



SY0201046

**SYRIAN ARAB REPUBLIC
ATOMIC ENERGY COMMISSION (AECS)
DAMASCUS, P.O.BOX 6091**



**Report on Laboratory Reconnaissance Experiment
Department of Molecular Biology and Biotechnology**

**Effect of Gamma Rays on Electrically Evoked
Contractions of Non-Vascular Smooth Muscles
(Rat Vas Deferens)**

**Mr. Raed AZROONY
Miss. Fadia KSIES
Dr. Ghassan ALYA**

AECS - B IRRE 117

OCTOBER 2002

33 / 49



SY0201046



الجمهورية العربية السورية
هيئة الطاقة الذرية
دمشق - ص.ب. ٦٠٩١

تقرير عن تجربة استطلاعية مخبرية قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية

تأثير أشعة غاما على التقلصات العضلية المحرّضة كهربائياً للعضلات الملساء
غير الوعائية (القناة الناقلة للنطاف عند الجرذ)

السيد رائد أزروني
الآنسة فادية قصيص
الدكتور غسان عليا

تشرين الأول ٢٠٠٢

هـ ط ذ س - ب / ت ت | ١١٧

الجمهورية العربية السورية
هيئة الطاقة الذرية
قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية

تأثير أشعة غاما على التقلصات العضلية المحرّضة كهربائياً للعضلات الملساء
غير الوعائية (القناة الناقلّة للنطاف عند الجرذ)

السيد رائد أزروني
الآنسة فادية قصيص
الدكتور غسان عليا

تشرين الأول ٢٠٠٢

هد ط ذ س ج ب / ت ت ١١٧

حقوق النشر:

يسمح بالنسخ والنقل عن هذه المادة العلمية للاستخدام الشخصي بشرط الإشارة إلى المرجع، أما النسخ والنقل لأهداف تجارية فغير مسموح بهما إلا بموافقة خطية مسبقة من إدارة الهيئة.

فهرس المحتويات Appendix

3.....	فهرس الأشكال
4.....	الخلاصة
6.....	Abstract
8.....	المقدمة
11.....	المواد والتجهيزات
11.....	المواد
11.....	التجهيزات
12.....	الطرائق والقياسات
12.....	الطرائق
12.....	تحضير عينات الألياف العضلية
15.....	تحضير السائل الفزيولوجي المستخدم
15.....	تحضير المواد الفارماكولوجية المستخدمة
15.....	عمليات التشيع
16.....	القياسات (قياس شدة التقلص العضلي)
18.....	النتائج
18.....	الكالسيوم
22.....	الفينيل افرين
25.....	الاستيل كولين
29.....	المناقشة
33.....	كلمة شكر :-
34.....	المراجع

فهرس الأشكال

- الشكل (1): تنشيط قنوات الكالسيوم من النمطين (VOC – ROC) ودخول Ca^{2+} إلى الخلية العضلية 10
- الشكل (2): أجزاء الحوض التجريبي مع التجهيزات الملحقة 14
- الشكل (3): منحنى معايرة حساسات الراسمة 17
- الشكل (4): تقلصات الألياف العضلية الشاهدة والمشععة بتأثير التراكيز المتزايدة من الكالسيوم الخارجي $[Ca^{2+}]_o$ 20
- الشكل (5): تمثيل بياني لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة للشدة الأعظمية) بدلالة تغيرات تراكيز الكالسيوم الخارجي في الألياف الشاهدة والمشععة 21
- الشكل (6): تمثيل بياني لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة لشدة التقلص في المحلول العادي) بدلالة تغيرات تراكيز الكالسيوم الخارجي في الألياف الشاهدة والمشععة 21
- الشكل (7): تقلص الألياف العضلية الشاهدة والمشععة بتأثير التراكيز المتزايدة من الفينيل افرين 23
- الشكل (8): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة للشدة الأعظمية) بدلالة تغيرات تراكيز الفينيل افرين في الألياف الشاهدة والمشععة 24
- الشكل (9): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة لشدة التقلص في المحلول العادي) بدلالة تغيرات تراكيز الفينيل افرين في الألياف العضلية الشاهدة والمشععة 24
- الشكل (10): تقلص الألياف العضلية الشاهدة والمشععة بتأثير التراكيز المتزايدة من الاستيل كولين 26
- الشكل (11): تثبيط المستقبلات الكولينرجية من النمط المسكاريني M بوجود الأتروبين بتركيز 10^{-6} M/L 27
- الشكل (12): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة للشدة الأعظمية) بدلالة تغيرات تراكيز الاستيل كولين في الألياف الشاهدة والمشععة 28
- الشكل (13): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة لشدة التقلص في المحلول العادي) بدلالة تغيرات تراكيز الاستيل كولين في الألياف العضلية الشاهدة والمشععة 28

1- الخلاصة:

حاولنا في هذه التجربة أن ندرس التبدلات التي تطرأ على تقلص العضلات الملساء غير الوعائية non-vascular المسببة بواسطة أشعة غاما gamma rays. تم عزل الألياف العضلية الملساء من القناة الناقلة للنطاف vas deferens للجرذ البالغ. كم تم تحريض التقلصات العضلية كهربائياً باستخدام جهاز تنبيه كهربائي. أظهرت نتائجنا أن التشعيع يعمل على تنشيط القنوات الأيونية من النمط VOC المفعلة بالفولطية (Voltage Operated Channel) مما يؤدي إلى زيادة تدفق تيار الكالسيوم الداخل Ca^{2+} influx فيعمل بالتالي على رفع تركيز الكالسيوم الداخلي $[Ca^{2+}]_i$ مما يؤدي إلى زيادة شدة التقلصات العضلية.

وفيما يتعلق باستجابة الألياف العضلية الملساء المعزولة من القناة الناقلة للنطاف لتنشيط المستقبلات الغشائية، فقد حاولنا أيضاً إلقاء الضوء على أثر الأشعة المؤينة غاما على تنشيط المستقبلات الأدرينرجية Adrenergic receptors والمستقبلات الكولينرجية Cholinergic receptors وتحديد أثر جرعات مختلفة من الأشعة (1، 3، 5، 7 غري) على تنظيم الإستجابة التقلصية لهذه الألياف العضلية. وقد أظهرت نتائجنا أن:

- التشعيع يعمل على زيادة شدة التقلصات العضلية المحرصة بإضافة تراكيز متزايدة من الاستيل كولين والفينيل إفرين بشكل متناسب طردياً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة. حيث تزداد شدة التقلص الأعظمي طردياً مع زيادة الجرعة الإشعاعية ($E_{max} 1 Gy < E_{max} 3 Gy < E_{max} 5 Gy < E_{max} 7 Gy$).
- حدوث إنزياح هام لتأثير الاستيل كولين على زيادة شدة التقلص في الحيوانات المشعة بالجرعات (3، 5، 7 غري) حيث يحصل التأثير الأعظمي E_{max} بتراكيز أقل بعد التشعيع.

فالتشعيع يعمل على ما يبدو على تنشيط تدفق الكالسيوم الداخل Ca^{2+} inward flux عن طريق القنوات الأيونية من النمط ROC (Receptor Operated Channel) التي يرتبط عملها بتنشيط المستقبلات الغشائية.

بمقارنة هذه النتائج مع تأثير أشعة غاما على تنشيط المستقبلات الأدرينرجية والكولينرجية في العضلات الملساء الوعائية فقد استنتجنا أن:

- العضلات الملساء غير الوعائية (القناة الناقلة للنطاف vas deferens) أقل حساسية للتشعيع مقارنة مع العضلات الملساء الوعائية (الوريد البابي الكبدي venae portal hepatica).

- التثعيع يعمل على زيادة حساسية المستقبلات الكولينرجية تجاه التراكيز المتزايدة من الأستيل كولين في الألياف العضلية الملساء غير الوعائية (القناة الناقلة للنطاف vas deferens) بينما يعمل على خفض هذه الحساسية في الألياف العضلية الملساء الوعائية (الوريد البابي الكبدي venae portal hepatica).

Effects of gamma rays on electrically evoked contractions of non-vascular smooth muscles (rat vas deferens).

1-Abstract:

We have tried, in this experiment, to study the modifications of non-vascular smooth muscles contraction induced via gamma rays. Smooth muscular fibers were isolated from the vas deferens of an adult rat and contractions were electrically evoked. Our results show that irradiation activates the VOC (Voltage Operated Channel) type of ionic channels which causes an increasing in the inward flux of Ca^{2+} and then causes an increasing in the inner calcium concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$, the matter which means an increasing in the force of muscular contraction.

Concerning to the response of vas deferens smooth muscles to the activation of membrane receptors, we have tried to study the effects of gamma rays on activating adrenergic and cholinergic receptors, also, we have tried to show the effects of different doses of gamma rays (1, 3, 5, 7 Gy) on regulating the contractile response of this type of smooth muscles. And results show that:

- Irradiation increases contraction force, mediated by adrenergic and cholinergic receptors, in a dose dependent manner, with $E_{\text{max}} 1 \text{ Gy} < E_{\text{max}} 3 \text{ Gy} < E_{\text{max}} 5 \text{ Gy} < E_{\text{max}} 7 \text{ Gy}$.
- There is an important shift on irradiated rats (3, 5, 7 Gy) where the maximum effect of Acetylcholine (E_{max}) can be obtained in lower concentrations of Acetylcholine.

These results mean that irradiation activates the inward flux of Ca^{2+} through the ROC (Receptors Operated Channels) type of ionic channels, which rely, in their activation, on activating the membrane receptors.

By comparing these results with the effects of gamma rays on activating vascular adrenergic and cholinergic receptors, we concluded that:

- Non-vascular smooth muscles (vas deferens) are less sensitive to irradiation in comparing with vascular smooth muscles (venae portal hepatica).
- Irradiation increases the sensitivity of cholinergic receptors to Acetylcholine in the smooth muscular fibers of vas deferens while; it decreases this sensitivity in the smooth muscular fibers of venae portal hepatica.

2- المقدمة:

يلعب تقلص العضلات الملساء للقناة الناقلة للنطاف Vas deferens دوراً هاماً في دفع وتسيير النطاف من البربخ epididymis إلى القناة الدافقة ejaculatory duct التي يصب فيها الحويصلان المنويان seminal vesicles تمهيداً لقفها مع السائل المنوي ضمن الأقية التناسلية الأنثوية. وبالتالي فإن عدم وصول النطاف إلى القناة الدافقة يؤدي إلى حدوث العقم عند الذكور. وقد يرجع ذلك لعدة أسباب منها:

- انسداد القناة الناقلة نتيجة حدوث بعض الالتهابات الشديدة في القناة.
- وجود ندبات أو آثار لبعض الجروح الناتجة عن أذية ما في القناة.
- سبب خلقي ناتج عن عدم تشكل القناة الناقلة للنطاف أصلاً أثناء مراحل التكون الجنيني.
- ضعف القدرة التقلصية للقناة الناقلة مما يسبب تناقص كبير في عدد النطاف الواصلة إلى القناة الدافقة.

وفي الأونة الأخيرة أجريت دراسات كثيرة لمعرفة العوامل المختلفة المؤثرة على تقلص القناة الناقلة للنطاف. ففي دراسة لتأثير تركيز المغنزيوم الخارجي $[Mg^{2+}]_o$ على التقلص العضلي المحرض كهربائياً للقناة الناقلة للنطاف، أوضح (Omu et al 2001) أن تخفيض تركيز المغنزيوم الخارجي $[Mg^{2+}]_o$ يزيد في الإستجابة التقلصية المحرصة كهربائياً، بينما تؤدي زيادة تركيز المغنزيوم الخارجي إلى تثبيط هذه الإستجابة. ولاحظ أيضاً أن هذا التأثير المثبط لشاردة المغنزيوم Mg^{2+} يمكن عكسه بزيادة تركيز الكالسيوم الخارجي $[Ca^{2+}]_i$. وتدل هذه الدراسة على أن الفعالية التقلصية للقناة الناقلة للنطاف يمكن أن تتأثر بتغير تركيز الأيونات الخارجي والتي تؤثر بدورها على عملية نقل النطاف عبر القناة.

