الباب الثاني عشر

الآليات الجزيئية لموت الخلية السمية الخلوية

obeikandl.com

obeikandl.com

الآليـــات الجزيئيـــة لمـــوت الخليـــة:الســـــمية الخلويـــــة :

Molecular mechanisms of cell death : Cytotoxicity : cell toxicity

ليس فقط لتطور الفروع المساعدة (auxiliary disciplines) فى مجال الكيميـاء الحيوية والعضوية والتحليلية وفى مجال البيولوجى كعلم الفسيولوجى وعلـم الخلية المساهمة فى تطور علم السمية (Toxicology) بل أيضـا تسـاهم فـى تطور الفروع المختلفة المساعدة لعلم السمية خاصـة علـم الخلويـة وذلـك للأسباب التالية :

- عديد من السموم المسببة لضرر أو تخريب عضو أو نسيج فإنها فـى نفس الوقت تؤدى لضرر للخلايا الفردية لأنسجة هذه الأعضاء .
- يمكن أختبار تأثير السموم على المزارع الخلويـة (cell cultures) فـى وقت قصير وهو ما يتيح أختصار مدة الدراسة .
- لا توجد مشاكل فى دراسات السمية الخلوية مع سلوك مركبات السـم المعقدة (complex toxico kinetic behaviour) فلا تتمن آليات جهازية لتنظيمـها (Systemic regulatory mechanisms).
- يمكن أستخدام المزارع الخلوية فى أبحـاث السـمية مـن الدراسـة المباشرة لآليات التأثيرات المميزة للخلية أو العضو وهو ما غيرنا بشـكل عام وخاص بالأسس العلمية لتفهم أكثر أدراكا ومنطقية لقياس الخطورة (Risk assessment) إلا أنه فى بعض حالات معينة سيكون الأستنتاج من الخليـة لصالح الكائن الحى صعبا.

والعوامل الرئيسية المحددة لحدوث موت خلوى هى :

١. طبيعة العامل السام النشط والذى فى اغلـب الحـالات يكـون مـادة وسيطة نشطة (Reactive intermediate) ومكانية تواجدها بمكان الجزئيـات المستهدفة وأنواع هذه الوسيطات التى له أثرها فى موت الخلية .
٢. دور الجزئيات المستهدفة بالخلية من حيث وظيفتها وتوظيف الخليـة والتى يمكن وأن تقرر وبشكل عام الأداء الوظيفى والذى يعتمـد أساسـا على سلامة مكوناتها وأغشيتها وأنزيماتها وأحتياجها للأمـداد بمصـدر الطاقة الذى يؤمن الإتمام الملائم لعمليات الأنتقال والتخليق والإصلاح

فعلى سبيل المثال عدم ازدواج تفاعل القفرة التأكسيدية ربما يؤدى لموتها
٣ .طبيعة وإمكانية تواجد النواتج السامة والمتحررة من الخلية بعد موتها
٤ .آليات الدفاع الخلوى الغير مؤثر فى إزالة السمية والوسطيات النشطة والأصلاح المبدئى للضرر (كآزالة السمية للوسطيات أو الممثلات الأكسيجينية النشطة وصيانة وأصلاح الضرر فى حمض الدبروكس نيوكليك.

تكوين المواد الوسطية النشطة المحدثة للسمية وآلية إزالة سميتها

أظهرت نتائج الأبحاث فى الآونة الأخيرة تقدم كبير فى أظهار الدور الهام للمواد الوسطية (الوسيطات النشطة) (Reactive intermediates) للمواد الغريبة والعقاقير (Drugs) والسموم والملوثات البيئية المختلفة خاصة المبيدات بأنواعها مثل التراكيب الإليكروفيلية والشقوق الحرة وأنواع الأكسون النشطة فى أحداث السمية الخلوية وآلياتها .

وترتبط المواد النشطة الوسيطية أرتباطا تساهميا مع الجزئيات الخلوية (Cell molecules) كالأحماض النووية والبروتينات والعوامل المساعدة والليبيدات والسكريرات العديدة والتى فى النهاية تؤدى لموت الخلية ، جدول رقم (١٢-١) .

جدول رقم (١٢-١) : أمثلة لبعض المركبات الغريبة (xenobiotics) وممثلاتها النشطة :

المادة	الممثل النشط المقترح	مكان أرتباط المستهدف
بروموبنزين	٤،٣ – أيبوكسيد و/أو أوثركينون	خلايا الكبد
اسيتامينوفين	كينون إيمين	خلايا الكبد
رابع كلوريد الكربون	تراى كلوروميثيل أو فوسجين	خلايا الكبد
بارا أمينوفينول	كينون إيمين	خلايا الكلية
ايبو مينول	إيبوكسيد	خلايا الرئة

١ –التراكيب الإليكتروفيلية (Electrophilie structures)

فعادة ما يلامس العمليات المؤدية لتكوين هذة التراكيب الإليكتروفيلية المشابهات الإنزيمية للسيتوكروم ب – ٤٥٠ (Cytochrome b-4so) ، ومن أمثلة هذه التراكيب :

١-١- الأيبوكسيدات (Epoxides) :

فعند تعاطى حيوانات التجارب والسابق معاملاتها بالفينوباربيتال مركب ٣و٤ - ايبوكسيد بروموبنزين فإنة يؤدى إلى زيادة معدل التمثيل فيها وإفراز المواد الوسطية النشطة التالية فى البول :

- ٣و٤ - داى هيدروديول بروموبنزين
- ٣و٤ -داى هيدروديول بروموبنزين جليكورونير
- ٤- هيدروكسى بروموفينيل جليكورونيد
- ٤-هيدروكسى بروموفينيل سلفات
- ٤- برومو فينيل ميركابتوريك

