EG9601678

Effects of Gamma Rays on Rat Vascular Smooth Muscle Fibers

Ghassan Alya
Radio-Biology and Health dept. Syrian Atomic Energy Commission, SYRIA

Abstract

Modifications of the Vasomotoricity induced by gamma rays have been investigated. Vascular smooth muscle fibers (VSMF) of rat portal vein have been used in this study.
Irradiation procedures using a ^{60}Co source have been carried out as follows:
- Whole body irradiation.
- Irradiation of isolated portal vein and of isolated VSMF.
Our results show that:
1- irradiation reduces the functional competition between Mg^{2+} and Ca^{2+}, thus hypermagnesic Krebs solutions have a negligeable effect on irradiated VSMF.
2- irradiation activates Ca^{2+} influx into the VSMF. Thus the effect of hypocalcemic solutions on irradiated VSMF is minor compared with control.
3-Hyperpotassic solutions provoke tetanic contractions with high amplitude on the irradiated VSMF compared with control.

خلاصة

في اطار دراسة تبدلات المقوية العضلية الوعائية بتأثير أشعة جاما تم اجراء دراسة على ألياف عضلية وعائية معزولة من الوريد البابي الكبدي للجرذ، البروتوكول المعتمد في التشعيع (باستخدام منبع ^{60}CO) :
- تشعيع كامل الجسم بتدوير الحيوان ببطء أثناء التشعيع،
- تشعيع الوريد كاملا،
- تشعيع ألياف عضلية معزولة.
أظهرت نتائج التجارب أن :
1 - التشعيع يضعف التنافس الوظيفي بين الكالسيوم والمغنسيوم ويلاحظ

ضعف تأثير المحاليل عالية تراكيز المغنسيوم على الالياف العضلية المشعة.

2 ـ التشعيع يؤدي الى تنشيط دخول الكالسيوم للخلية العضلية الوعائية، فالمحاليل الفقيرة بالكالسيوم تأثيرها أقل على الالياف المشعة.

3 ـ ظاهرة تنشيط حركة الكالسيوم تؤكدها شدة التقلصات الكزازية التي تحرضها محاليل عالية تراكيز البوتاسيوم على الألياف العضلية المشعة مقارنة مع الشاهدة.

مقدمة :

إن الأبحاث الفيزيولوجية الأساسية في البيولوجيا الاشعاعية والتي تناولت دراسة آلية تأثير الأشعة المؤينة بمختلف أنواعها على المستوى الخلوي قليلة جدا إذا ما قورنت مع الدراسات والابحاث التطبيقية لاستخدامات الأشعة المؤينة في مجالات متعددة سواء منها الزراعية أو الغذائية أو الطبية الخ، ومع ذلك فان جزءا لابأس به من الدراسات البيولوجية الاشعاعية أجريت على عضلات ملساء عموما ووعائية بشكل أخص وذلك للأهمية المتزايدة للجملة الوعائية الناجمة عن التزايد المطرد للأمراض القلبية الوعائية.

إن تقلصات الألياف العضلية الملساء الوعائية "Vascular Smooth Muscle Fibers" هي العملية الأساسية والجوهرية التي من خلالها تساهم الأوعية الدموية باختلاف أنواعها وتموضعها في الجملة الدورانية وذلك بردود فعل واستجابات تفرضها وظيفتها الفيزيولوجية الطبيعية. تتبدل هذه التقلصات العضلية الوعائية بشكل لحظي ومستمر عند اختلاف الشروط الفيزيولوجية الطبيعية وعند التغييرات الهرمونية والايونية في الوسط الخارجي وكذلك في الظروف المرضية بشكل تبقى الأوعية الدموية تلعب دورا هاما في المحافظة على ضغط دموي معتدل ومستقر [1]. إن تنظيم تقلصات الألياف العضلية الملساء وتحديد درجة وقوة هذه التقلصات يعتمد بشكل كبير على تراكيز الكالسيوم الايوني في الوسط الخارجي $[Ca^{2+}]O$ والفرق بينه وبين تركيز الكالسيوم الايوني الداخلي أو السيتوبلاسمي $[Ca^{2+}]i$ أكبر من 10^{-7} M ويصل إلى حده الأعظمي أو ما يسمى بالتقلص الكزازي عندما يصبح تركيز $[Ca^{2+}]i$ بحدود 10^{-5}M [2] ، ويلعب المغنسيوم الايوني في الوسط الخارجي $[Mg^{+2}]O$ دورا هاما جدا في حركية الكالسيوم عبر الغشاء الخلوي كما أن للتنافس الوظيفي بين الكالسيوم والمغنسيوم أهمية كبيرة في الامراض الوعائية [4، 3]. هذا وتجدر الاشارة إلى أن الابحاث التي تناولت تأثير الأشعة المؤينة على الجهة الوعائية وعلى الضغط الدموي كانت دراسات مورفولوجية واحصائية حيث بدأ بدراسة تأثير التشعيع على تبادلات الضغط الدموي على الحيوانات المخبرية [5]، وتلا ذلك دراسات كثيرة حول تأثير