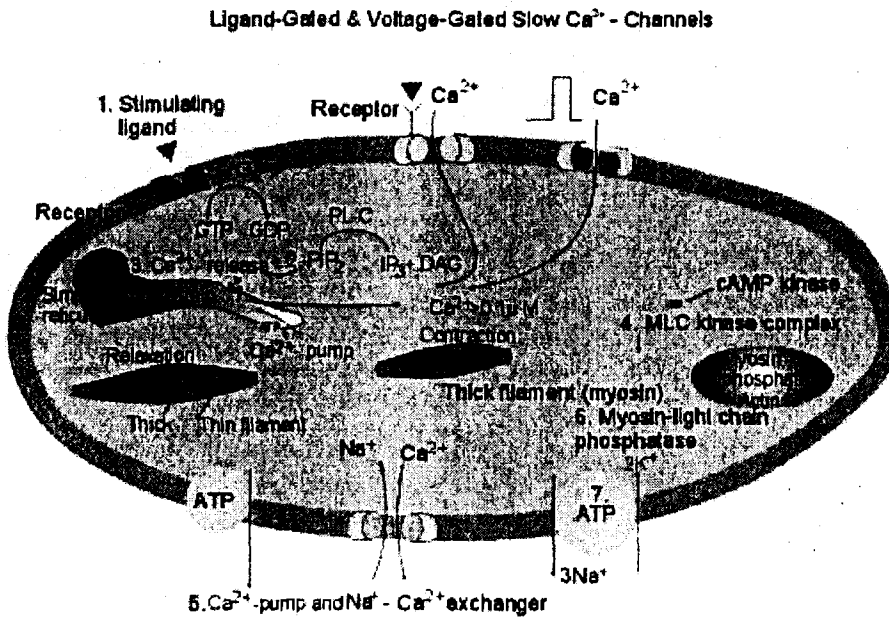
معروف أن الخلية العضلية الملساء تشتمل في مستوى الغشاء الخلوي على نمطين من قنوات الكالسيوم Ca^{2+} channels هي نمط القنوات POC (Potential Operating Channel) التي تنتشط عن طريق التبدلات التي قد تطرأ على كمن الغشاء الخلوي، والنمط الثاني هو القنوات ROC (Receptor Operating Channel) التي تنتشط بشكل لاحق لتثبيته المستقبلات الغشائية نتيجة ارتباطها مع أحد المنبهات أو الربائط ligands مثل الأستيل كولين Acetylcholine أو الفينيل إفرين Phenylephrine. فعند تثبيته الخلية العضلية بمنبه كهربائي electric stimulator أو عن طريق تنشيط المستقبلات الغشائية فإنه يتم تفعيل البروتين G-protein الذي ينشط بدوره القنوات الأيونية مما يسبب دخول تيار من الكالسيوم Ca^{2+} influx يقود إلى رفع تركيز الكالسيوم الداخلي $[Ca^{2+}]_i$ حتى يصل إلى العتبة الكافية لحدوث التقلص العضلي والتي تقدر بحدود 10^{-6} M (Hermsmeyer 1998)، شكل (1).

ينحصر تأثير الأستيل كولين على نمطين من المستقبلات الكولينرجية هما المستقبلات المسكارينية Muscarinic receptors والمستقبلات النيكوتينية Nicotinic receptors، ويعتبر الوسيط العصبي الاساسي في النهايات العصبية المحيطة حيث يلعب دوراً فزيولوجياً اساسياً في تقلص العضلي، سواءً في تقلص العضلات الهيكلية أو العضلات الملساء، هذا إضافة لدوره في تنظيم الإفراز في النسيج الغدية المفرزة المختلفة (Feletou *et al* 1986, Gaulfied 1993, Watson and Arkinstall 1994). وقد تم في السنوات الأخيرة تحديد نمط المستقبلات الكولينرجية المسكارينية في النسيج المختلفة وهي (M_1, M_2, M_3, M_4, M_5) Muscarinic receptors، وفي العضلات الملساء يصادف بشكل مميز المستقبل المسكاريني M_2 (Watson *et al* 1994). أما الجملة الأدرينرجية فتلعب دوراً هاماً في مستوى عمل الجهاز التناسلي الذكري في إنجاز عملية القذف بواسطة المستقبلات الأدرينرجية من النمط الفا-1 (α_1) في القناة الناقلة للنطاف والحوصل المنوي والبروستات (DiMicco 2002). في حين أن القناة الناقلة للنطاف لا تمتلك مستقبلات ادرينرجية من النمط الفا-2 (α_2) بعد المشبكية Post-synaptic التي تستطيع تعديل أثر المستقبلات الفا-2 قبل المشبكية Pre-synaptic التي تؤثر فيها الأدوية المدروسة (Doggrell 1981, Bourreau 1986). وقد تم تحديد توزع المستقبلات الأدرينرجية بأنماطها المختلفة في الخلايا العضلية الملساء بشكل عام وصنفت بناءً على دراسات بيولوجية جزيئية وفيزيولوجية وفارماكولوجية إلى مستقبلات $\alpha_1, \alpha_2, \beta$ أدرينرجية. وقد أوضح Berdysheva (1996) في دراسة تأثير الصوديوم الخارجي على الإستجابة التقلصية للقناة الناقلة للنطاف عند الجرذ وجود المستقبلات الأدرينرجية من النمط الفا-1 (α_1) في هذه البنية العضلية.

وفي إطار دراسة تأثير الأشعة المؤينة غاما على تقلص الألياف العضلية الملساء، فقد أجريت دراسات عديدة لمعرفة الأثر المحتمل لأشعة غاما على تقلص وألية عمل هذه الألياف. فقد أجرينا دراسة على مستوى خلوي لألياف عضلية ملساء ذاتية التقلص، معزولة من الوريد البابي الكبدي للجرذ، لمعرفة أثر التشعيع على المقوية العضلية الوعائية (Alya 1996). وأظهرت نتائج هذه الدراسة أن التشعيع يضعف التنافس الوظيفي بين الكالسيوم والمغنزيوم المميز للعضلات الملساء بشكل عام والوعائية بشكل خاص كما أنه يحرض على تنشيط دخول الكالسيوم Ca^{2+} للخلية العضلية الوعائية. وبدراسة أخرى عام 1999 وجدنا أيضاً أن التشعيع يقلل من حساسية الألياف العضلية الوعائية تجاه التنبه الكولينرجي وأن حساسية المستقبلات الأدرينرجية الإشعاعية أكبر منها للمستقبلات الكولينرجية الوعائية.

تدل هذه الدراسات على أن التشعيع يلعب دوراً هاماً في تغيير نفاذية Permeability الأغشية الخلوية للأيونات المختلفة وخاصة الكالسيوم Ca^{2+} كما أنه يغير في حساسية المستقبلات الكولينرجية والأدرينرجية تجاه المنبهات المختلفة الذي يؤدي بدوره إلى إحداث تبدلات هامة في المقوية العضلية الملساء. لذلك فقد حاولنا من خلال هذه التجربة معرفة الأثر المحتمل للأشعة المؤينة على تقلصات الألياف العضلية الملساء غير الوعائية غير ذاتية التقلص والمعزولة من القناة الناقلة للنطاق عند الجرذ بغرض إجراء دراسة مقارنة لتأثير التشعيع على هذه البنية العضلية مقارنة مع العضلات الملساء الوعائية ذاتية التقلص.

Contraction And Relaxation In Smooth Muscle Cell



الشكل (1): يوضح الشكل تنشيط قنوات الكالسيوم من النمطين (ROC - POC) ودخول Ca^{2+} إلى داخل الخلية العضلية أو تحرره من الشبكة السيتوبلاسمية العضلية (Sarcoplasmic Reticulum) SR. حيث يصل تركيزه ضمن الخلية إلى أكثر من 10^{-6} مول، ثم يرتبط الـ Ca^{2+} مع الكالمودولين Calmodulin لتنشيطه فيعمل هذا الأخير على تنشيط أنزيم الكيناز المفسر للسلسلة الميوزينية الخفيفة myosin light chain kinase التي تحول الميوزين إلى الميوزين المفسر myosin-phosphate فيرتبط بدوره مع خيوط الأكتين actin مؤدياً إلى حدوث التقلص العضلي بانزلاق خيوط الأكتين ضمن خيوط الميوزين.

ماخوذ من Poul-Erik Paulev, M.D.,D.Sci. Copenhagen Medical Publishers 1999-2000.

3- المواد والتجهيزات:

3-1- المواد:

استخدمنا في تحضير المحاليل الفيزيولوجية المواد والأملاح المعدنية التالية وجميعها من شركة Merck – المانيا:

NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂.6H₂O, NaHCO₃, NaH₂PO₄.2H₂O, (NaOH, HCl), D⁺ Glucose.

واستخدمنا أيضاً الموقى Hepes

N-[Hydroxy Ethyl] piperazine-n-[2-Ethane sulfonic acid]

وهو من شركة Q Biogene- فرنسا.

إضافة للأملاح المستخدمة في تحضير المحاليل الفيزيولوجية تم استخدام المواد الفارماكولوجية التالية وجميعها من شركة سيغما SIGMA الأمريكية وهي:

الأسيتيل كولين Acetylcholine، الفينيل إفرين Phenylephrine، الأتروبين Atropine، البروبرانولول Propranolol.

3-2- التجهيزات:

- الجهاز الأساسي في العمل هو جهاز العمل على أعضاء معزولة IOS (Isolated Organ System) طراز (Dei lierre (electronique) / فرنسا. ويتضمن هذا الجهاز 4 أحواض تجريبية، 4 نواقل، وحدة تغذية وتكبير 4 مخارج، راسمة طراز Linesis (L 651213).
- راسمة اضافية طراز Recorder Company من شركة CP / أمريكا.
- حوض حمام مائي مع ترموستات طراز Bioblock (Polystat 86602) / فرنسا.
- حمام مائي طراز Memmert (6 L-12 L) مع ترموستات / المانيا.
- مكبرة مجسمة طراز Warszawa (PZO 25997) مزودة بوحدة تغذية ZM(50) Power Supply / بولونيا، منبع نور بارد (KL 1500 Electronic) OSI / فرنسا.
- مجموعة أدوات تشريح مجهرية (خاصة بالجراحة العينية) من شركة Moria / فرنسا، الملاقط طراز C 7850، المقصات D 2164.
- ملاقط حمل شبكية (Cie, Switzerland Dumont) / سويسرا.

- مقصات وملاقط جراحة عادية (محلي).
 - مقياس الحموضة PH-meter طراز inolab (inolab PH/cond level 1) / المانيا.
 - مجموعة ماصات عادية + مجموعة ميكروبييت BRAND / المانيا.
 - مجموعة ترشيح وفلتر Sigma / امريكا.
 - خلاط مع سخان موديل 32 شركة Labinco BV / فرنسا.
 - جهاز تنبيه كهربائي من شركة هارفارد Harvard طراز 6012 (6012 Stimulator) / امريكا.
 - منظمات تيار طراز Do-Power (DP 2000 NS) / فرنسا.
 - مضخة تفريغ هواء طراز Vacuubrand (GMBH-Co) / المانيا.
 - ميزان حساس طراز Sartorius (0.000) (BC-1201) / المانيا.
 - علب بتري يصب في قعرها السيليكون الحراري وتوضع في الفرن بحرارة $70^{\circ}C$ لمدة 24 ساعة لمنع تكون الفقاعات الهوائية.
 - دبابيس تشريح دقيقة تنغستين / المانيا.
 - خيوط قطنية دقيقة تستخدم في تثبيت المحضر (محلي).
 - أسلاك كهربائية دقيقة تستخدم لتنبيه الألياف العضلية (محلي).
- الأحواض التجريبية في الجهاز عددها 4 وهي ذات حجم داخلي ثابت 20 ml ومصممة بحيث تبقى حرارة السائل الداخلي في حجرة التجريب ثابتة (رقم 2 في الشكل 2) حيث يستقر بداخلها محضر الألياف العضلية المعزولة. الحرارة الثابتة يؤمنها ضخ المياه الساخنة $38^{\circ}C$ عن طريق مضخة السخان المزود بترموستات وذلك ضمن البطانة المسخنة.

4- الطرائق والقياسات:

4-1- الطرائق:

4-1-1- تحضير عينات الألياف العضلية:

استخدمنا في تجاربنا ألياف عضلية ملساء طويلة معزولة من القناة الناقلة للنطاف لجرذان ذكور بالغة سلالة ويستار Wistar بعمر 2.5 - 3 أشهر و بوزن وسطي بين (230 - 270 غ). يقتل الحيوان بضربه على الرأس، يقطع المذبح ويترك الحيوان لينزف معظم الدم الدوراني. يفتح التجويف البطني ويستأصل جزء من القناة الناقلة للنطاف من الخصية اليسرى للحيوان بطول (1 - 1.5 سم) من جهة البربخ epididymis ويوضع في علبة بتري تحوي السائل الفيزيولوجي