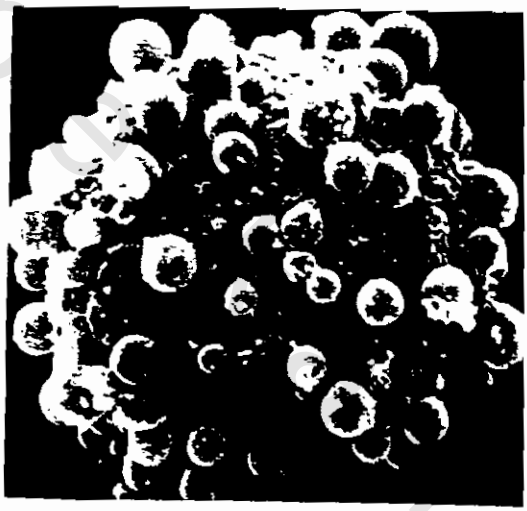
حيث أدت الجرعات الزائدة من البروموبنزين والأستيامينوفين لأستنفاذ الجلوتاثيون فى الخلايا الكبدية خارج وداخل الجسم (In-vivo & In vitro) حيث يلعب نظام الجلوتاثيون دورا هاما فى انهيار سمية مثل هذه الوسطيات النشطة السامة فأستنفاذ الجلوتاتيون من الجسم لاتحاده معها يحمى مجاميع الثيول بالبروتينات خاصة البروتينات الأنزيمية (الأنزيمات) من مهاجمة هذه الممثلات الوسطية السامة .

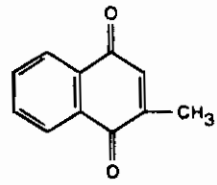
وبزيادة الجرعات عن ذلك تؤدى بأستنفاذ مجاميع الثيول متنوعة بزيادة فى تركيز أيونات الكالسيوم فى السيتوسول (حيث تتوزع أيونات الكالسيوم بين الاندربلازم الشبكى والميتوكوندربا والسيتوسول بتركيز ١٠ مول/لتر وكذلك البروتينات) حيث تلعب مجاميع الثيول دورها الهام فى نقل ايون الكالسيوم معتمدة على أنزيم (Ca 2+/Mg 2+ ATP ase) وهو ما أدى للأقتراح بأن أضطراب اتزان ايون الكالسيوم (C2+ - Homeostasis) يرتبط بأضطراب فى اتزان مجاميع الثيول وهو ما لوحظ واضحا فى تحصين خلايا الكبد ورابع كلوريد الكربون أيضا .

وتعد زيادة مستوى ايونات الكالسيوم بالسيتوسول خطرا على الخلية لأنها تؤدى إلي

- زيادة فى نشاط انزيم الفوسفوليبيز بالأغشية
- علاوة على تغيرات فى تركيب و تفاذية الأغشية الخلوية (كتخريب الحاجز الواقى بين الحلايا وأنطلاق الأنزيمات اللسيوسومية المحللة

وزيادة الأكسدة الفوقية للاحماض الدهنية الغير مشبعة وتكويـــن بــثرات حويصلية (Vesicle formation : blebbing) خاصة بخلايا الأغشية الكبديـــة المعزولة .





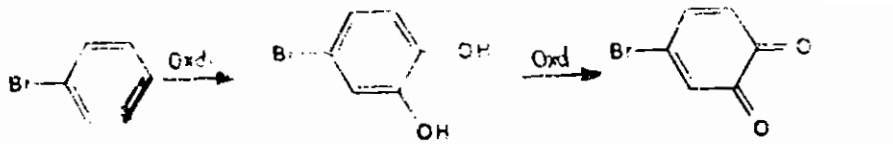
menadione

شكل رقم (١٢-١): تكوين بثرات حويصلية بعد تحضين الخلايا الكبدية المعزولة بثلاثين دقيقة مع مركب ميناديون (Menadione)

١-٢الكينونات (Quinones) :

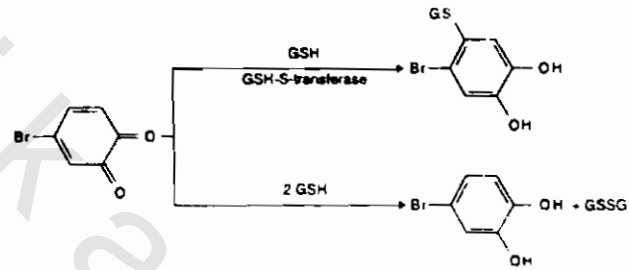
معاملة الخلايا الكبدية (السابق معاملتها بالفينوباربيتال بالكينونـــات أدى ذلك إلى موت موضعى :تنكرز (Necrosis) فى الخلايا و هو ما يعـــزى إلـــى التفاعلات الوسطية للكيتون وتكوين التراكيب الكينونية (quinoid structures) كما بالمعادلة التالية :

obeikandl.com



3 4-dihydroxybromobenzene *ortho*-quinone of 4-bromobenzene

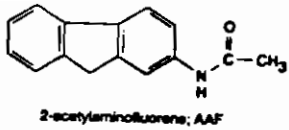
وهنا يتمكن حمض الجلوتاثيون من ازالة سميتها فى المسارين التاليين :

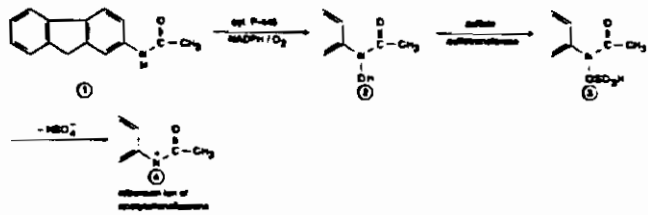


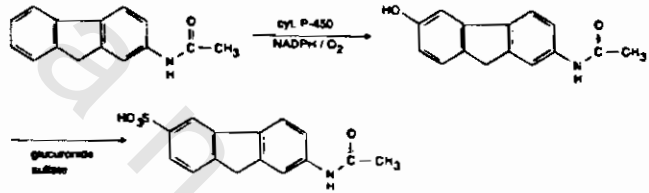
١ - ٣ أيونات النترينيم (Nitrenium ions) :