التشعيع على التدفق الدموي في بعض الدورات الجزئية كالدورة المسارقية وأظهرت أن التشعيع يخفف من ردود الفعل الوعائية تجاه المواد القابضة الوعائية "Vasocostrictors" [6] ونذكر أيضا الابحاث التي أجريت لتحديد الأذى الوعائي اللاحق للتشعيع، وخصوصا بجرعات عالية، إن ما يمكن أن نخلص إليه من جميع هذه الابحاث هو أن التشعيع يؤدي الى تبدل هام في نفاذية الغشاء الخلوي وخصوصا في الأوعية الشعرية الدقيقة "Capillary" [7].

ومن أجل دراسة تبدلات نفوذية الغشاء الخلوي للأيونات المختلفة فان هذا البحث باستخدام ألياف عضلية مأخوذة من الوريد البابي الكبدي من حيوانات مشععة يأتي لمعرفة أثر الأشعة جاما على نفوذ الايونات المختلفة ومعرفة أثر التشعيع بجرعات متوسطة على حركية الايونات المختلفة الأساسية (Ca^{+2}, Mg^{+2}, K^{+}) وهي مرحلة أولى يليها مستقبلا بحث متمم يتناول أثر التشعيع بالجرعات المستخدمة في هذه الدراسة على تنشيط بعض المستقبلات الخلوية وبالاخص المستقبلات الكولينرجية Cholinergic والادرينرجية بأنواعها Adrenoceptors.

المواد والطرائق :

استخدمت في الدراسة جرذان ذكور البينو من سلالة ويستار "Wistar Strain" بوزن وسطي 200 غرام. وتم التشعيع باستخدام منبع ^{60}Co وذلك باستخدام آلية صممت خصيصا لتدوير الحيوان ببطء أثناء تشعيع كامل الجسم (تصميم قسم الوقاية والأمان النووي).

ـ تحضير عينات الألياف العضلية :

يقتل الحيوان بضربة على الرأس ثم يقطع المذبح ويترك لينزف معظم الدم، يفتح البطن ويستأصل الوريد البابي الكبدي، تنزع القميص الضامة Adventice تحت المجهر وتعزل ألياف عضلية طولية بطول 3 ـ 4 مم وبقطر وسطي 500 ميكرون. باستخدام خيوط قطنية خاصة يربط الليف العضلي من نهايتيه ثم ينقل الى حوض تجريبي بحجم ثابت 20 مل ليتر لجهاز الأعضاء المعزولة Isolated System" (IOS) Organ" حيث يثبت طرف في الحوض ويعلق الطرف الآخر بحساس ناقل اهتزازات Transducer مربوط مع وحدة مغذية كهربائية 9V وتكبير خرج Output، التكبير يوصل مع راسمة حساسة Charge Recorder وذلك كون قوة شد التقلصات ضعيفة من رتبة 50 ـ 100 ملغ. أحواض التجريب للجهاز مغذاة بتيار ماء ساخن بحرارة 37°C.