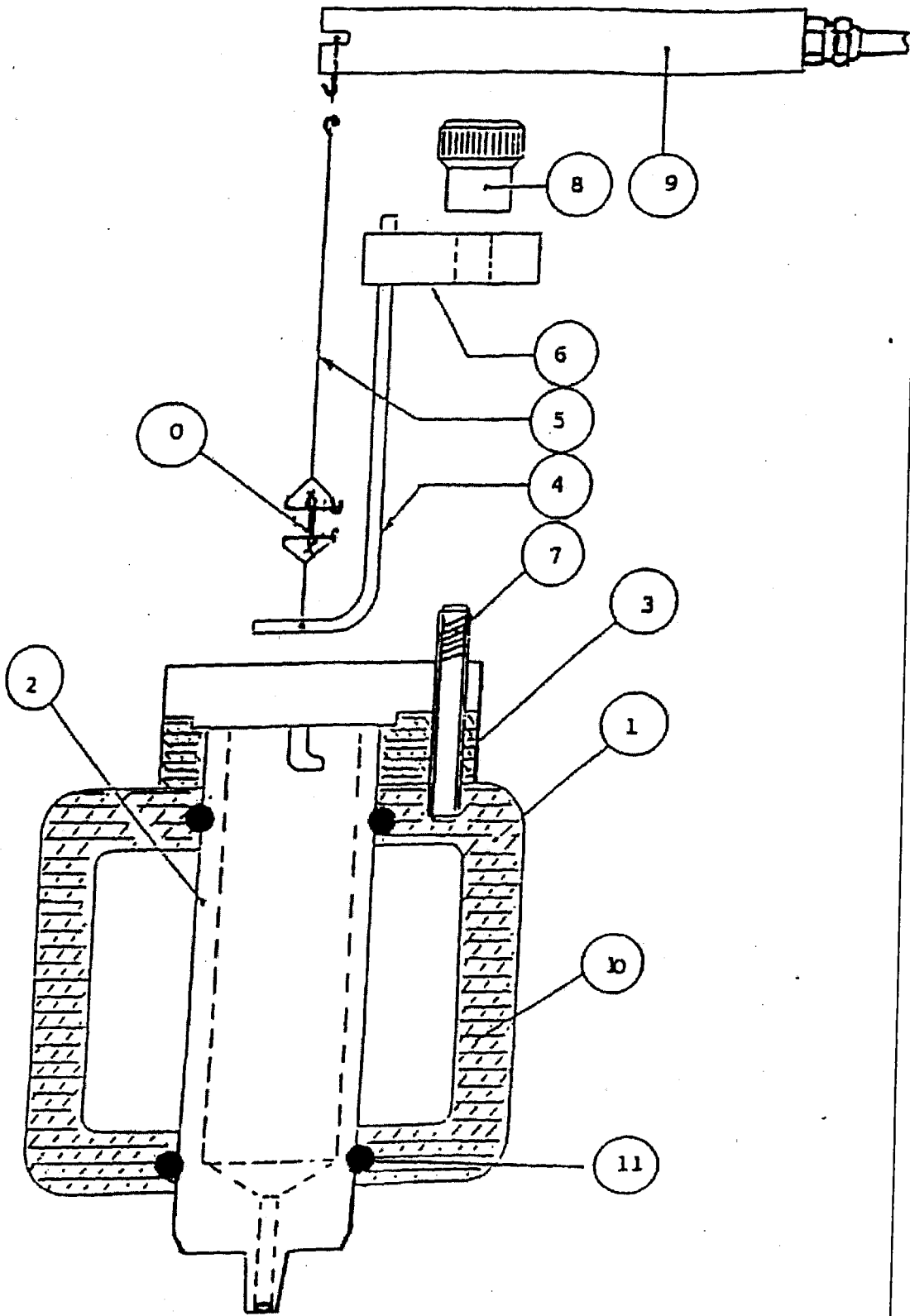
المحضر مسبقاً. تتم تحت المكبرة عملية تنظيف القناة من الغللة الخارجية adventitia (الغنية بالأعصاب nerves والأوعية الدموية blood vessels) والنسج الشحمية adipose tissue المحيطة بها بعناية شديدة. ثم يتم باستخدام خيوط قطنية دقيقة ربط النهاية الرفيعة للقناة (القريبة من البربخ) وتصنع حلقة من الخيط الدقيق ثم تجرى عملية ربط أخرى على بعد 5-6 ملم من الحلقة الأولى بحيث نحصل على جزء من القناة يتم تثبيته في الجزء المتحرك من الحوض التجريبي (رقم 0 في الشكل 2).

يثبت القسم المتحرك ضمن الحوض ويربط الطرف الحر بخطاف موصول مع الحساس (رقم 9 في الشكل 2) الذي ينقل بدوره التقلصات بعد تكبير اشارة الخرج المنقولة إلى الراسمة. بعد تثبيت جزء القناة في مكانه في الحوض التجريبي، يطبق عليه قوة شد أساسية بواسطة آلية التعامل الدقيقة بحدود 500 - 700 ملغ ويترك مدة 30 دقيقة قبل بدء التجربة لإراحته ضمن الحوض التجريبي.

يتم تنبيه الألياف العضلية باستخدام أسلاك تنبيه كهربائية دقيقة تثبت بالقرب من طرفي الليف العضلي في نهايتها الأولى وموصولة إلى مخارج جهاز التنبيه الكهربائي في النهاية الأخرى.

الشكل (2): توضيح تخطيطي لأجزاء الحوض التجريبي مع التجهيزات الملحقة التي تساعد في تثبيت محضر الألياف العضلية المتقلصة.

- 0 - محضر الألياف العضلية.
- 1 - البطانة المسخنة بالماء $37^{\circ}C$.
- 2 - خلية العمل في الحوض (حجم ثابت 20 ميلي ليتر).
- 3 - التاج.
- 4 - حامل محضر الألياف العضلية الثابت (الجزء الثابت).
- 5 - ساق معدنية للشد الميكانيكي (الجزء المتحرك).
- 6 - معترضة تثبيت بلاستيكية.
- 7 - ساق التثبيت.
- 8 - بزال التثبيت للمجموعة لمنع نقل الاهتزازات التشويشية.
- 9 - الحساس المزود بخطاف لتعليق حامل المحضر.
- 10 - البطانة المسخنة.
- 11 - الوصلة الطوقية.



الشكل (2): توضيح تخطيطي لأجزاء الحوض التجريبي مع التجهيزات الملحقة التي تساعد في تثبيت محضر الألياف العضلية المتقلصة.

2-1-4- تحضير السائل الفيزيولوجي المستخدم:

استخدمنا في تجاربنا سائل كريبس المعدل Modified Krebs الذي له التركيب الأيوني التالي:
[Ca²⁺: 2.5 mM/L, Mg²⁺: 1.2 mM/L, NaH₂PO₄: 1.2 mM/L, NaHCO₃: 1 mM/L, K⁺: 5.9 mM/L, Na⁺: 120 mM/L, Hepes: 5 mM/L, Glucose: 11.5 mM/L (2g/L)].

يعاير المحلول الفيزيولوجي بعد التحضير على درجة PH 7.4 [باستخدام 35% HCl و NaOH (1N)] وتضبط درجة الحرارة على 37 C° في الحمامات المائية التي توضع فيها سوائل التغذية والتجريب.

وعند زيادة تركيز الكالسيوم في المحاليل الفيزيولوجية عالية تركيز الكالسيوم 5, 10, 15 mM/L تحذف البيكربونات NaHCO₃ والفوسفات NaH₂PO₄.6H₂O ويستعاض عنها بـ 7 mM/L من الموقى Hepes لتجنب ظاهرة الترسيب التي يمكن أن تحدث في المحلول.

3-1-4- تحضير المواد الفارماكولوجية المستخدمة:

كما ذكرنا سابقاً فقد استخدمنا في تجربتنا المواد الفارماكولوجية التالية:

الأسيتل كولين Acetylcholine والفينيل افرين Phenylephrine والأتروبين Atropine والبروبرانولول Propranolol.

حيث حضر من هذه المواد محاليل أم بتركيز 10⁻² مول/ليتر في الماء ثنائي التقطير، وتوضع في عبوات مغلقة بنايلون أسود وتحفظ في البراد بدرجة 4 C°. تحضر المحاليل الفيزيولوجية في ظروف اضاءة مخففة وذلك بدأ من المحلول الأم حيث يحضر تركيزين أوليين من المحلول الفيزيولوجي 10⁻⁴ M/L و 3.10⁻⁴ M/L وبطريقة التمديد تحضر التراكيز 10⁻⁵ M/L و 3.10⁻⁵ M/L التي تستخدم بدورها لتحضير محاليل بتركيز أدنى، وهكذا للحصول على التراكيز الضعيفة 10⁻⁸ M/L و 3.10⁻⁸ M/L. وتوضع هذه المحاليل بعد تحضيرها في الحمام المائي بدرجة حرارة 37 C° لحين الاستخدام.

4-1-4- عمليات التشعيع:

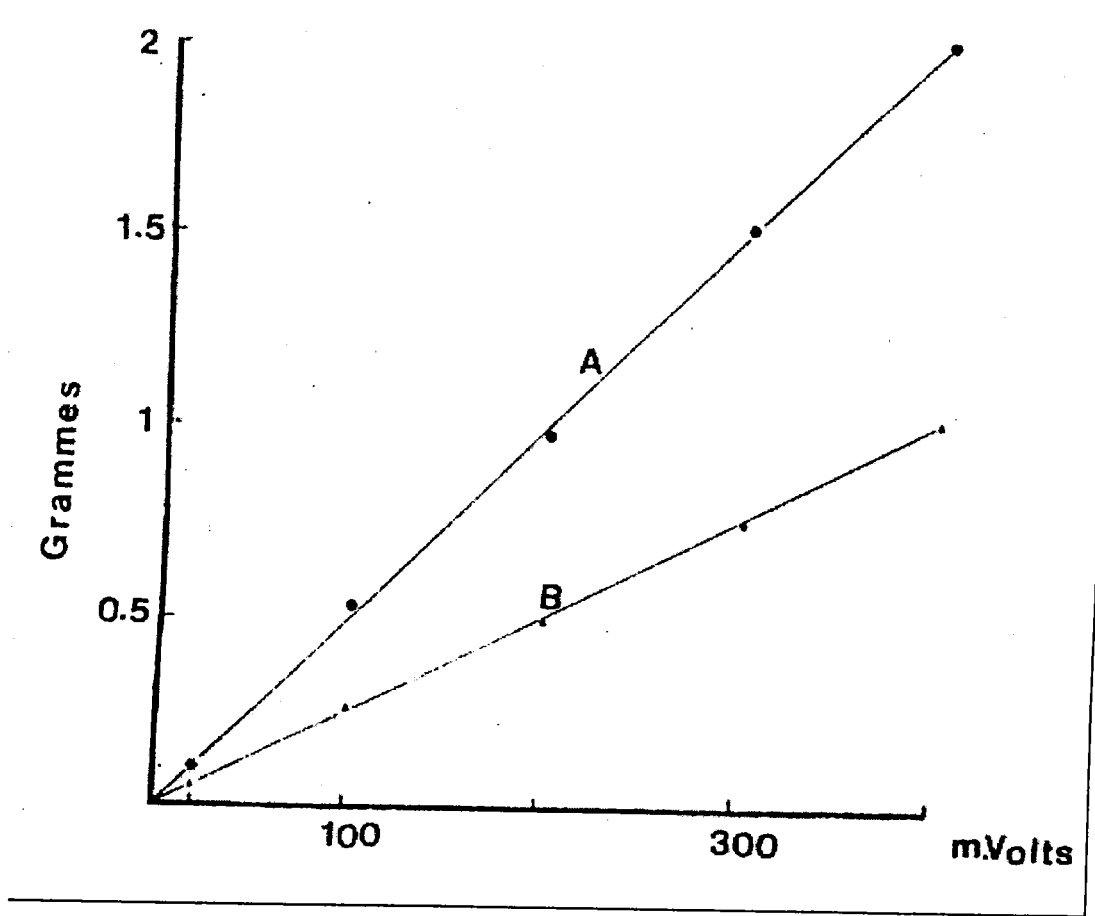
يشع الحيوان قبل بدء التجربة بوضعه في علبة من البلكسي غلاس Plexiglas مستطيلة مناسبة لحجم الحيوان متقبة ومزودة بغطاء، ويتم تشعيع كامل جسم الحيوان Whole Body بإشعة غاما الصادرة عن منبع الكوبالت-60 ⁶⁰Co ذات الطاقة المتوسطة Irradiation

باعد في

1.25Mev الصادرة عن جهاز المعالجة الطبية المتوفر في قسم الوقاية الإشعاعية والأمان النووي في الهيئة (Theratron-80) ويتم التشعيع بمعدل جرعة وسطي 90 Rad.min^{-1} . يحسب مقدار الجرعة المعطاة اعتماداً على زمن التعرض الكلي للأشعة. ثم يقتل الحيوان وتعزل القناة الناقلة للنطاف بعد ساعة من التشعيع. وقد استخدمنا في تجاربنا الجرعات الإشعاعية التالية: 1, 3, 5, 7 غري.

2-4- القياسات (قياس شدة التقلص العضلي):

بعد وضع جزء القناة في الحوض التجريبي وتثبيتته بشكل نهائي يتم تنبيهه عن طريق جهاز التنبيه الكهربائي، ثم تسجل التقلصات على الراسمة لمدة 1-2 دقيقة من بدء التنبيه. حيث يرسل جهاز التنبيه 6 نبضات/دقيقة وبالتالي يتم تسجيل 6 - 12 تقلص خلال الزمن المذكور. وتحسب شدة التقلص بأخذ متوسط التقلصات المسجلة قبل البدء بالتجربة أو الانتقال لمحلول آخر أو الغسيل لمحلول عادي. وتجرى التجارب باختبار تراكيز تراكمية من شوارد Ca^{2+} أو المادة الفارماكولوجية المضافة ويحسب التأثير بعد استقرار الليف في المحلول المختبر. تحسب النقاط التجريبية منسوبة للتأثير الأعظمي % 100 الذي نحصل عليه أو للتقلصات العضلية في المحلول العادي الذي تعتبر فيه شدة التقلص في هذه الحالة % 100. وتتم معايرة الحساسات قبل التجربة ويتم التأكد من خطية القياس ويعتمد بعدها تقدير شدة التقلص بالملغ حيث يتم التحويل من ميلي فولت إلى ملغ (الشكل 3).



الشكل (3): منحنى معايرة الحساسات يظهر خطية القياس الضرورية لصحة تقدير النتائج.