حيث تؤدى المعاملة بمركب ٢ - أسـتيل أمينوفلوريـن (2-Acetyl Amino Fluorene : AAF) والمستخدم كمبيد ثيتروجينى (بة ذرة نيتروجين محاطة بحلقـة من ٦ إلكترونات بدلا من ثمانية) وأوقف أستخدامة لكونة مسرطن كبدى إلـى موت موضعى بالخلايا الكبدية نتيجة إرتباط الموقع (c8) بجزئى الجوانيـن نيوكليوتير الخلوى نتيجة حدوث عملية أكسدة يلامسـها المشـابة الأنزيمـى سيتوكروم ب - ٤٤٨ يتبعها عملية كبرتة (sulfotion) فتؤدى لتكويـن أيـون النترنيم النشط المطفر المسرطن (mutagenic carcinogen)

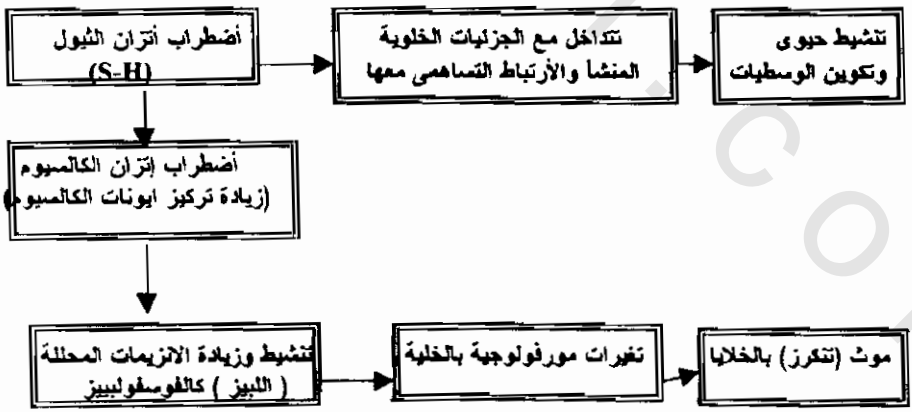
أما إذا أرتبط المشتق الهيدروكسيلى بحمض الجيكورونيك بـدلاً مـن السلفات فإنه يعد مسار لإزالة السمية أو مـن خـلال عمليـة الهيدروكسـلة العطرية (hydroxylation) المتبوعة بالأقتران الجليكورونيدى .







ويمكن توضيح التأثيرات السابقة على النحو التالى :



٢-الشقوق (Radicals) :

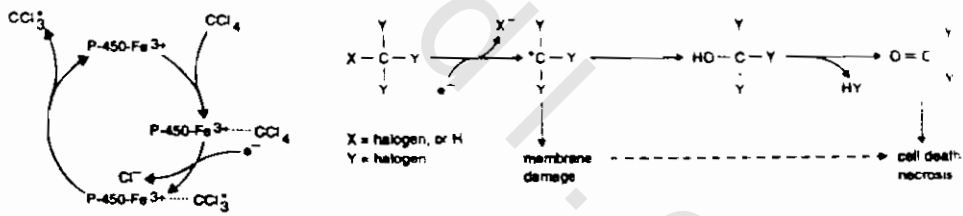
وهى مجموعة هامة من المواد الوسيطة النشـــطة العضويـــة أو الغـــير عضوية (جزئيات أو ذرات لها الكترون غير مزدوج) وتتكون من خلال:

- أضافة أو انفراد الكترون خلال الكسر المتجانس للرابطة التساهمية
- أختزال الكترون واحد وفى ملامسة انزيم (Microsomal NADPH cyto.p-450)

وتحدث النوق مدى واسع من التأثيرات السامة :

- كتخريب الأغشية
- وقف أو تثبيط فاعلية الأنزيمات
- موت الخلية أو السرطانات ثم الموت

ودرس دور هام فى احداث هذه التأثيرات بعنايـــة عنـــد دراســـة المـــوت الموضعي : تتكرز خلايا الكبد بمركبات الميثـــان الهالوجينيـــة كلوروفـــورم (CHCl3) ، رابع كلوريد الكربون (CCl4) ، برومونراى كلوروايثان (Br CCl3) خاصة رابع كلوريد الكربون وسمية للخلايا الكبدية والتى أظـــهرت تكويـــن الشق : تراى كلوروميثيل(CCl3) عند تحصين ميكروسومات الكبد معه وفـــى وجود (NAPPH) حيث يعتمد التنشيط التمثيلى لرابع كلوريد الكربـــون علـــى NADPH وليس على الأكسجين تحت تأثير السيتوكردم ب- ٤٥٠، شكل رقـــم (٢-١٢) :



الآلية المحتملة لازالة هالوجين رابع كلوريد الكربون بالسيتوكروم ب -٤٥٠

تطور التأثيرات السامة المحتملة لرابع كلوريد الكربون (مركبات الميثان المكلورة)

شكل رقم (٢-١٢): تطور التأثيرات السامة لرابع كلوريد الكربون و الآلية المحتملة لإزالته

obeikandl.com

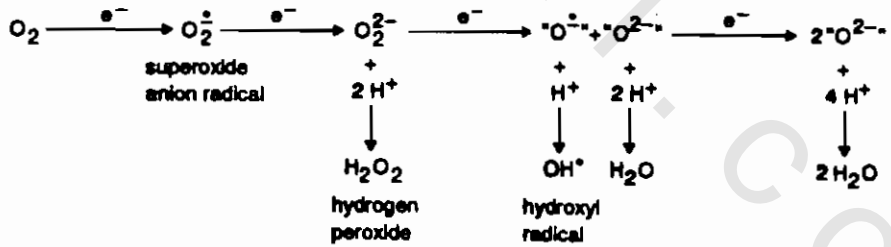
وأما عند تحضين ميكروسومات الكبد مع الكلوروفورم أو رابع كلوريد الكربون ولكن فى وجود الجلوثاثيون فأدى لتكوين جلوثاثيونيل كربونات (GS-C(GS)=O) حيث كان للجلوتاثيون اثره الهام فى منع الموت الموضعي بخلايا الكبد : التنكرز .

