1966 ). In Russian: *Regeneratsiya pecheni u mlekopitayushchikh. Meditsina, Moscow.*
- 25- 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.* ( Hetroptera: Pyrrhocoridae ) . *Current Science*, 15, 23: 1121 - 1122 .
- 26- Terasima T. and Tolmach L.J. ( 1963 ). X - ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populatins of Hela cells . *Science*, 140: 490 - 492 .
- 27- Tolmach L. J. ( 1990 ) . Failla memorial lecture. Time, cells, and X - rays . *Temporal aspects of some responses of cultured cells to X - irradiation . Radiat. Res.*, 123: 119 - 137 .

- 28- Uryvaeva I. V., Arefeva A. M., Brodskij V. Ya. ( 1980 ). In Russian: Mekhanizmy poliplodizatsii serdechnykh miotsitov myshi. *Bul. Exper. Biol. med.*, 89, 2: 219 -222.
- 29- Waggoner A.S. (1990 ). Fluorescent probes for cytometry . In: *Flow Cytometry and Sorting* ( M.R. Melamed, T.Lindmo and M.L. Mendelsohn , eds. ) Wiley - Liss, Inc., New York , pp. 209 - 225 .
- 30- Wheatley D. N. ( 1972 ). Binucleation in mamalian liver: Studies on the control of cytokinesis in vivo. *Exper. Cell Res.*, 74: 455-465.
- 31- Wiegand R., Weber G., et. al. ( 1987 ) . Laser - induced fusion of mammalian cells and plant protoplasts. *J. cell Science*, 88: 145 - 149 .
- 32- Wilschut J. ( 1991 ). Membrane fusion in lipid vesicle systems. In: *Membrane Fusion* ( J. Wilschut and D.Hoekstra, eds. ) . Marcel dakker, inc ., New York , pp. 89 - 126 .
- 33- Wojcieszyn J. W., Schlegel R. A., Lumley - Sapanski k., and Jacobson K.A. ( 1983 ) . Studies on the mechanism of polyethylene glycolmediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J. cell Biol.* 96: 151 - 159 .
- 34- Zimmermann U. ( 1983 ). Electrofusion of cells : Principles and industrial potential. *Trends Biotechnol.* 1: 149 - 155 .
- 35- Zimmermann U. ( 1986 ). Electrical breakdown, electroporabilization and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 105: 175 - 256 .
- 36- Zimmermann U. and Koppers G. ( 1983 ) . Cell fusion by electromagnetic waves and its possible relevance for evolution . *Naturwissenschaften* , 70: 568 - 569 .