(G = 200, S = 200 mV) - A

(G = 100, S = 200 mV) - B

يتم التحويل إلى ميلي فولت m. Volt بدلالة الوزن المستخدم في المعايرة عن طريق تقدير تدريجات الراسمة التي يحققها تعليق أوزان متدرجة على خطاف الحساس بدل الألياف العضلية.

5- النتائج:

1-5- الكالسيوم Calcium:

تم اختبار المحاليل الفيزيولوجية التالية من كريس المعدل:

- محلول خالي الكالسيوم Ca^{2+} free solution.
- محلول يحوي ربع تركيز المحلول العادي من الكالسيوم $[Ca^{2+}] = 0.6 \text{ mM/L}$.
- محلول يحوي نصف تركيز المحلول العادي من الكالسيوم $[Ca^{2+}] = 1.25 \text{ mM/L}$.
- محلول عادي Normal (N solution) $[Ca^{2+}] = 2.5 \text{ mM/L}$.
- محلول مضاعف تركيز الكالسيوم $[Ca^{2+}] = 5 \text{ mM/L}$.
- محلول عالي تركيز الكالسيوم $[Ca^{2+}] = 10 \text{ mM/L}$.
- كما تم استخدام محلول يحوي تراكيز مفرطة من الكالسيوم $[Ca^{2+}] = 15 \text{ mM/L}$ ،
 $[Ca^{2+}] = 20 \text{ mM/L}$.

بعد وضع القناة في الحوض التجريبي وتسجيل تقلصاتها بالمحلول العادي يضاف المحلول $[Ca^{2+}] = 0$ وتسجل التقلصات بعد التنبيه لمدة 1-2 دقيقة حتى يلاحظ استقرار شدة التقلصات، ثم يضاف الكالسيوم ضمن المحلول الفيزيولوجي بشكل تراكمي متزايد حيث يضاف المحلول 0.6 mM/L ثم المحلول 1.25 mM/L ثم التركيز الأعلى فالأعلى إلى أن تحصل ظاهرة تثبيط التقلص العضلي.

يلاحظ على الألياف العضلية الشاهدة أن المحلول الفيزيولوجي الخالي من الكالسيوم يثبط تماماً تقلص الألياف العضلية فلا تستجيب القناة للتنبيه مطلقاً. وبعد اضافة المحلول 0.6 mM/L كالسيوم نلاحظ أن الألياف استعادت فعاليتها التقلصية وبدأت تستجيب للتنبيه مباشرة بعد اضافة المحلول لكن بشدة تقلصية ضعيفة جداً. وتزداد شدة التقلص هذه بازدياد تركيز الكالسيوم ضمن المحلول الفيزيولوجي المضاف حتى التركيز 10 mM/L حيث يثبط التركيز 15 mM/L التقلصات العضلية بما يقارب 25 - 20 % من شدة التقلص الأعظمي ويزداد التثبيط بازدياد تركيز الكالسيوم حتى 20 mM/L (شكل 4-A). ونلاحظ هنا أن تقلص الألياف العضلية للقناة لا يثبط كلياً في هذه المحاليل مفرطة تركيز الكالسيوم (15 mM/L و 20 mM/L) خلافاً لما هو عليه في الألياف العضلية الملساء للوريد البابي الكبدي التي يثبط فيها التقلص كلياً بالمحلول 15 mM/L (ALYA 1996). وبعد الغسل بمحلول عادي يلاحظ أن الألياف العضلية تستعيد فعاليتها التقلصية البدائية مباشرة بشدة تقلص مرتفعة أحياناً بعد الغسل مباشرة. فظاهرة تثبيط الفعالية

تقدير
ية.

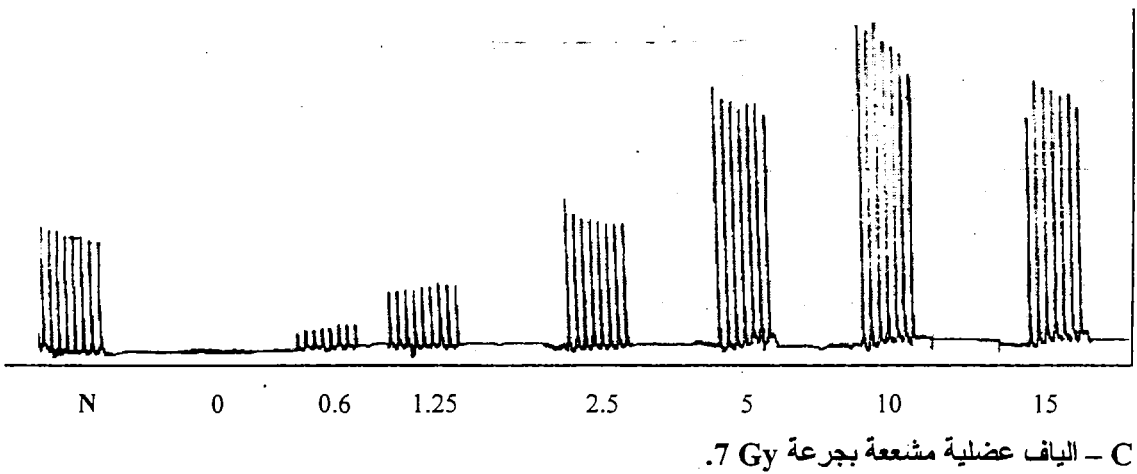
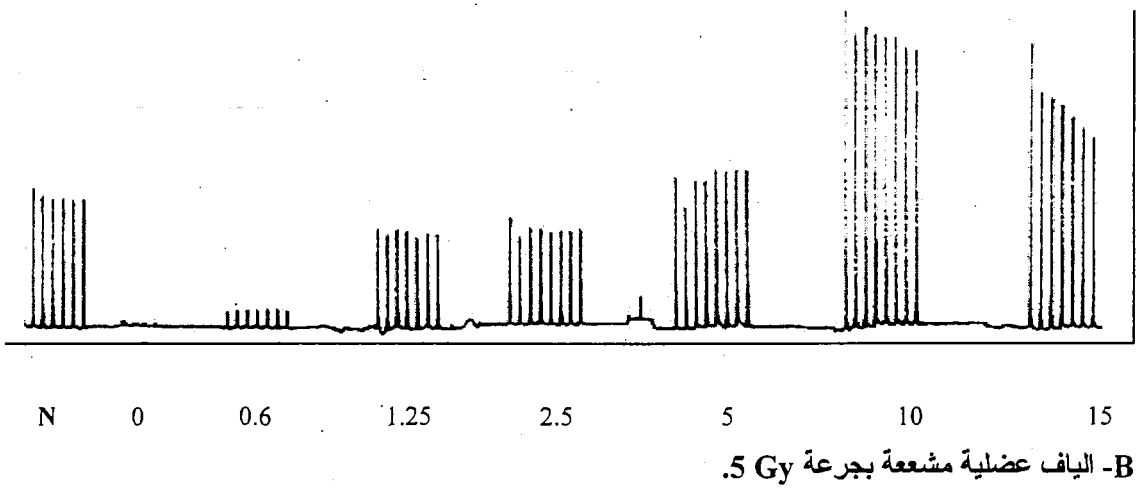
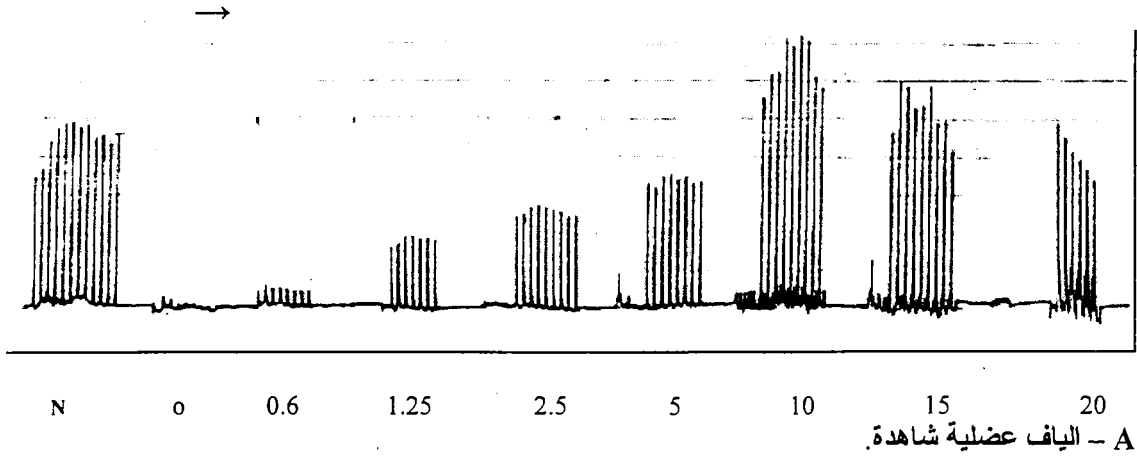
التقلصية بالمحلول خالي الكالسيوم هي ظاهرة عكوسة تماماً وبفترة وجيزة في الألياف العضلية الملساء غير الوعائية بعد اضافة الكالسيوم.

ويلاحظ أن التأثير الأعظمي على شدة التقلص يتم الحصول عليه بالتركيز 10 mM/L كالسيوم. وهذا يتفق مع نتائج الدراسات التي أجريت على الألياف العضلية الملساء الوعائية للوريد الباني الكبدى (ALYA 1996) وبالتالي يمكن اعتبار أن هذا التأثير الأعظمي يمثل 100 % وتتسب له القيم التي يتم الحصول عليها في التركيز الأدنى وهكذا فإن الفعالية هي صفر 0 % في المحلول عديم الكالسيوم.

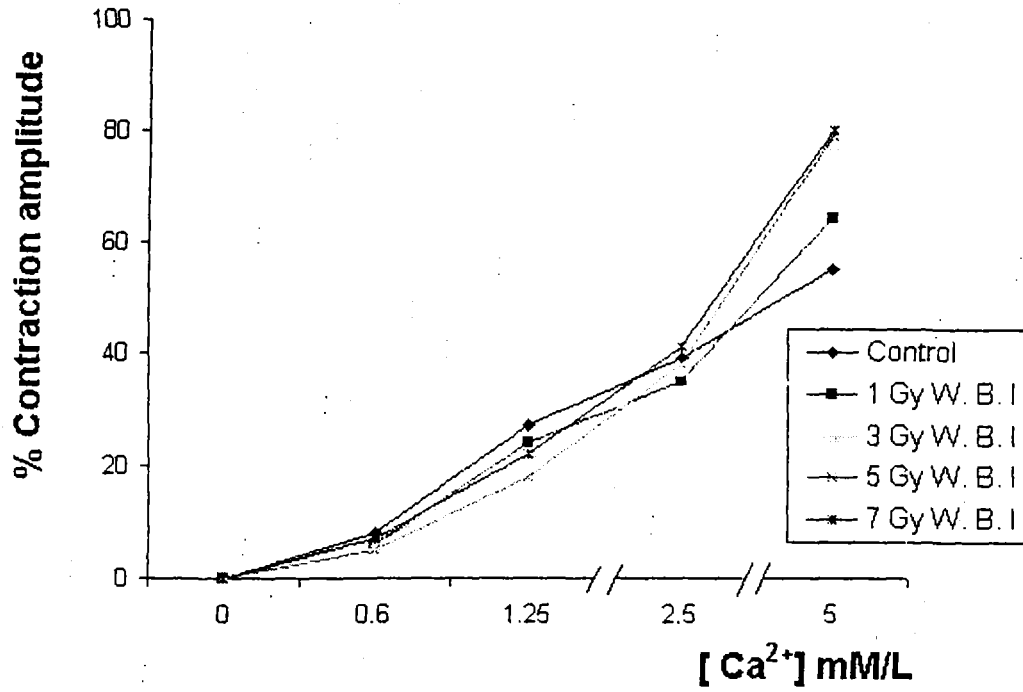
في الألياف العضلية المعزولة بعد التشعيع لم يلاحظ فروق معنوية كبيرة بين تقلصات هذه الألياف العضلية المشععة وتقلصات الألياف العضلية الشاهدة حيث لوحظ أن غياب الكالسيوم (كما في الألياف العضلية الشاهدة) يثبط التقلصات المحرصة بالتنبيه الكهربائي بشكل كامل (الشكلين 4-B و 4-C). ويلاحظ أيضاً عودة التقلص مباشرة بعد اضافة الكالسيوم بتركيز 0.6 mM/L كما في الألياف العضلية الشاهدة. وتزداد شدة التقلص تدريجياً بزيادة تركيز الكالسيوم حتى الحصول على التأثير الأعظمي بالتركيز 10 mM/L أيضاً. حيث يبدأ تثبيط التقلصات العضلية بالمحلول 15 mM/L ويزداد التثبيط بزيادة التركيز حتى 20 mM/L. ولكن نلاحظ أنه بدءاً من التراكيز 5 mM/L التي تحرض حوالي 55% من شدة التقلص الأعظمي في الألياف الشاهدة فإن التشعيع يحرض على زيادة شدة التقلص بشكل متناسب طردياً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المعطاة حيث تصل شدة التقلص إلى 80 % من شدة التقلص الأعظمي (الشكل 5).