٣-أنواع الأكسجين النشط (Reactive Oxygen Species) :

تلعب أنواع الأكسجين النشطة دورها فى احداث :

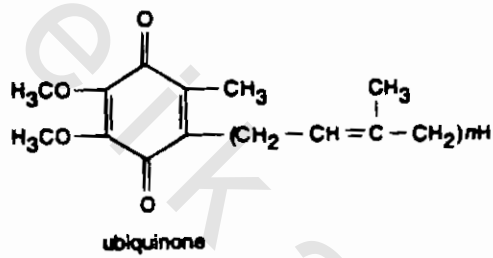
- التخريب بالأغشية الخلوية المختلفة
- علاوة على السمية القلبية (Cardio toxicity)
- والسمية العصبية(Neuro toxicity)
- وضغط التأكسد الخلوى (Oxidative stress)
- والسرطانات (cancers) .

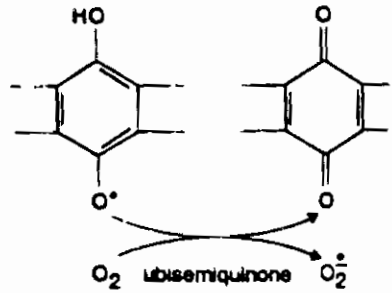
حيث يعمل الأكسجين فى حالتة الثابتة الأساسية (Ground state) كمستقبل للألكترونات (Electron acceptor : O – O) بناء على التوزيع الفراغى للألكترونات حيث تحتوى مداراته الجزيئية الخارجية (مدارات التكافؤ) على أليكترون واحد وتبعاً لقاعدة باولى (Pauli exclusion) يمكن الدخول فى تفاعلات اختزال أحادية ولهذا يكون الأختزال الكامل للأكسجين إلى ماء من خلال إضافة أربعة إليكترونات و يتم فى ٤ خطوات متتابعة أحادية الإليكترون وأثنائها تتكون الأنواع الأكسجين النشطة :



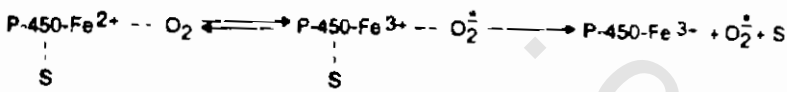
٣-١- تكوين الشق الأنيونى فوق الأكسيد بين الخلايا (Super oxide anion radical) :

يتكون بنزع إليكترون واحد من المدار باى (π2p) : حيث تكون ٧٥ % منة بأختزال الأكسيجين فى وجود المرافق الأنزيمى أوبكتيون حيث يلفظ واحد من كل ٢٥ جزئى أكسجين تختزل فى نهاية السلسلة التن الكترون من الأوبيكنيون فيعطى ٢٤ نانومول شق أنيونى فوق أكسيدى / جم كبد :

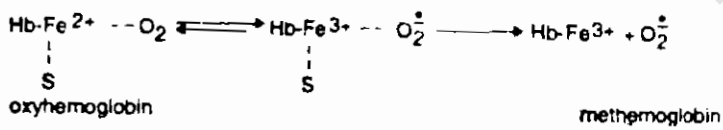




كما يتكون من الأكسدة التلقائية لبروتينات الهيم المختزلة والتى تعد المصدر الداخلى المنشأ الثانى له حيث تنشق مادة التفاعل الأساسية للأوكسين فيروسيتوكروم ب ٤٥٠ الى (دورة عدم ازدواج السيتوكروم للنشاط التأكسدى) .

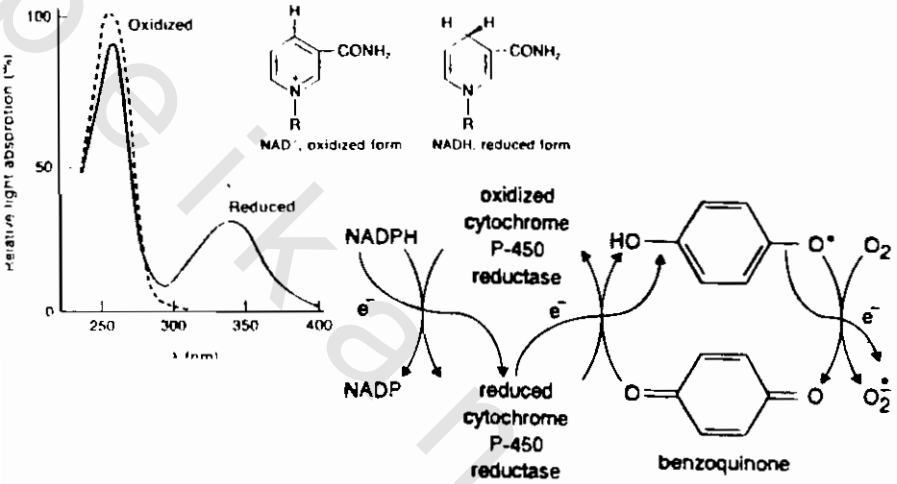


كذلك يخدم الاكسى هيموجلوين كمصدر ثالث للشق الأيونى فوق الأكسيد كما يلى بالأكسدة التلقائية :

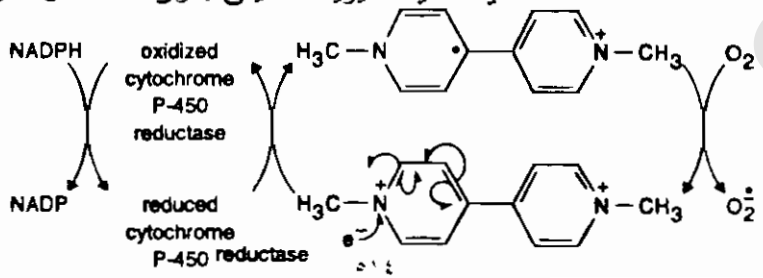


كما يتضمن تكوين هذه الشقوق مواد غريبة مثل :

- **الكينونات** : حيث تبدأ بالأختزال بإليكترون واحد (أوبيكينون) ويكون الناتج سيمكينون والتى بدورها تمرر الكترون يتسلمه الأكسجين الجزيئى ويلامسها إنزيم (NADPH-dependent cyt. P-4so Reductase) كما يلى بدورة الأكسدة والإختزال