ـ المحاليل الفيزيولوجية :

يستخدم في العمل سائل فيزيولوجي وهو كريبس المعدل KREBS ذي

التركيب الايوني التالي بالمل مول/ ليتر :

(NaCl: 120.8, KCl: 5.9, $CaCl_2$:2.5, $MgCl_2$: 1.25, NaH_2PO_4: 1.25, $NaHCO_3$: 1, Glucose : 11.5) يستخدم للمحافظة على الـ pH الموقي HEPES بتركيز 5mM/L ويثبت الـ pH على قيمة 7,5. تعاير حساسات القياس ويتم تقدير شدة التقلصات قبل كل تجربة. بعد وضع الالياف المعزولة في أحواض القياس تطبق عليها قوة شد بدائية ثم تترك لتتقلص ذاتيا لمدة 45 دقيقة قبل البدء بالتجربة كي تستقر تقلصاتها. ويستخدم طيلة التجربة غاز الكربوجين (CO_2: 5%, O_2:95%) من أجل تحليل نتائج تسجيل التقلصات يؤخذ بالحسبان ثلاثة معايير : شدة التقلص Amplitude بالملي غرام، تواتر التقلص (Frequency) والشد العضلي الأساسي Tone وتحدد النقاط التجريبية بـ Sm±.

ـ عمليات التشعيع :

البروتوكول المعتمد هو تشعيع كامل الجسم بمعدل جرعة 50 راد/ دقيقة بواسطة منبع ^{60}Co مع مراعاة تدوير بطيء للحيوان أثناء التشعيع لمجانسة الجرعة. اضافة لذلك أجريت تجارب تمهيدية بتشعيع الوريد البابي الكبدي كاملا معزولا "in vitro" في أنابيب اختبار وتشعيع الياف عضلية معزولة بعد اجراء الجراحة المجهرية عليها في سائل فيزيولوجي مبرد ومؤكسج سابقا.

النتـــائج :

1 ـ الوريد البابي الكبدي المعزول المشعع والألياف العضلية المعزولة المشععة "in vitro" :

لم تظهر تسجيلات تقلصات الألياف العضلية المشععة بعد عزلها، أي فروق معنوية بينها وبين تقلصات الألياف العضلية الشاهدة.

2 ـ الألياف العضلية المعزولة بعد تشعيع الحيوان (كامل الجسم) :

2 ـ 1. الكالسيوم Ca^{+2} :

بالنسبة للألياف العضلية الشاهدة فقد تم اختبار المحاليل التالية :

كريبس بدون كالسيوم (Ca^{2+}-free solution) 10mM, 5mM, 2.5mM, 1.25mM,

وتوضح التجارب شكل [1، 2] أن التقلصات العضلية الذاتية تتوقف نهائيا بغياب الكالسيوم وتعود الفعالية التقلصية مع إضافة الكالسيوم في المحلول، تستعيد الألياف العضلية حوالي 10 ـ 20٪ من قوة تقلصاتها ولكن بتواتر عالي، وتزداد قوة التقلص طردا مع زيادة الكالسيوم حتى تراكيز

قريبة من 10 مل مول حيث تثبط بعدها التقلصات العضلية أما على الألياف العضلية المشعة بجرعة 1غري فإن الفروق غير معنوية مقارنة مع الشاهد ويظهر تأثير التشعيع جليا بجرعة 2 غري، 5 غري حيث وكما على الألياف الشاهدة يثبط غياب الكالسيوم التقلصات العضلية، ولكن بتركيز 1.25 مل مول من الكالسيوم فإن الألياف العضلية تستعيد 50 ـ 75٪ من فعاليتها الذاتية ويظهر أن ازدياد الفعالية التقلصية بدلالة رفع تركيز الكالسيوم طرديا مع الجرعة وهذه الظاهرة عكوسة تماما فبعد العودة لمحلول عادي N فإن الألياف تستعيد فعاليتها التقلصية البدائية.

2 ـ 2. المغنسيوم Mg^{2+} :

تم اختبار التراكيز التالية من المغنسيوم : محلول كريبس بدون المغنسيوم (Mg^{2+}-free solution) 10mM, 5mM, 2.5mM, 1.25mM,0.5mM

على عكس الكالسيوم فإن غياب المغنسيوم يحرض على ازدياد شديد في الفعالية العضلية التقلصية، هذه الفعالية تتناقص تدريجيا برفع المغنسيوم حتى تركيز 5 مل مول/ ليتر حيث على الألياف الشاهدة يثبط المغنسيوم بهذا التركيز التقلصات العضلية شكل [3، 4]، أما على الألياف العضلية المشعة فإن تأثير رفع المغنسيوم يكون أقل وضوحا وتبقى الألياف تتقلص بشكل ذاتي في محاليل عالية التراكيز من المغنسيوم ويجب رفع التراكيز حتى 15 مل مول حتى تثبط الفعالية.