وبحساب النقاط التجريبية التي حصلنا عليها باستخدام التراكيز المتزايدة من الكالسيوم منسوبة إلى شدة التقلص للألياف العضلية في المحلول العادي N، حيث تعتبر شدة التقلص للألياف العضلية في المحلول العادي مساوية 100 % في هذه الحالة، يمكن اظهار أثر الأشعة المؤينة على زيادة شدة التقلص العضلي بشكل أوضح. فالنسبة المئوية لشدة التقلص في المحلول 0 كالسيوم تساوي 0 % نظراً لعدم وجود تقلص عضلي في هذا التركيز وتزداد شدة التقلص تدريجياً بازدياد تركيز الكالسيوم حتى الحصول على شدة التقلص الأعظمية في التركيز 10 mM/L.

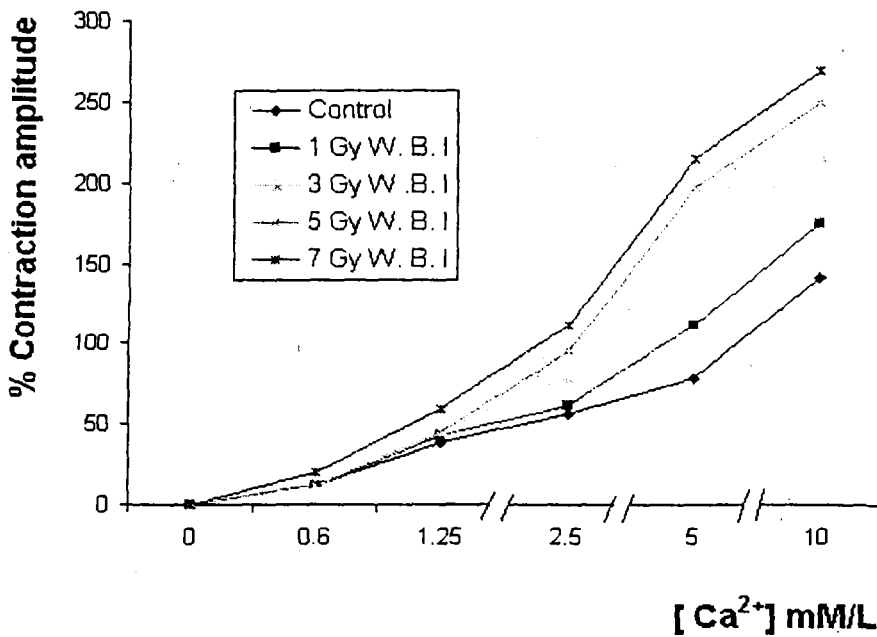
في الألياف العضلية الشاهدة نلاحظ أن شدة التقلص العضلي تزداد تدريجياً حتى تصل في التركيز 10 mM/L إلى مايقارب 150 % (وسطياً) من شدة تقلص هذه الألياف في المحلول العادي. ونلاحظ أنه بزيادة الجرعة الإشعاعية فإن شدة التقلص العضلي تزداد بشكل طردي حتى تصل بالتركيز 10 mM/L كالسيوم إلى مايقارب 270 % (وسطياً) في الألياف المشععة بجرعة 7Gy (الشكل 6).



الشكل (4): تزايد شدة تقلصات الألياف العضلية الشاهدة A والمشعة B و C بتأثير التراكيث المتزايدة من الكالسيوم (mm/L). يلاحظ عدم حدوث تقلص في التركيز 0 كالسيوم وحدوث التأثير الأعظمي بالتركيز 10 mm/L كما يلاحظ بوضوح زيادة شدة التقلصات العضلية في الألياف المشعة (منسوبة إلى شدة تقلص هذه الألياف في المحلول العادي N) طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة. يشير السهم إلى جهة التسجيل.



الشكل (5): تمثيل بياني لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة للشدة الأعظمية) بدلالة تغيرات تراكيز الكالسيوم الخارجي $[Ca^{2+}]_o$ على الألياف العضلية الشاهدة والمشعة بجرعة 1، 3، 5، 7 غري. يلاحظ، في المحاليل التي يزيد فيها تركيز الكالسيوم عن المحلول العادي (2.5 mM/L)، أن التشعيع يعمل على زيادة شدة التقلص العضلي طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة.



الشكل (6): تمثيل بياني لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة لشدة تقلص الألياف في المحلول العادي N) بدلالة تغيرات تراكيز الكالسيوم الخارجي $[Ca^{2+}]_o$ على الألياف الشاهدة والمشعة بجرعة 1، 3، 5، 7 غري. يلاحظ أن التشعيع يعمل على زيادة شدة التقلص العضلي طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة.

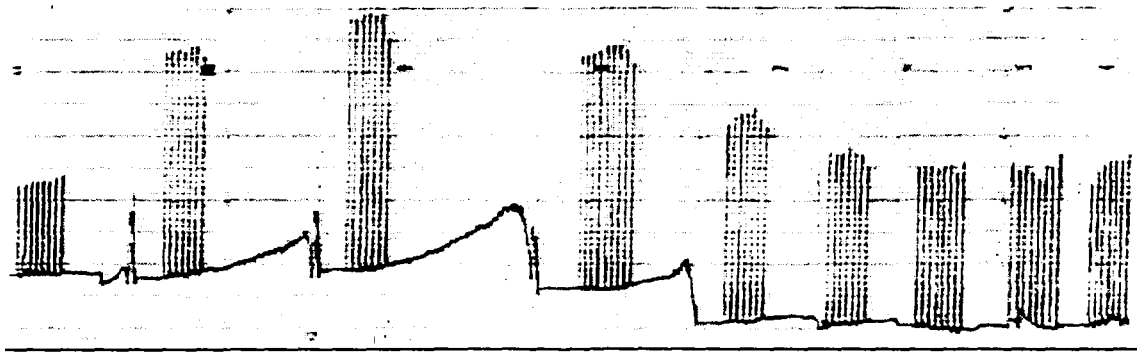
2-5- الفينيل افرين Phenylephrine:

تم اختبار الأثر التراكمي المتزايد لتراكيز الفينيل افرين، ضمن المحلول الفيزيولوجي، على الألياف العضلية الملساء الشاهدة والمشعة. لوحظ أن الفينيل افرين يزيد من شدة التقلص وبشكل طردي مع زيادة تركيزه بالمحلول بدءاً من التركيز 10^{-8} M/L ويكون تأثير الفينيل افرين في الألياف الشاهدة أعظماً عند التركيز 3.10^{-6} M/L حيث يبدأ في تراكيز أعلى تثبيط شدة التقلص نتيجة دخول الألياف العضلية في تقلصات كزازية، شكل (7-A).

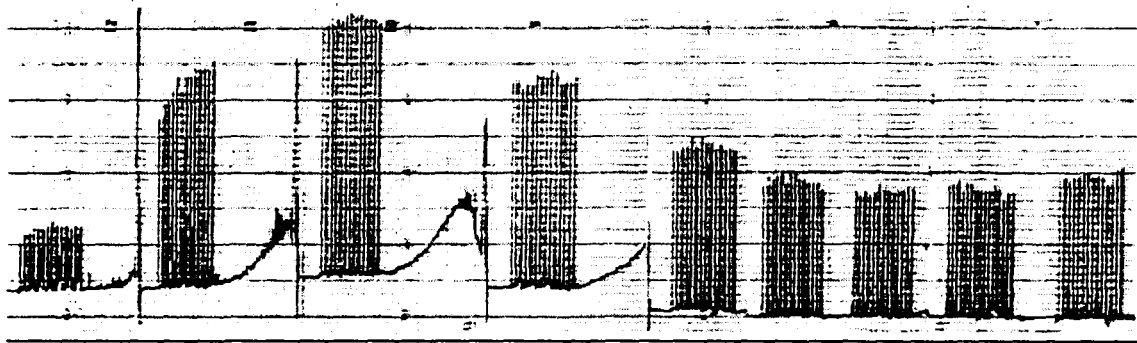
في الألياف العضلية المعزولة من الحيوانات المشعة لوحظ أن التأثير الأعظمي للفينيل افرين تم الحصول عليه عند التركيز 3.10^{-6} M/L أيضاً. لكن لوحظ أنه بالتراكيز 10^{-6} M/L التي تحرض حوالي 65 % من شدة التقلص الأعظمي في الألياف العضلية الشاهدة فإن التشعيع يعمل على زيادة شدة التقلص بشكل متناسب طردياً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة ويلاحظ ذلك بوضوح بالجرعتين 5 و 7 غري حيث تصل شدة التقلص في الجرعة 7 غري إلى ما يقارب 80 % من شدة التقلص الأعظمي. أما في الجرعتين 1 و 3 غري فكانت شدة التقلص مساوية تقريباً لما هي عليه في الألياف الشاهدة (الأشكال 7-B و 7-C و 8).

أيضاً بمقارنة الزيادة في شدة التقلصات التي حصلنا عليها باستخدام التراكيز التراكمية المتزايدة من الفينيل افرين مع شدة التقلصات للألياف العضلية في المحلول العادي نلاحظ بشكل أوضح أن التشعيع يزيد من شدة التقلص بشكل متناسب طردياً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة. ففي الألياف العضلية الشاهدة نلاحظ أن شدة التقلص تزداد تدريجياً حتى تصل نسبة الزيادة في شدة التقلصات في التركيز 3.10^{-6} M/L إلى ما يقارب 100 % من شدة التقلص للألياف العضلية في المحلول العادي. أي أن شدة التقلص في هذا التركيز تكون ضعف ما هي عليه في المحلول العادي. أما على الألياف العضلية المشعة فنلاحظ أن شدة التقلص تزداد بشكل طردي مع الجرعة الإشعاعية المستخدمة حتى تصل نسبة الزيادة في شدة التقلص للألياف العضلية المشعة بالجرعة 7 Gy بالتركيز الأعظمي 3.10^{-6} M/L من الفينيل افرين إلى ما يقارب 150 % من شدة تقلص الألياف في المحلول العادي (الشكل 9).

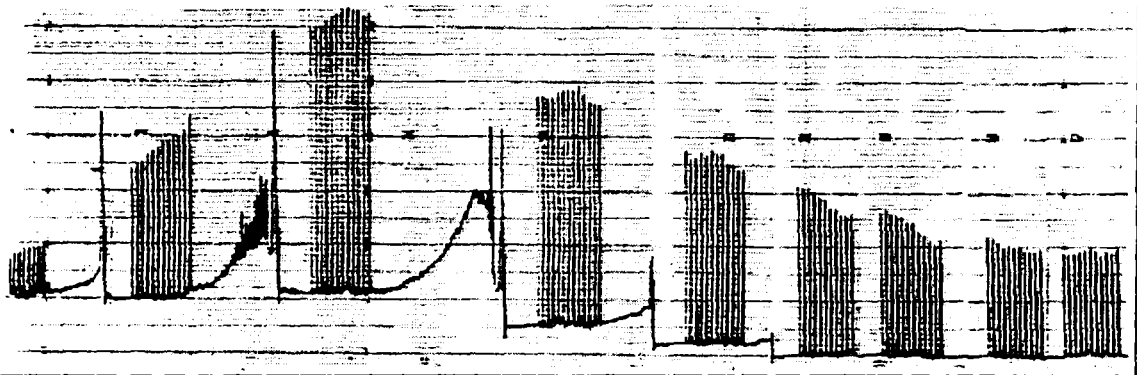
لم تتغير النتائج السابقة باستخدام تراكيز مرتفعة من البروبرانولول (Propranolol) 10^{-6} M/L وهو مثبط غير نوعي للمستقبلات بيتا الأدرينرجية β Adrenergic Receptors. مما يوضح أن تأثير الفينيل افرين محرض بتنشيط المستقبلات ألفا الأدرينرجية في هذه البنية العضلية.



3.10⁻⁵ 10⁻⁵ 3.10⁻⁶ 10⁻⁶ 3.10⁻⁷ 10⁻⁷ 3.10⁻⁸ 10⁻⁸ N
A - الألياف عضلية شاهدة.

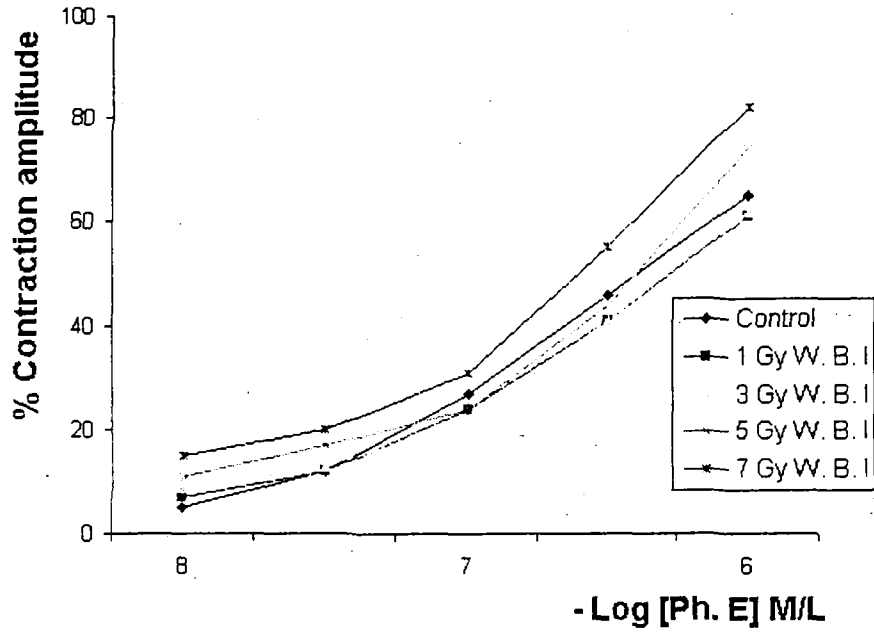


3.10⁻⁵ 10⁻⁵ 3.10⁻⁶ 10⁻⁶ 3.10⁻⁷ 10⁻⁷ 3.10⁻⁸ 10⁻⁸ N
B - الألياف عضلية مشعة بجرعة 3 Gy.