- **الهيدروكينونات** : فيلزم دخولها أولاً فى خطوة تأكسيدية بملامسة إنزيمية كما يحدث فى تحليق البروستاجلاندين (Prostaglandin).
- **مشتقات البيبيريديل (Bipyridyl)** : كما فى مبيد الباراكوات والمؤثر على خلايا انسجة الرئة بالانسان والحيوان فتحدث عملية تنشيط حيويا كما يلى بدورة أكسدة وأختزال



obeikandl.com

٣-٢ فوق أكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide : H_2O_2) :

وهو مركب وسطى لأختزال الأكسجين يتكون بملامسة إنزيم (Super Oxide Dismutase : SOD) وهنا يكون الأكسجين المتكون فى حالته الأساسية أو يتكون تلقائيا :

$$O_2^{\cdot} + O_2^{\cdot} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

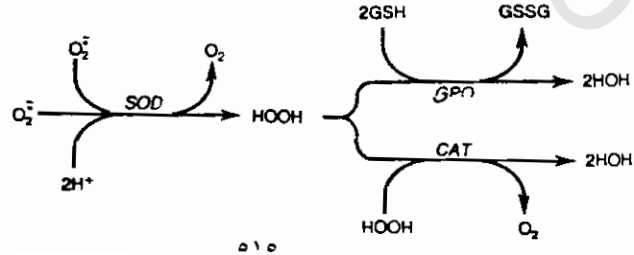
وهنا يتكون أكسجين فردى شديد النشاط لأن الإليكترونين غير المزدوجين فى الحالة الأساسية يصبحا مزدوجين ويتكون مدار جزئى فارغ وزوج من الألكترونات الحرة التى يمكنها أن يشغلاه .

وهنا تنظم الخلية الطبيعية بعدد من آليات الدفاع الأنزيمية واللا أنزيمية ضد أنواع الأكسجين النشطة حيث توجد ثلاثة أقسام من الأنزيمات تعطى حماية للخلية ضد أنواع الأكسجين النشطة السابقة (أى أقسام من الأنزيمات المضادة للتأكسد (Antioxidant)كخط دفاع أول لها فتمنع تحول أنواع الأكسجين الاقل نشاط (كشق الانيون الفوق أكسيدي H 2O2 الى أنواع أكثر تنشيطا مثل شق الهيدروكسيل O H وهى :

الدفاع الإنزيمي :

فوق أكسيد ديميوتير (Super oxide dismutase SOD) :

بروتينات تحتوى على معادن تلامس تحول الشق الأنيونى فوق الأكسيد إلى أكسجين جزيئى فى حالة الأساسية وفوق أكسيد الهيدروجين تبعا لنوع أيون المعدن الموجود بها حيث يوجد بكميات كثيفة بداخل الخلايا وتظهر كميات صغيرة منة فى البلازما والليمف وله أهميته البالغة فأي خلل تمثيلي يتضمن إنفراد شق أنيوني فوق أكسيدي أو زيادة في تركيزه بأي سائل خارج الخلايا يكون في منتهي الخطورة بالنسبة للكائن الحي :



١-٢-كاتاليز (Catalase) :

وهو أنزيم يحتوى على الهيم ويتفاعل بشكل متخصص مع فوق أكسيد الهيدروجين ويحوله لماء وأكسجين كما يعمل مساعد لأنزيم (SOD) فى إزالة فوق أكسيد الهيدروجين الناتج مع تفاعل التطفر السابق ويوجد فى معظم الأنسجة داخل خلايا كالكبسولات (Peroxisomes) ويتطلب أقصى نشاط لة تركيزات عالية من فوق أكسيد الهيدروجين وهو ما يميزه عن الأنزيمات الأخرى .

١-٣-جلوتاثيون بيروأكسيديز :

وهو إنزيم يتفاعل وبشكل متخصص مع فوق أكسيد الهيدروجين يحتوى على السلينيوم ويحول فوق أكسيد الهيدروجين والبيروأكسيدات العضوية وهو إنزيم متخصص للجلوتاثيون وليس لمواد التفاعل البادئة التى تنهار سميتها (هيدروبيرو أكسيدات الليبيدات) ويوجد بمعظم الأنسجة بكلا من السائل الخلوى (السيتوسول) بحويصلات خاصة وفى الميتوكوندريا وأعلى مستويات له فى كرات الدم الحمراء والكبد ثم القلب والرئة .

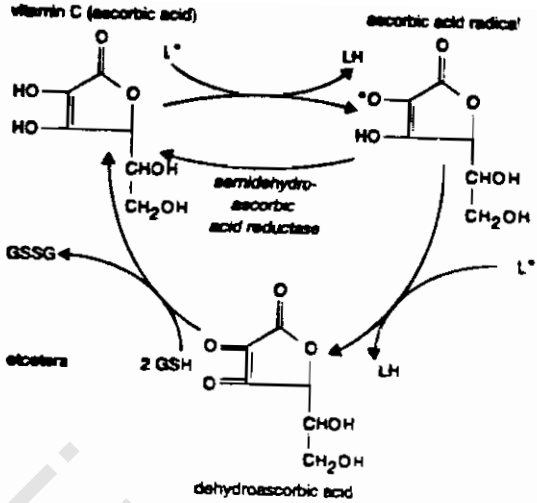
وكلا الإنزيمين يعتمدا على أيونات معدن النحاس وأشباه الفلزات كالسيلينيوم كعوامل مساعدة وهو ما يعنى أن المركبات المتداخلة مع تمثيل العناصر الدقيقة ربما تحرك التحكم جزئيا أو كليا فى سمية الخلية فالفضة تثبت إنزيم الجلوثايون بيروأكسيديز بالفئران .