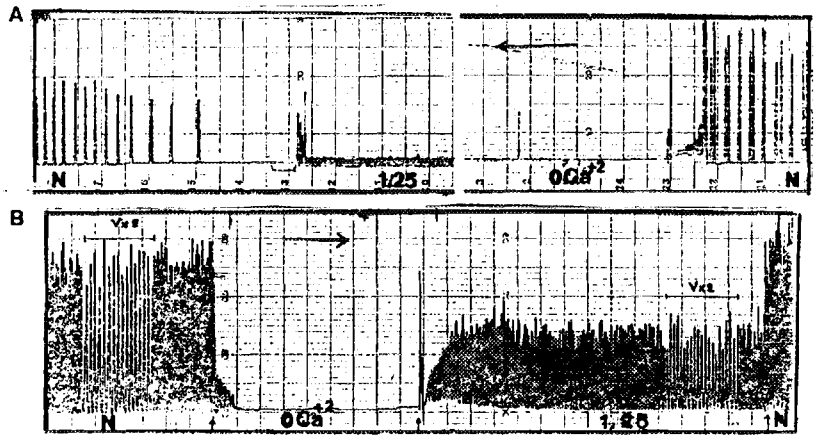
يلاحظ أن انخفاض الفعالية بدلالة رفع المغنيزيوم في المحلول تتناسب طردا مع رفع الجرعة المستخدمة ففي حين أن 10 مل مول مغنسيوم/ ليتر يثبط تقلصات الألياف العضلية المشعة بجرعة 2 غري، فإن التقلصات تبقى ذاتية في هذا التركيز بعد التشعيع بجرعة 5 غري ويلزم من 15 ـ 20 مل مول مغنسيوم لتثبط الفعالية تماما ويلاحظ أن الظاهرة عكسية أيضا فبعد الغسل بمحلول عادي N فإن الألياف تستعيد فعاليتها البدائية تماما.

2 ـ 3. البوتاسيوم K^{+} :

إن رفع البوتاسيوم يحرض على تقلصات كزازية بتراكيز 20 مل مول وما فوق، هذه التقلصات الكزازية تزداد قوتها طردا مع رفع البوتاسيوم لتصل الكزاز الأعظمي بتراكيز قريبة من 120 مل مول/ ليتر. ويظهر الشكل [5] اختلاف تأثير رفع البوتاسيوم بدلالة التشعيع. بعد التشعيع يلاحظ أن القوة العظمى للتقلص يمكن تحريضها بنصف التراكيز المعتادة وهذه الظاهرة عكسية أيضا فبعد الغسل تستعيد الألياف تقلصاتها.

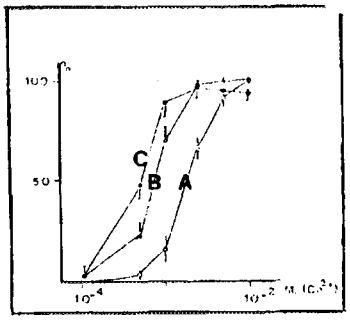
المناقشة :