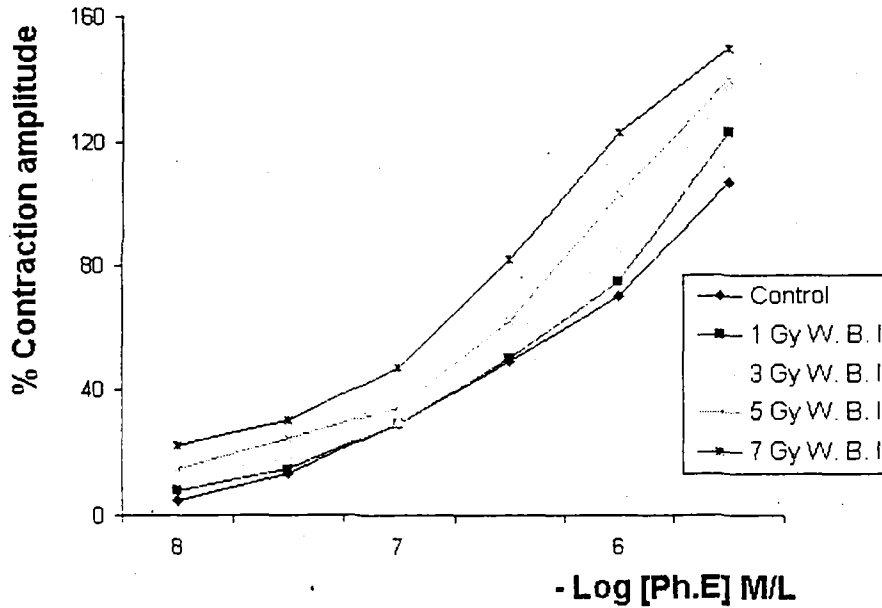


3.10⁻⁵ 10⁻⁵ 3.10⁻⁶ 10⁻⁶ 3.10⁻⁷ 10⁻⁷ 3.10⁻⁸ 10⁻⁸ N
C - الألياف عضلية مشعة بجرعة 7 Gy.

الشكل (7): تزايد شدة تقلص الألياف العضلية الشاهدة A والمشعة B و C بتأثير التراكيز المتزايدة (M/L) من الفينيل افرين. يلاحظ حدوث التقلص الأعظمي بالتركيز 3.10^{-6} M/L كما يلاحظ زيادة شدة التقلصات العضلية في الألياف المشعة (منسوبة إلى شدة تقلص هذه الألياف في المحلول العادي N) طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة. يشير السهم إلى جهة التسجيل.



الشكل (8): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة إلى التأثير الأعظمي) بدلالة تغيرات تراكيز الفينيل أفرين (M/L) على الألياف العضلية الشاهدة والمشعة. حيث نلاحظ ازدياد حساسية المستقبلات الأدرينرجية Adrenergic receptors المتمثلة بزيادة شدة التقلص العضلي طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة.



الشكل (9): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة تقلص الألياف العضلية (منسوبة إلى شدة تقلص هذه الألياف في المحلول العادي N) بدلالة تغيرات تراكيز الفينيل أفرين (M/L) في الألياف الشاهدة والمشعة. حيث نلاحظ بوضوح ازدياد حساسية المستقبلات الأدرينرجية Adrenergic receptors المتمثلة بزيادة شدة التقلص العضلي طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة.

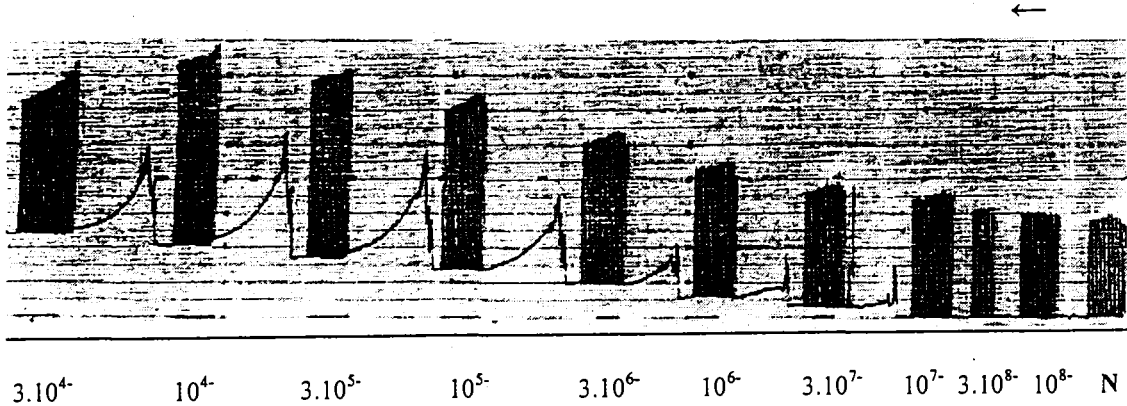
3-5- الاستيل كولين Acetylcholine:

نفس البروتوكول الموصوف سابقاً تم اعتماده بالنسبة للاستيل كولين.

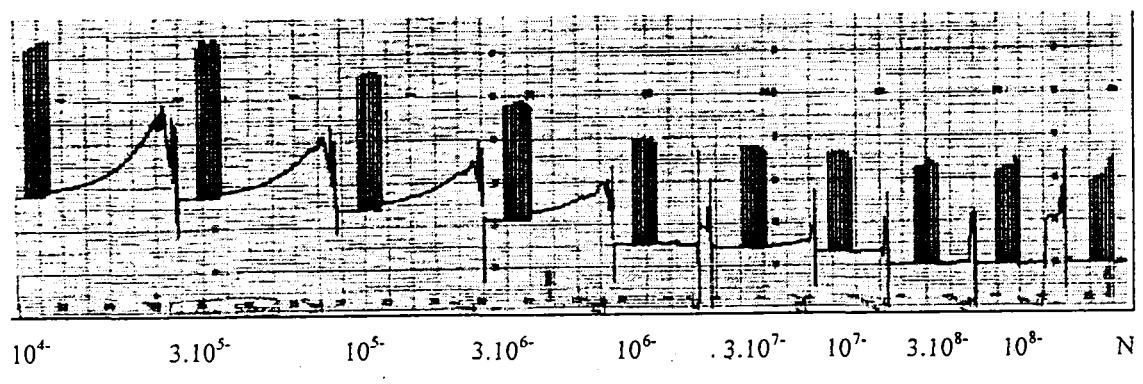
يلاحظ أن الاستيل كولين يحرض على زيادة شدة التقلصات العضلية للألياف العضلية الشاهدة اعتباراً من التركيز $3 \cdot 10^{-8}$ M/L وتكون هذه الزيادة طردية مع تركيز الاستيل كولين حتى تصل إلى التأثير الأعظمي للاستيل كولين بالتركيز 10^{-4} M/L (الشكل A - 10). وكما في الفينيل افرين نلاحظ أن ردود الفعل التقلصية المحرصة بالاستيل كولين على الألياف العضلية المشععة تزداد بزيادة الجرعة الإشعاعية المستخدمة حيث يتم التحريض على زيادة شدة التقلص العضلي بدءاً من التركيز 10^{-8} M/L (أخفض من الشاهد) حتى تصل إلى التأثير الأعظمي بتركيز $3 \cdot 10^{-5}$ M/L على الألياف المشععة بجرعة 3, 5, 7 غري مقارنة مع التركيز 10^{-4} M/L في الألياف الشاهدة)، (الأشكال B - 10، C - 10، 11).

وبمقارنة الزيادة في شدة التقلصات التي حصلنا عليها بالزيادة التراكمية لتركيز الاستيل كولين مع شدة التقلص للألياف العضلية بالمحلول العادي N، نلاحظ بوضوح أن التشعيع يزيد من شدة التقلص العضلي بشكل متناسب طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة. ففي الألياف العضلية الشاهدة نلاحظ أن شدة التقلص تزداد تدريجياً حتى تصل نسبة الزيادة في شدة التقلص، في التركيز $3 \cdot 10^{-5}$ M/L (الذي يسبب حدوث التأثير الأعظمي في الألياف المشععة بالجرعة 3, 5, 7Gy)، إلى ما يقارب 100 % من شدة التقلص للألياف في المحلول العادي أي ضعف شدة التقلص في المحلول العادي. ونلاحظ أنه لم يحدث أي تغيير يذكر في شدة التقلص في الألياف المشععة بجرعة 1Gy. في حين تزداد شدة التقلص هذه طرداً مع الجرعات الإشعاعية الأخرى حتى تصل في الألياف المشععة بجرعة 7Gy إلى حوالي 260 % أي أكثر من ضعف شدة التقلص (الشكل 13).

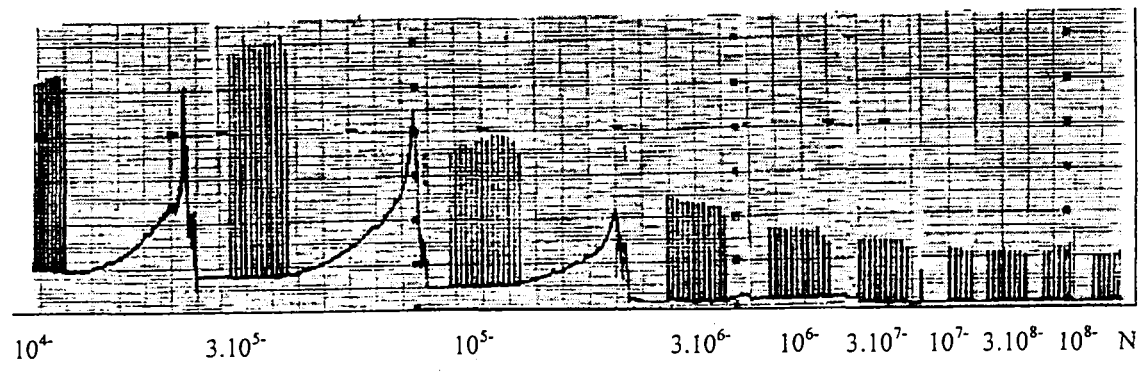
وعند إضافة الأتروبين Atropine، الذي يثبط بشكل اصطفائي المستقبلات المسكارينية الكولينرجية دون المستقبلات النيكوتينية الكولينرجية، إلى جانب الاستيل كولين بتركيز من رتبة 10^{-6} M/L نلاحظ عدم حدوث زيادة في شدة تقلص الألياف العضلية اطلاقاً مهما زاد تركيز الاستيل كولين في الوسط مما يدل على أن تأثير الاستيل كولين يتم بتنشيط المستقبلات الكولينرجية المسكارينية M Cholinergic Reseptors (شكل 11).



A - الألياف عضلية شاهدة.

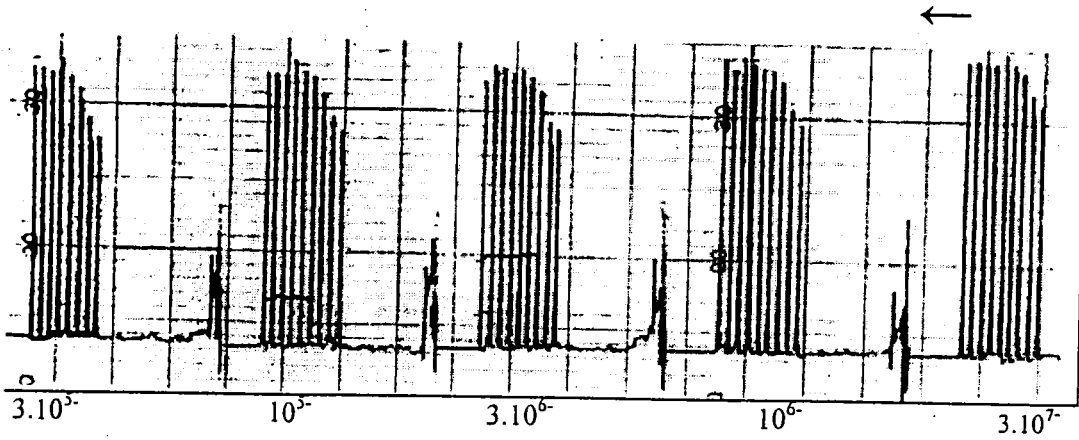
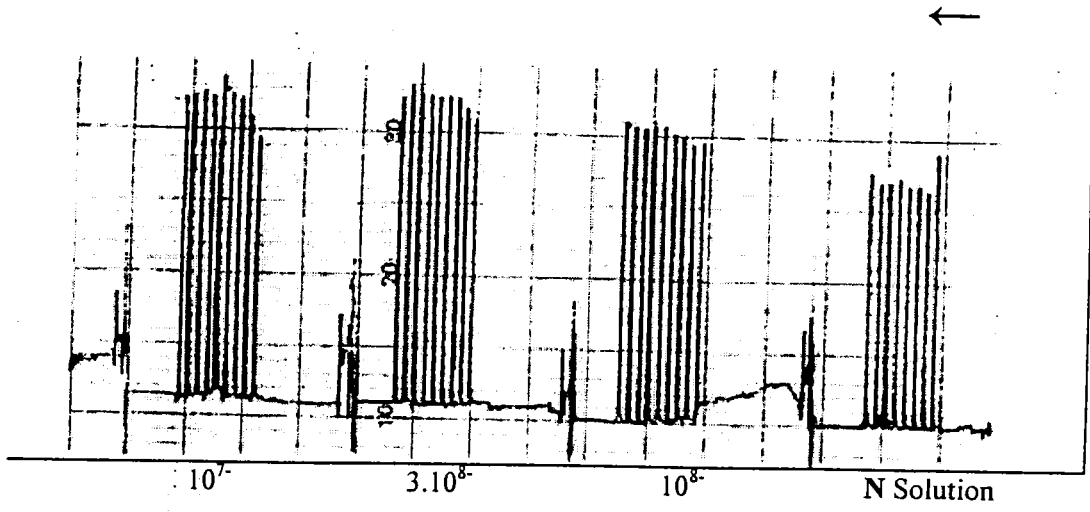


B - الألياف عضلية مشععة بجرعة 5 Gy.