٢- الدفاع غير الأنزيمى :

أو خط الدفاع الثانى فيتمثل فى مواد تزيل أو تكنس (savengers) الشقوق فى الخلية مثل :

٢-١ فيتامين ج (حمض الأسكوربيك) :

الذائب فى الماء ويوجد فى السائل الخلوى (سيتوسول) والمتفاعل بسرعة مع الشق الأنيونى فوق الاكسيدى وفوق أكسيد الهيدروجين وبسرعة اكبر مع شقوق الهيدروكسيل والاكثر من ذلك فهو يزيل الأكسجين الفردى كما بالشكل رقم (١٢-٣) . وهو كمادة مانعة للتأكسد يظهر تأثيرة الدفاعى فى عدسات العين والتى لا تحتوى على أنزيمات S OD وفى السائل المحيط بالحيصلات الرئوية حيث يكمل عمل (SOD) والكاتاليز



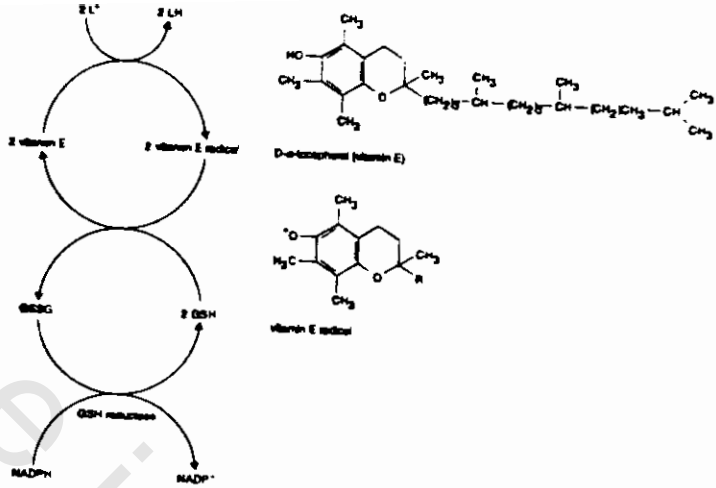
شكل رقم (١٢-٣): إزالة سمية الشقوق الليبيدية (L) بفيتامين ج

٢-٢ فيتامين E (α- توكوفيرول) :

الليبوفيللى والمندمج فى الأغشية البيولوجية حيث سلاسل الأحماض الدهنية الغير مشبعة غالبا التى بذلك تكون عالية الحساسية للأكسدة بالأكسجين الفردى أو شقوق الهيدروكسيل (سلسلة تفاعلات الأكسدة الفوقية للليبيدات (lipid peroxidation) المسببة لضرر بالغ بالأغشية الخلوية وربما موت الخلية والتى يمكن للأغشية مع مساندة تأثير المواد الضارة للأكسدة على سلسلة هذه التفاعلات .

فيتفاعل α - توكوفيرول مع شقوق الليبيد ليعطى شقوق α توكوفيرول + حمض دهنى غير ضار وفى نفس الوقت يمكن وأن تختزل شقوق α -توكوفيرول الى α -توكوفيرول بالجلوتاثيون . ويوجد الفيتامين بتركيز عالى بأغشية العين .

ويحتمل أن يكون α -توكوفيرول هو الليبيد الوحيد الذائب المضاد للأكسدة فى بلازما دم الإنسان ويوضح الشكل التالى رقم (١٢-٤) تفاعله مع الشقوق الليبيدية ويلاحظ أن الشقوق الناتجة من تفاعل كلا الفيتامينين أثناء تفاعلات إزالة السمية أقل نشاطا لتباينها نتيجة الرنين كما أنها تتحول مرة أخرى للفيتامينات الأصلية بالأنظمة المعتمدة على الجلوتاثيون :



شكل رقم (١٢-٤) : إزالة سمية الشقوق الليبيدية بفيتامين (E)

تفاعلات المواد الوسطية النشطة مع الجزئيات الخلوية :

١-الأرتباط التساهمى وتضمناته السامة (Covalent binding Toxic implications)

ترتبط المواد الوسطية النشطة تساهميا مع الجزئيات الخلوية كالأحماض النووية والبروتينات والعوامل المساعدة والليبيدات والسكريات العديدة . وقوة تأثيرات العديدة كنقص انتاج الطاقة والتغيرات فى نفاذية الأغشية وتثبيط تخليق الجزئيات الكبيرة سبق التعرض لها حيث سيقتصر هنا على الأرتباط التساهمى لها مع البروتينات وموت الخلية ، جدول رقم (١٢-٢) .

جدول رقم (١٢-٢) : أمثلة لبعض المركبات القرينة وممثلاتها النشطة ومكان أرتباطها

المادة الغريبة	الممثل النشط المقترح	العضو المستهدف مكان الارتباط
بروموبنزين	٣و ٤ - إيبوكسيد و/أو أوثوكينون	الكبد
أستيامينوفين	كينون إيمين quinonimun	الكبد
رابع كلوريد الكربون	تراى كلوروميثيل أو فوسجين	الكبد
بارا أمينوفينول	كينون إيمين	الكلية
إيبومينول ipomeanol	إيبوكسيد	الرئة

ولقد أدى التأثير المبكر للجرعات الزائدة من البرومو بنزين والأسيتامينوفين لإستنفاذ الجلوتاثيون فى الخلايا الكبدية خارج وداخل الجسم حيث يلعب نظام الجلوتاثيون دورا هاما فى انهيار السمية للوسطيات النشطة لكلا المركبين وهو نفس مسار انهيار سمية كينون ايمين ، وبكلتا الحالتين فإن الدراسات على خلايا الكبد المعزولة برهنت حقيقة حماية الجلوتاثيون لمجاميع الثيول بالبروتينات من مهاجمة الممثلات السامة النشطة .