إن النسبة بين أيونات الكالسيوم والمغنسيوم في المحلول ودورها في



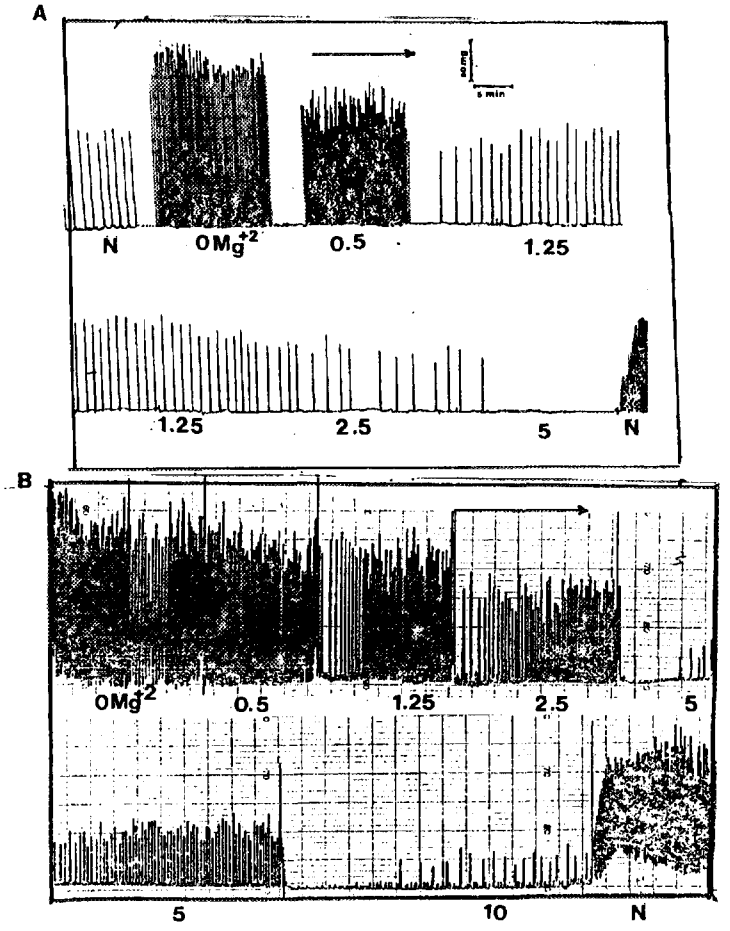
شكل (1) : تأثير محاليل فقيرة بالكالسيوم على فعالية الألياف العضلية الشاهدة والمشعة

A ـ شاهد، B ـ جرعة 5 غري، السهم يدل على اتجاه التسجيل



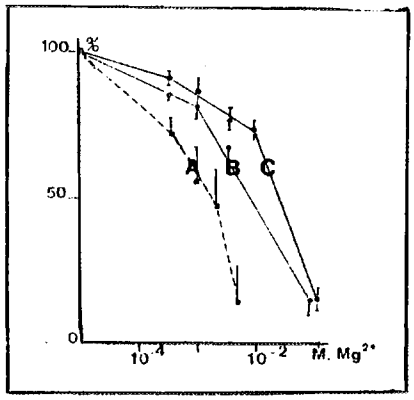
شكل (2) : تمثيل بياني لتغيرات تأثير تراكيز الكالسيوم Ca^{2+} بتأثير التشعيع

A ـ شاهد، B ـ جرعة 2 غري، C ـ جرعة 5 غري

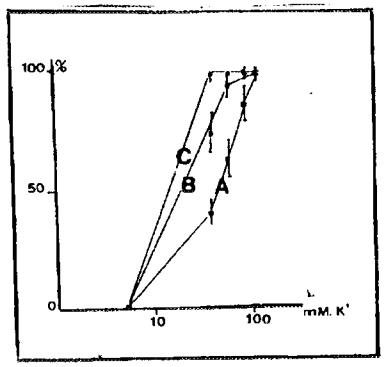


شكل (3) : تأثير تغير تراكيز المغنسيوم على التقلص العضلي للألياف الشاهدة والمشععة

A ـ شاهد، B ـ جرعة 5 غري، السهم يدل على اتجاه التسجيل



شكل (4) : تمثيل بياني بتغييرات تأثير تراكيز المغنسيوم Mg^{2+} بتأثير التشعيع
A ـ شاهد، B ـ جرعة 2 غري، C ـ جرعة 5 غري



شكل (5) : تمثيل بياني بتغييرات تأثير تراكيز البوتاسيوم K^{+} بتأثير التشعيع
A ـ شاهد، B ـ جرعة 2 غري، C ـ جرعة 5 غري

تقلص العضلات الملساء عموما والوعائية بشكل خاص مدروسة بشكل واسع وكل الدراسات الفيزيولوجية والمرضية للأوعية الدموية تشير إلى دور المغنسيوم الجوهري في بعض الامراض القلبية الوعائية. بالاضافة الى ذلك فإن الكالسيوم ضروري وتراكيزه هامة جدا في تحديد درجة وقوة التقلصات الوعائية، وقد أثبتت دراسات توزع الكالسيوم وعلاقة تراكيزه على جانبي الغشاء الخلوي مع قوة التقلص أن دخول الكالسيوم من الخارج للداخل هو العملية الأساسية في تنشيط البروتينات المتقلصة [8].