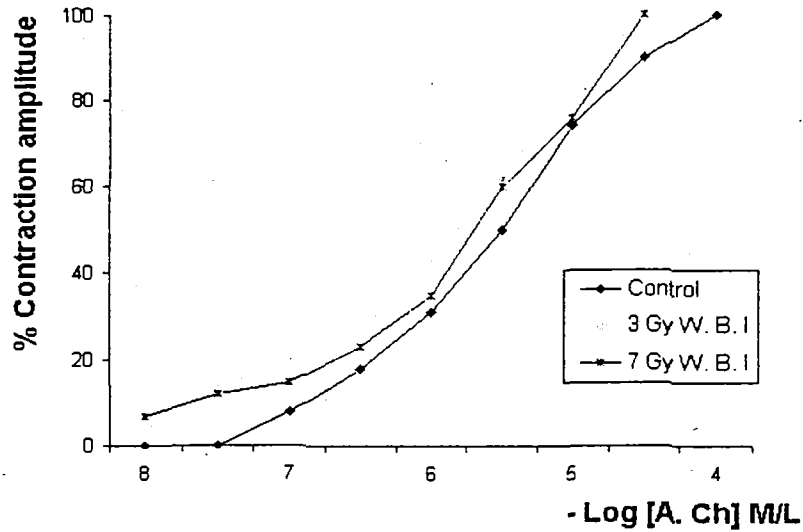


C - الألياف عضلية مشععة بجرعة 7 Gy.

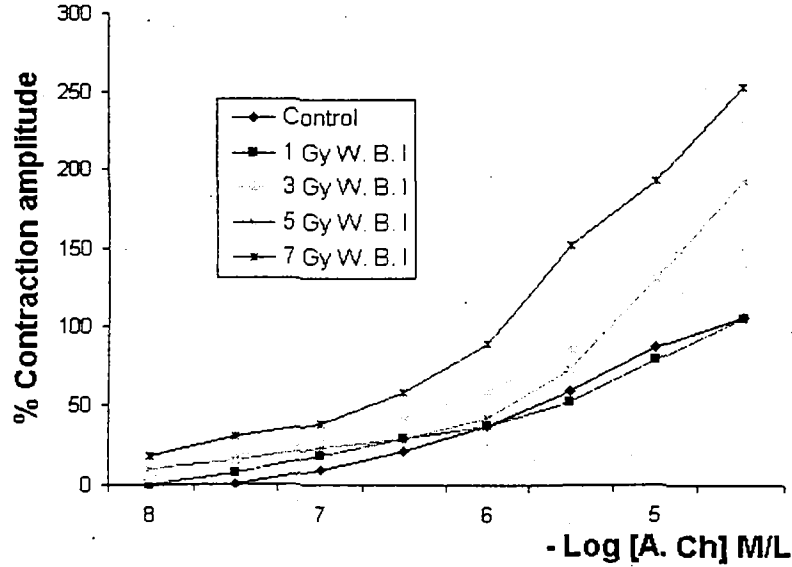
الشكل (10): تزايد شدة تقلص الألياف العضلية الشاهدة A والمشععة B و C بتأثير التراكيز المتزايدة (M/L) من الأستيل كولين. يلاحظ حدوث التأثير الأعظمي بالتركيز 10^4 M/L في الألياف الشاهدة A وحدثه بالتركيز 3.10^5 M/L في الألياف المشععة B و C كما يلاحظ ازدياد شدة التقلص (منسوبة إلى شدة التقلص في المحلول العادي N) طرداً مع مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة. يشير السهم إلى جهة التسجيل.



الشكل (11): تثبيط المستقبلات الكولينرجية من النمط المسكاريني M بوجود الأتروبين (10^{-6} M/L) الذي يثبط بشكل اصطفائي المستقبلات المسكارينية الكولينرجية. نلاحظ عدم حدوث زيادة في شدة التقلص مهما ازداد تركيز الأستيل كولين (M/L) في الوسط مما يدل أن تأثير الأستيل كولين يتم بتنشيط المستقبلات المسكارينية الكولينرجية M cholinergic receptors. يشير السهم إلى جهة التسجيل.



الشكل (12): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة إلى الشدة الأعظمية) بدلالة تغيرات تراكيز الأستيل كولين في الألياف الشاهدة والمشعة. نلاحظ ازدياد حساسية المستقبلات الكولينرجية المتمثلة بزيادة شدة التقلص العضلي طرداً مع الجرعة الإشعاعية المستخدمة. و نلاحظ إنزياح أثر الأستيل كولين بتأثير التشعيع حيث نحصل على التأثير الأعظمي بالتركيز 3.10^{-5} M/L في الألياف المشعة بالجرعة 3 و 7 غري مقارنة مع التركيز 10^{-4} M/L في الألياف الشاهدة. كما يتم التحريض على زيادة شدة التقلص بدءاً من التركيز 10^{-8} M/L في الألياف المشعة مقارنة مع التركيز 3.10^{-8} M/L في الألياف الشاهدة.



الشكل (13): تمثيل بياني نصف لوغاريتمي لتغيرات شدة التقلص العضلي (منسوبة إلى شدة التقلص في المحلول العادي N) بدلالة تغيرات تراكيز الأستيل كولين في الألياف الشاهدة والمشعة. نلاحظ ازدياد حساسية المستقبلات الكولينرجية المتمثلة بزيادة شدة التقلص العضلي طرداً مع الجرعة الإشعاعية المستخدمة كما يلاحظ عدم وجود فروق كبيرة في تقلص الألياف العضلية الشاهدة و المشعة بجرعة 1 Gy.

6- المناقشة:

لقد أوضحت أعمال سيدني رينجر SIDNEY RINGER عام 1883 أهمية الكالسيوم الأيوني Ca^{2+} في الوظائف الفيزيولوجية النسيجية والخلوية، ومنذ ذلك الوقت أصبح الكالسيوم عنصراً أساسياً في تركيب المحاليل الملحية الفيزيولوجية المختلفة المعروفة حتى أيامنا هذه، فقد أظهرت الأبحاث والدراسات الفيزيولوجية الغزيرة الدور الوظيفي الحاسم الذي يلعبه الكالسيوم Ca^{2+} في كافة الفعاليات والوظائف الخلوية بدءاً من الإلقاح، الانقسام والتمايز الخلوي، التصاق الخلايا Adhesion، النمو والانقسام، الحركة والتقلص وحتى الإفراز الخ. هذا بالإضافة لدور الكالسيوم التنظيمي Regulatory Role في الجمل البيولوجية وذلك في الظروف الفيزيولوجية الطبيعية RINGER (1883), in DEDMAN and KEATZEL(1998), ASHCROFT(2000). ومن جهة أخرى كشفت الأبحاث أن الكالسيوم الأيوني مهم جداً في باثولوجيا عدد كبير من الأمراض وخصوصاً في الجملة العصبية والعضلية المتقلصة حيث يلعب الكالسيوم دوراً جوهرياً في التقلص العضلي وتحرير الوسائط العصبية Neurotransmitters.

وظيفياً وعلى مستوى نقل الإشارة Signal transduction، ينفرد الكالسيوم بكونه مرسال ثاني ضمن خلوي، ويتميز عن غيره من المواد التي تلعب دور المرسال الخلوي الثاني Intracellular Second Messengers والتي هي في الحقيقة مركبات استقلابية وسيطة كالنكليوتيدات الحلقية (مثل AMP^C ، GMP^C ، الخ)، أو فوسفات الإينوزيتول IP_3 (Inositol Phosphates) أو الادي أسيل غليسروول (Diacylglycerol DAG)،

. TRIGGLE(1990), DEDMAN and KEATZEL (1998)

فالكالسيوم يتميز بالإضافة لكونه عنصراً لا يتحول لأي شكل كيميائي غير شحنته الثنائية Divalent بأنه يختلف عن غيره من الأيونات الأساسية الهامة كالصوديوم Na^+ و البوتاسيوم K^+ التي تلعب الدور الجوهري في كمونات العمل وخاصية التثبيته، أو المغنزيوم Mg^{2+} والزنك Zn^{2+} التي تدخل في عمل الأنزيمات كعوامل مساعدة Cofactors. وفي الحقيقة فإن الكالسيوم Ca^{2+} لا يلعب دوراً في كمون الغشاء Membrane Potential، فحذف الكالسيوم من المحلول الفيزيولوجي لا يعدل ولا يؤثر في قيمة الـ MP بينما يثبط غياب التقلص العضلي بشكل هام

. FELETOU et al (1986), ALYA(1987), ALYA(1996)

ومن حقيقة ارتباط الكالسيوم Ca^{2+} واشترائه في مجموعة كبيرة ومتنوعة من الوظائف الخلوية، فإن هذا ولد الاهتمام بأن تثبيط أو حصر أحد ممراته أو الوظائف المرتبطة به يمكن أن يؤثر بوظائف وفعاليات ثانوية مرتبطة بتراكيز هذا الأيون الهام.

إن تركيز الكالسيوم الأيوني في الخلايا قليل جداً ومن رتبة $10^{-7} M$ ($0.1 \mu M$) قياساً لتركيزه الخارجي $[Ca^{2+}]_o$ الذي هو من رتبة $1 mM - 2 mM$ أو أكثر وتستطيع الخلايا المحافظة على ممال التركيز هذا بأليات متعددة (BERRIDGE 1990) :

- فالغشاء السيتوبلازمي يعتبر نسبياً غير نفوذ للكالسيوم ويحوي مضخات كالسيوم مرتبطة بصرف الـ (ATP) pumps, Ca^{2+} -driven ATP ومبادلات أيونية Ca^{2+}/Na^+ .
- والشبكة السيتوبلازمية الداخلية تحجز داخلها أيضاً جزءاً من الكالسيوم الداخلي أيضاً بواسطة مضخات أيونية مرتبطة بصرف الطاقة ATP.
- وعند ارتفاع تراكيز الكالسيوم الداخلي $[Ca^{2+}]_i$ فإن الجهاز الكوندري يستطيع حجز وتخزين كميات من الكالسيوم على شكل معقدات.

في العديد من الأنماط الخلوية وضمن الشروط الفيزيولوجية الطبيعية يرافق تنبيه الخلية بعوامل متنوعة ارتفاع مؤقت للكالسيوم الداخلي ولمدة تستمر بين جزء من الثانية حتى دقائق حسب النمط الخلوي ويعتبر ارتفاع الكالسيوم الداخلي المفتاح لإنجاز الخلية الوظائف المختلفة ويتحقق ذلك عن طريق تنشيط قنوات أيونية متخصصة Ca^{2+} -channels التي تقسم - كما ذكرنا سابقاً - إلى نمطين من القنوات الشاردية هي القنوات POC (Potential Operating Channel) والقنوات ROC (Receptor Operated Channel).

إن تجاربنا على الألياف العضلية المشعة تؤكد أن التشعيع يؤدي إلى تنشيط القنوات الأيونية من النمط POC (Potential Operating Channel) مما يؤدي إلى حدوث زيادة في قيمة تيار الكالسيوم الداخل Ca^{2+} influx باتجاه السيتوبلازما الخلوية لرفع $[Ca^{2+}]_i$. وتأتي نتائج تجاربنا منسجمة مع الدراسات البيولوجية الإشعاعية الأخرى حول أثر التشعيع على النفاذية الغشائية للألياف العضلية الملساء الوعائية للأوعية الدموية بشكل عام والأوعية الشعرية بشكل خاص. فقد أكدت دراسات Eassa *et al* عام 1973 أن النفاذية الغشائية permeability تزداد بشكل طردي مع زيادة الجرعة الإشعاعية المستخدمة وإن جرعة 4-5 غري لها تأثير واضح على زيادة نفاذية الغشاء على أن هذه الزيادة في النفاذية تكون أعظمية في الساعات الأولى من التشعيع وتميل للنقصان بعد بضعة أيام من التشعيع. كما أن دراسات Alya 1996 تؤكد زيادة النفاذية الغشائية للألياف العضلية الملساء الوعائية للوريد الباطني الكبدي طرداً مع جرعة التشعيع المستخدمة.