ولكن عند تحضين خلايا الكبد مع تركيزات عالية من البرومو بنزين والأستيامينوفين أستنفذت مجاميع الثيول متبوعة بزيادة فى تركيزات أيونات الكالسيوم(Ca) فى السيتوسول بتركيز ١٠ $^{-٧}$ مول /لتر وكذلك البروتينات ، حيث تلعب مجاميع الثيول والمعتمدة على إنزيم (Ca^{2+} / Mg^{2+} ATP ase) دورا هاما فى نقل أيون الكالسيوم بين الحجيرات الخلوية وهو ما أدى للأقتراح بأن أضطراب إتزان أيون الكالسيوم (Ca- Homeostasis) يرتبط مع الاضطراب فى اتزان مجاميع الثيول (وهو ما لوحظ مع تحضين خلايا الكبد مع رابع كلوريد الكربون أيضا) ولزيادة مستوى أيون الكالسيوم فى السيتوسول خطر على الخلية فأرتباط إنزيمات الفوسفوليز بالأغشية يعتمد على أيون الكالسيوم وعليه فأى زيادة فى تركيز أيون الكالسيوم السيتوسولى سيؤدى إلي :

- زيادة فى نشاط إنزيم الفوسفوليبيز
- وربما يؤدى الخلل فى إتزان أيونات الكالسيوم لتغيرات فى تركيب ونفاذية الأغشية الخلوية والتى تحدث بها أضرار :

- كتخريب الحاجز الواقى بين الخلية وبيئتها
- أنطلاق الأنزيمات الليسوسومية المحللة
- زيادة الأكسدة الفوقية للأحماض الدهنية الغير مشبعة .

openkanal.com

ولقد وجد أن البروموبنزين والأسيتامينوفين يكونا بثرات حويصلية لخلايا الأغشية (Vesicle formation : blabbing) الكبدية المعزولة وفيما يلى ترتيب العمليات المعتقد أنها تؤدى لموت الخلية :

- تنشيط حيوى
- ثم تتداخل مع جزئيات الخلية الداخلية المنشأ .
- الأرتباط التساهمى و هو ما يؤدي إلي اضطراب إتزان الثيول
- و الذي يؤدي بدوره إلي اضطراب أيونات الكالسيوم
- فتنشط إنزيمات الليبيز مؤدية لتغيرات مورفولوجية بالخلية في صورة بثرات تنتهي بموت الخلية .

٢-التدخل التأكسدى : ضغط الأكسدة والأكسدة الفوقية لليبيدات :

٢-١-الضغط التأكسدى (Oxidative stress) :

حيث التفاعل المستمر للعوامل المؤكسدة داخل الكائن وبمعنى آخر الحالة والتى بها تستخدم مكافئات اختزالية عن مثيلتها بالخلية التى تقوم بوظيفتها الطبيعية .

والأسباب الأولية للضغط التأكسدى هى أنواع الأكسجين النشطة والتركيبات الكينويدية حيث يدخل الشق الأنيونى فوق الأكسيدى فى تفاعل مباشر مع مجاميع الثيول :

$$\underset{\text{مختزل}}{R\text{-}SH} + O_2 + \underset{\text{مؤكسد}}{R`\text{-}SH} \longrightarrow R\text{-}S + H_2O_2 + R`\text{-}S\,R$$

$$R\text{-}S + R\text{-}S \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}$$

وربما يكون الشق الأنيونى فوق الأكسيدى أيضا فوق أكسيد الهيدروجين والذى يقود بدورة لأستخدام المكافئات الأختزالية كنتيجة لأنهيار سميتة بأنزيم جلوتاثيون بيروأكسيديز . فإذا كانت الكفاءة الواقية لأنزيم سوبر

أكسيد ديسميوتيز والكاتاليز غير كافية وتتكون شقوق الهيدروكسيل وأكسجين بحالة فردية .

والشق الأنيونى فوق الأكسيدى وفوق أكسيد الهيدروجين ليس نشطين فى المحاليل المائية ولهذا يتفاعلا معا أى لا يمكنهما تكوين شقوق الهيدروكسيل أو الأكسجين الفردي خلال تفاعل هابرفايس .

ويمكن كتس فوق أكسيد الهيدروجين بفيتامين ج وأنزيم جلوتاثيون بيروأكسيديز وكلا من شق الهيدروكسيل والأكسيجين الفردى يمكنها أكسدة مجاميع الثيول .

وإنتاج أنواع الأكسجين النشطة وأستخدامها فى اختزال المكافئات يمكن أعتبارها عظيمة بالمواد المأخوذة من هذه المواد يمكنها أيضا التفاعل مباشرة مع مكونات نظام الدفاع الأختزالى (الأختزال بواسطة NADPH والثيول ثم الاقتران مع الثيول) : فعلى سبيل المثال مركب الأسيتامينوفين يدخل فى تغيرات سواء بالأكسدة أو الأقتران فى حين ٣و٥ - داى ميثيل أسيتامينوفين تختزل فقط .

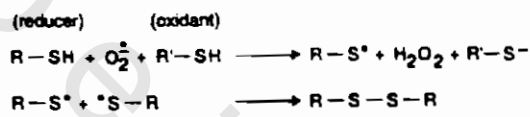
والسمية الخلوية للأسيتامينوفين و كنيون ايمن مقارنة بالمركب الأصلى حيث لوحظ إستنزاف الجلوتاثيون يعقبه موت الخلية بينما الأسيتامينوفين والكينون ايمين والإشتقاق منة ليس لهما سمية خلوية .

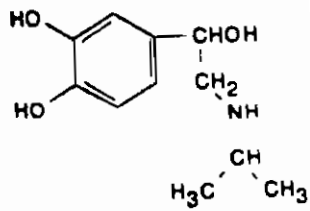
وبالرغم من أن هذا يؤكد أهمية الدور الذى يلعبه الأرتباط التساهمى فى الأستدلال على موت الخلية فإنه يبدو أن ضغط الأكسدة يتبع بإستنزاف مكافئات الأختزال والتى لها تأثيرات مدمرة على الخلية : كأضافة المادة المانعة للأكسدة كاتيكين (Catechin) مع تحضينات خلايا الكبد مع الأسيتامينوفين والتى منعت موت الخلية ولكن بصعوبة كان لها تأثير على الأرتباط التساهمى .