إضافة لذلك فإن اضطراب كمون الغشاء هو أهم عملية تسهم في تنشيط قنوات شاردية ionic channels التي يمر عبرها الكالسيوم. إن التشعيع على ما يبدو وضمن الواقع الحالي من نتائجنا يؤدي إلى تنشيط القنوات الايونية من النمط P.O.C "Potential Operating Channels" مما يؤدي إلى زيادة دفق الكالسيوم Ca^{2+} influx لداخل الخلية وقد أكدت أولى الدراسات البيولوجية الاشعاعية حول زيادة النفوذية الغشائية للأوعية Capillary Permeability اللاحق للتشعيع بجرع وحيدة فقد أوضح Eassa-Helmy ومساعدوه منذ عام 1973 [9] أن النفاذية الغشائية تزداد طردا مع زيادة الجرعة المستخدمة وان استخدام جرعة 4 ـ 5 غري يزيد بشكل ملحوظ نفاذية الغشاء، على أن هذه الزيادة تميل للنقصان بعد بضعة أيام من التشعيع، إضافة لذلك فإن دراسات أخرى وباستخدام جرعات عالية أوضحت أن الجرع المستخدمة في دراستنا ليست ذات تأثير على البنية الخلوية وأن الأذى الخلوي مستبعد في حدود الجرع المدروسة [10].

ومن جهة أخرى فإن الاثر المحتمل للأشعة المؤينة بتحرير ورفع تركيز الكالسيوم الداخلي $[Ca^{2+}]i$، هذا الاثر مستبعد على الاقل على الالياف العضلية موضوع الدراسة، حيث أظهرت دراساتنا (المؤلف) بالمجهر الالكتروني [11] فقر الخلية العضلية الملساء من الوريد البابي الكبدي بمخازن الكالسيوم الداخلي على عكس الخلايا الشريانية التي يمكن أن تتقلص جزئيا بغياب الكالسيوم الخارجي.

إن نتائجنا الأولية والتي تحتاج لتعميق أكبر على مستوى فيزيولوجي كهربائي بدراسة القنوات الشاردية. هذه النتائج تشير الى أن التنافس الوظيفي بين الكالسيوم والمغنسيوم يتأثر بالتشعيع بشكل كبير، ففي حين أن المغنسيوم بتركيز 5 مل مول/ليتر يثبط دخول الكالسيوم كليا الى داخل الخلية العضلية على الألياف الشاهدة، فإنه وبهذا التركيز ذو أثر ضعيف وتبقى الالياف العضلية تتقلص بشكل ذاتي وتحافظ على فعاليتها. إن هذا يتفق مع دراسات Mc. Connel ومساعدوه [12]، التي أوضحت أن التشعيع له أثر أعظمي في الساعات الأولى على نفاذية الايونات الاحادية Monovalent أكثر ويتضح أثر التشعيع على نفاذية الغشاء للايونات الثنائية Bivalent في

الساعات التالية للتشعيع.