لكن نلاحظ هنا (في الألياف المعزولة من القناة الناقلة للنطاف) أن التشعيع لايسبب اي إنزياح في تأثير الكالسيوم الخارجي على شدة النقص العضلي وبمعنى آخر أن التأثير الأعظمي الذي نحصل عليه بالتركيز $10 mM/L$ في الألياف الشاهدة لا يحدث بتراكيز أقل في الألياف المشعة مهما زاد

مقدار الجرعة الإشعاعية المستخدمة خلافاً لما هو عليه في الألياف العضلية الملساء الوعائية التي لوحظ فيها أن التأثير الأعظمي للكالسيوم يحدث في الألياف المشععة بجرعة 2 غري وما فوق بالتركيز 5 mM/L (Alya 1996). وهذا يدل حتماً على أن الألياف العضلية الملساء في القناة الناقلة للنطاف تتأثر بشكل ضعيف بالتشعيع أي أنها ذات حساسية ضعيفة للأشعة المؤينة مقارنة مع الألياف العضلية الملساء الوعائية. وقد يكون الأمر غير مستغرب عملياً إذ أن أنماط النسيج المختلفة في الجسم يبدي كل منها حساسية مختلفة تجاه الأشعة المؤينة نظراً لاختلاف الطبيعة البنيوية والوظيفية المميزة لكل منها.

ومن المحتمل أن يؤثر التشعيع على تحرير الكالسيوم من المخازن الداخلية وبالتالي رفع تركيز الكالسيوم الداخلي $[Ca^{2+}]_i$ ، وهذا التأثير مستبعد على الألياف العضلية الملساء. فمن المعروف حالياً أن الألياف العضلية الملساء بشكل عام فقيرة بمخازن الكالسيوم الداخلي الممثلة بالشبكة السيتوبلاسمية العضلية الداخلية sarcoplasmic reticulum. حيث أن الخلايا العضلية الملساء لاتحوي شبكة سيتوبلاسمية عضلية نموذجية قادرة على تخزين الكالسيوم وتحريره، فهي تعتمد في تقلصها بشكل كبير على الكالسيوم الخارجي (Copenhagen Medical publishers 1999-2000). وهذه النتيجة تؤكدها تجربتنا حيث وجدنا أنه بغياب الكالسيوم Ca^{2+} free solution يصبح الليف العضلي الأملس خاملاً Quiescent ولا يظهر أي تقلص ولا يبدي أي استجابة تجاه المنبه المستخدم.

ومعروف حالياً أنه من أهم تأثيرات الأشعة المؤينة على المستوى الخلوي تلك التي تتناول الفوسفوليبيدات واستقلابها والتي تقود بشكل منطقي لظاهرة أكسدة الفوسفوليبيدات في الغشاء الخلوي مما يبديل بدرجات تتعلق بمقدار الجرعة الإشعاعية في بنية هذه الليبيدات، وهذا يقود لخلخلة التبادل الأيوني عبر الغشاء، Vojsitsky 1988.

تستخدم المستقبلات الخلوية الغشائية في نقل الإشارة signal transduction البروتين - G - ويرتبط تنشيط هذا البروتين بارتباط المنبه الكولينرجي أو الأدرينرجي على المستقبل النوعي الخاص، يقود هذا الارتباط النوعي وتشكيل المعقد مستقبل - ربيطة agonist-receptor إلى تنشيط أنزيم هام هو الأدينيلات سيكلاز Adenylate Cyclase وهذا الأنزيم معروف بأنه يتوسط التفاعل الحيوي في إمامة الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP، وهذا بالمحصلة يعمل على رفع تركيز الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP. وتقود زيادة $[cAMP]_i$ بشكل مباشر إلى تنشيط البروتين كيناز - C (PKC) وفي المحصلة يؤدي إلى فسفرة البروتينات الداخلية المرتبطة برد الفعل الخلوي وذلك حسب نوع الخلية (تقلص، إفراز، نقل إشارة، الخ).

والفينيل إفرين Phenylephrine كبقية المواد الفارماكولوجية الأدرينرجية يؤثر على المستقبلات الأدرينرجية من النمط $\alpha_1 < \alpha_2$. حيث تتضح هنا زيادة حساسية المستقبلات الأدرينرجية بزيادة أثر العقاقير الأدرينرجية على الفعالية التقلصية للألياف العضلية المشعة المتمثلة بزيادة شدة التقلص العضلي. وبذلك يمكن الافتراض أن التشعيع إضافة لأنه يؤدي إلى حدوث تبدلات بنيوية في الغشاء الخلوي فإنه يقود إلى تنشيط تدفق الكالسيوم عن طريق القنوات الأيونية من النمط ROC التي يرتبط عملها بتنشيط المستقبلات الغشائية. وبالتالي فإن التشعيع ينشط القنوات الأيونية التي يرتبط تنشيطها بتنشيط المستقبلات الأدرينرجية.

بالنسبة للأستيل كولين Acetylcholine فإنه يحرض على زيادة شدة التقلص العضلي بتنشيط المستقبلات المسكارينية. حيث أوضحنا في هذه التجربة أن استخدام الأتروبين Atropine بتركيز من رتبة 10^{-6} مول/لتر يلغي بشكل كامل أي أثر للأستيل كولين على زيادة شدة التقلص العضلي للألياف العضلية الملساء المعزولة من القناة الناقلة للنطاف مهما زاد تركيزه في الوسط. فالأستيل كولين يحرض على زيادة شدة التقلصات العضلية بشكل مشابه للعقاقير الأدرينرجية. حيث أن تنشيط المستقبلات الكولينرجية ينشط عمل القنوات الأيونية ROC ويزيد من تدفق تيار الكالسيوم الداخل Ca^{2+} influx في الظروف الفيزيولوجية الطبيعية، ونلاحظ تنشيط هذه الآلية بالتشعيع. بمعنى أن التشعيع يزيد من حساسية المستقبلات الكولينرجية التي يتطلب تنشيطها تركيزاً أدنى لتعطي نفس الأثر.

وبمقارنة تأثير التشعيع على المستقبلات الأدرينرجية والكولينرجية في العضلات الملساء الوعائية ذاتية التقلص (الوريد البابي الكبدي (venae portal hepatica) والعضلات الملساء غير الوعائية غير ذاتية التقلص (القناة الناقلة للنطاف (vas deferens) نلاحظ في المستقبلات الأدرينرجية أن التشعيع يعمل على زيادة حساسية هذه المستقبلات في كلا البنيتين العضليتين لكن هذه الحساسية تكون أقل في العضلات الملساء المعزولة من القناة الناقلة للنطاف. حيث نلاحظ أن أثر التشعيع يتجلى فقط بزيادة شدة التقلص العضلي دون حدوث أي إنزياح بتأثير العقاقير الأدرينرجية. أما في المستقبلات الكولينرجية نلاحظ أن التشعيع هنا يزيد أيضاً من حساسية هذه المستقبلات على عكس ماتم ملاحظته في العضلات الملساء الوعائية التي يُضعف فيها التشعيع حساسية هذه المستقبلات تجاه التراكيز المتزايدة من العقاقير الكولينرجية. وبالتالي نلاحظ وجود فروق معنوية هامة في الحساسية الإشعاعية للمستقبلات الأدرينرجية والكولينرجية في الأنماط النسيجية المختلفة. الأمر الذي يحث على إجراء مزيد من الدراسات لتعميق معرفتنا في فروقات الحساسية الإشعاعية في أنماط النسيج المختلفة.

7 - كلمة شكر:

نتوجه بالشكر الجزيل للسيد الدكتور ابراهيم عثمان المدير العام لهيئة الطاقة الذرية لدعمه الكبير للأبحاث في مجال البيولوجيا الإشعاعية، كما نشكر كل من ساهم في إنجاز هذا العمل، وعلى الأخص السيدة هيفاء هنيدي لمساعدتها في كافة الأعمال المخبرية اللازمة، والسيدان أيمن خربوطلي وجهاد أحمد، عضوي الهيئة المخبرية، القائمين على حظيرة الحيوانات المخبرية لمساعدتهم الكبيرة في تأمين الحيوانات المخبرية اللازمة. وننقدم بالشكر أيضاً إلى كل من السيدان مازن نصار وعدنان داوود، من المخبر العياري الثانوي في قسم الوقاية الإشعاعية والأمان النووي، لمساعدتهم في عمليات تشعيع الحيوانات وحساب الجرعة الإشعاعية في كل عملية تشعيع.

8-References:

8-المراجع

1- Alya. G (1987)

Etude in vitro de l'activité électrique et mécanique de la fibre musculaire lisse de la veine porte de rat. Aspects ioniques et pharmacologiques.

Doct. Thesis, No – ordre 52, Univ. Poitiers- FRANCE.

2 - Alya. G (1996)

Modification of vascular smooth muscles contractions induced by gamma rays. A. E. C. S – B/FRSR 110. PP: 39 – 42.

3 - Alya. G (1999)

Activation of vascular cholinergic and adrenergic receptors induced by gamma rays. A. E. C. S - B/FRSR 195. PP: 3 – 34.

4 - ASHCROFT. F. M, (2000)

Voltage gated Ca^{+2} channels.

In: Ion channels and diseases, Chap: 9, PP: 161 – 183.

Edr: Academic press. USA, (2000).

5 - BERRIDGE. M. J, (1990)

Calcium oscillations.

J. Biol. Chem. Vol: 264, PP: 9583 – 9586.

6 - DEDMAN. J. R, and KEATZEL. M. A, (1998)

Calcium as an intracellular second messenger: Mediation by calcium binding proteins.

In: Cell physiology–source book, second edition edited by SPERELAKIS.

N, Academic press.

Chap: 9, PP: 132 – 141.

7 - Doggrell, S. A. (1981)

Prazosin selectively inhabits the responses to field stimulation in the rat vas deferens.

Europ. J. Pharmacol., 71, PP 447- 453.

8 - Eassa. H. M. E, and Casarett. G (1973).

Effect of (EACA) epsilon amino caproic acid on radiation-induced increase in capillary permeability.

Radiobiology. 106, PP: 675-688.

9 - Feletou M, Alya G, Walden. M, and Tricoche. R, (1986)

Source of Calcium and cholinergic contraction of the rat portal vein and the sheep coronary artery.

Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 283, N: 2, PP: 254-271.

10 – Gaulfield, M (1993)

Muscarinic receptors: characterisation, function and coupling.

Pharmacol. Ther. 58, PP: 319 – 381.

11 - HERMSMEYER. K, (1998)

Smooth muscle Action Potentials.

In: Cell physiology, source book, second edition edited by SPERELAKIS.

N, Academic press.

Chap – 52, PP: 791 – 804.

12 – Jean-Pierre Bourreau (1986)

Modalites d'action "in vitro" d'un nouvel antihypertenseur agoniste alpha-2 adrenergique, le S-3341 ou [(Dicyclopropylmethyl) amino] – 2 delta 2 – oxazoline, sur l'activite contractile de structures musculaires lisses.

Chap – III, PP: 41 – 54.

13 – Joe DiMicco (2002)

Medical Pharmacology: Review of The Autonomic Nervous System and
Introduction to Autonomic Pharmacology.

MS A419 274-1571

e-mail: jdimicco@iupui.edu

14 - L. V. Berdysheva (1996)

Effect of extracellular Na⁺ on the α 1-adrenergic contractile response of the
rat deferent duct.

Danbio 2_97p119abs.

15 - Omu AE, Al-Bader AA, Dashti H, Oriowo MA. (2001)

Effect of extracellular Mg concentration on electrically induced
contractions of rat vas deferens in vitro.

PMID: 11339640 [pub Med – indexed for MEDLINE].

16 - Poul – Erik Paulev, M. D., D. Sci

Online medical textbook in

Medical physiology and pathophysiology

Essentials and clinical problems

Copenhagen Medical Publishers 1999 - 2000. ISBN 87- 984078-0-5

Chapter 2: Muscle cells and disorders.

17 - RINGER. S. (1883)

A further contribution regarding the influence of the different constituents
of the blood on the contraction of the heart.

J. Physiol. Vol: 4, PP: 29 – 43.

18 - Triggle. D. J (1990).

Calcium: The control of a charismatic cation.

In: Calcium channel modulators in heart and smooth muscle. Basic
mechanisms and pharmacological aspects.

G. Amital and S. Abraham. Edrs: PP: 1-13.

19 - Vojtsitsky. J. V. M, (1994)

Ion permeability of sarcoplasmic reticulum membranes after X-irradiation.
Radiobiologiya, 28, 3, PP: 314-317.

20 - Watson. S, and Arkininstall. S, (1994).

The G-protein linked receptor.

Factsbook. Chap: 1, Acetylcholine, PP: 7-18.

Academic press. Harcourt. B and company publishers. 1994