إن ظاهرة تثبيط المحاليل العالية التراكيز من المغنسيوم Hyper magnesec للتقلص الوعائي معروفة ومدروسة. وهذا الاثر المعروف بـ Stabilisator effect يبقى بعد التشعيع إنما بانزياح توضحه المخططات البيانية ويمكن أن يكون أحد التفسيرات لهذا الاثر. أن التشعيع يزيد عدد القنوات الايونية من النمط P.O.C الفعالة أو أنه ينشط قنوات أخرى غير فعالة (inactive) في الظروف الفيزيولوجية العادية وتصبح فعالة بعد التشعيع وبالتالي فان عدد القنوات P.O.C يزداد بشكل ملحوظ مما يؤدي إلى رفع تراكيز المغنسيوم القادرة بشكل اعتيادي على مراقبة حركية الكالسيوم. وهذا الكلام ينطبق على أثر التشعيع على زيادة التقلصات الكزازية المحرضة برفع تراكيز البوتاسيوم فمن المعروف أن زيادة البوتاسيوم الخارجي تعمل على ازالة استقطاب الغشاء الخلوي بشكل تدريجي ناتج بشكل أساسي عن تناقص التدرج الكهراكيميائي عبر طرفي الغشاء الخلوي. إن كمون الغشاء في الخلية العضلية الملساء محدد بشكل كبير بكمون توازن أيونات البوتاسيوم Ek^+ وعليه فان المحاليل عالية تركيز البوتاسيوم Hyperpotossic تقود إلى زيادة هامة في تدفق الكالسيوم عبر الأقنية الايونية P.O.C. إن النتائج المعروضة تظهر بشكل واضح أن التشعيع يؤثر بشكل كبير على فعالية الألياف الوعائية وذلك عن طريق تبديل حساسيتها المألوفة لاختلافات التركيب الايوني للوسط وتؤكد هذه النتائج أيضا على ظاهرة التنافس الوظيفي بين الـ Ca^{2+} والـ Mg^{2+} على المستوى الوعائي على أن هذه الدراسة ستعمق مستقبلا بدراسة حركية الايونات المختلفة عن طريق مراقبة عمل القنوات الشاردية بتقنية الـ Patch-Clamp.

كلمة شكر :

الشكر الجزيل للسيد الدكتور إبراهيم حداد المدير العام لهيئة الطاقة الذرية السورية الذي له الفضل الاكبر في دعم هذا الاتجاه من الابحاث في البيولوجيا الاشعاعية. كما أشكر السيد الدكتور إبراهيم عثمان رئيس قسم الوقاية الاشعاعية والأمان النووي والسيد موفق تقي الدين لمساعدتهم في عمليات التشعيع، وأشكر السيدة منال طالب لمساعدتها العلمية والتقنية.

References :

[1] Webb R.C., Bohr D.F. (1981). Regulation of vascular tone, molecular mechanisms progess in cardiovascular diseases. Vol; XXIV, No.3, 213-242.

[2] Murphy R.A., Herlihy J.T., Megerman J. (1974). Force generating capacity and contractil protein content of arterial smooth muscle. J. Gen. Physiol. 46: 691 - 705.

[3] Filo R.S., Bohr D.F., Ruegg J.C. (1965). Glicerinated skeletal and smooth muscle, calcium and magnesium dependence. Science, 147 : 1581 - 1583.

[4] Altura B.M., Altura B.T. (1981). Magnesium ions and contraction of vascular smooth muscle : Relationship to some vascular diseases. Fed. Proceeding, 40, 12, 2672-2677.

[5] Wykoff M.M. (1972). the effects of fast neutron irradiation on blood pressure and the response to epinephrine and acetylcholine in the rat. Radiat. Res., 49: 624 - 630.

[6] Timmermans R. and Gerber G.B. (1980). Effet de la phenoxybenzamine sur le flux sanguin mesenterique du rat irradie. C.R. Soc. Biol., 174: 883-888.

[7] Law M.P. (1985). Vascular permeability and late radiation fibrosis in mouse lung. Radiat. Res., 103 : 60-76.

[8] Kuriyama H., Ito Y., Suzuki H. (1977). Effects of membrane potential on activation of various smooth muscles. In: Excition-contraction coupling in smooth muscle. Eds. H. Casteels et al., pp. 25-35.

[9] Eassa H.M.E., Casarett G. (1973). Effect of epsilon amino-N-caproic acid (EACA) on radiation-induced increase in capillary permeability. Radiobiology, 106: 675-688.

[10] Verola O., Lefaix J., Daburon F., Brocheriou C. (1986). Vascular damage after acute local irradiation, a light and electron microscope study. Brit. J. Radiol. Suppl., 19 : 104-108.

[11] Feletou M., Alya G., Walden M., Tricoche R. (1986). Source of calcium and cholinergic contraction of the rat portal vein and sheep coronary artery; Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 283, N0.2, 254-271.

[12] Mc. Connel V.M., Instosh D.B., Bermann M.C. (1981). X-irradiation of isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. Radiat. Res., 85, No. 3, 505-515.

NEXT PAGE(S) left BLANK