وإستنزاف الجلوتاثيون يخلق ظروف جيدة للأكسدة العالية (الضغط التأكسدى) وهذا ما ظهر فى تتابع الحوادث : التداخل مع المكونات الخلوية والذى يحل محلة أستنزاف الجلوتاثيون وأضطراب الأتزان الثيولى والضغط التأكسدى المتبوع بإستنزاف المكافئات الأختزالية والذى ربما ينتج من زيادة تركيز أيون الكالسيوم بعدة طرق أولها تثبيط نشاط أنزيم(Ca^{2} /Mg^{2} ATPase) بأكسدة مجاميع الثيول وتخريب الميتوكوندريا الناجم من أكسدة نيوكليوتيدات

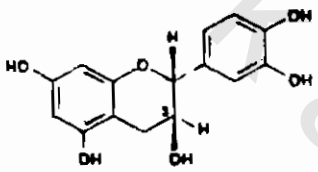
البيريدين وزيادة أيونات الكالسيوم السيتوسولية بواسطة (NADPH & NADH) .

و الأنواع الأكسيجينية النشطة المعتقد تضمنها فى التأثيرات السيتوسولية للفينولات عديدة الهيدروكسيل كالكاتيكول أمين (Catechol amine) فى الخلايا العصبية وخلايا العضلات القلبية والتى تأخذ مكانها فى درجات الأكسدة والأختزال خلال الأكسدة الذاتية (Auto oxidation)

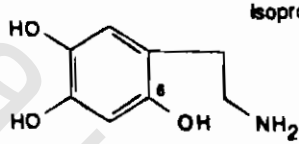




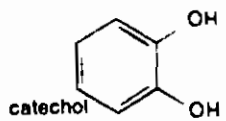
Isoproterenol (a catecholamine



catechin



6-hydroxydopamine



وكمثال لدراسة آلية السمية العصبية لمركب-٦-هيدروكسي دوبامين لتوضيح هل السمية تعود للأكسدة الذاتية له إلى أورثو - كينون أو إلى التداخل مع مجاميع الثيول حيث نفذت الدراسة على خلايا البلاستوما العصبية (Neuro blastoma cells) . فتثبيط الثيميدين والمنظم للنيكوتين أميد داي نيوكليوتيد (NAD) أستخدم كمقياس للسمية الخلوية . ولقد قورن مركب٦-هيدروكسي دوبامين مع عدد من المركبات قريبة التركيب مثل الإبينفرين والنورابينفرين و ٥,٤,٢ - تراى هيدروكسي فينيل الأنين حيث ظهر أن المركب الأول أكثرها سمية ويدخل فى تفاعلات الأكسدة الذاتية بينما مركب أورثوكينون ومركب ٦- هيدروكسى دوبامين يتفاعلا فقط مع مجاميع الثيول بدرجة ضعيفة .

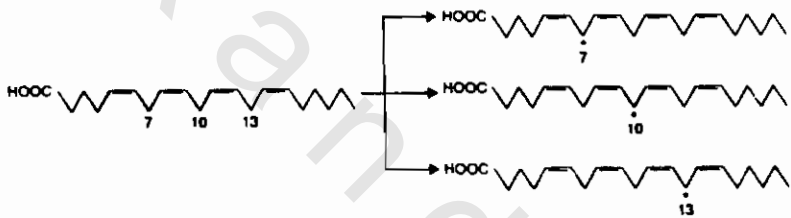
وبتحضين خلايا العضلات القلبية مع المركب الأدرينالينى (Sympatho mimetic : Isoproternol) أدى لزيادة فى تركيز أيون الكالسيوم

السيتوسولى متبوع بتخريب خلوى والذى أمكن منعـــة بأضافـــة فيتـــامين ج للتحضين .

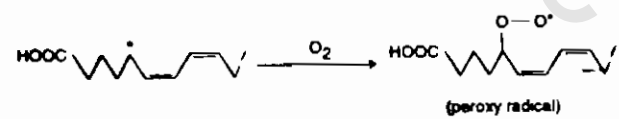
٢-٢ الأكسدة الفوقية للبيبيدات (Lipid peroxidation):

بالإضافة للخلل فى أتزان أيون الكالسيوم فإن الضغط التأكســدى والــذى يتبع أستنزاف المكافئات الأختزالية ربما يقود لسبب آخر لتخريـــب الغشـــاء والمسمى بالأكسدة الفوقية للبيبيدات فالأكسدة الفوقية وموت الخلية عادة مـــا يسيرا معاً . وهنا سنتناول بعض العمليات بالتفصيل والتى من خلالها تســبب هذه المركبات الوسطية تخريب الخلية :

- فعند تجريد ذرة الهيدروجين من سلسلة الأحماض الدهنية الغير مشبعة العديدة بأكسجين فردى وشق هيدروكسيلى (تكوين الشقوق -المبـــادرة) . حيث يتم النزع عند أماكن تقابل مجموعتين الليلتين (٧و١٠)،١٣ :

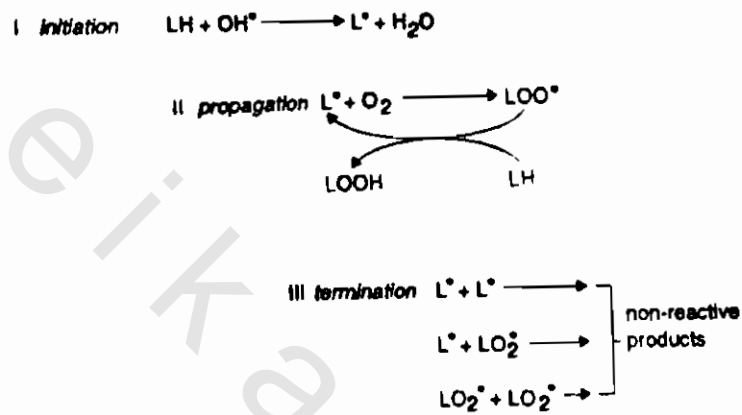


- تفاعل نواتج شقوق الأحماض الدهنية مع الأكسجين الجزيئى :أكسـجنة (oxygenation) أو الأكثر تخصصا (الأكسدة الفوقية) أما بالنسبة لعمليـة الأكسجنة فلو كان الجزيئى الفوقى فى موقع متـــاخم للرابطـــة الزوجيـــة بهيكل الحمض (موقع١٥) ينتج هيدروبيروكسيد :



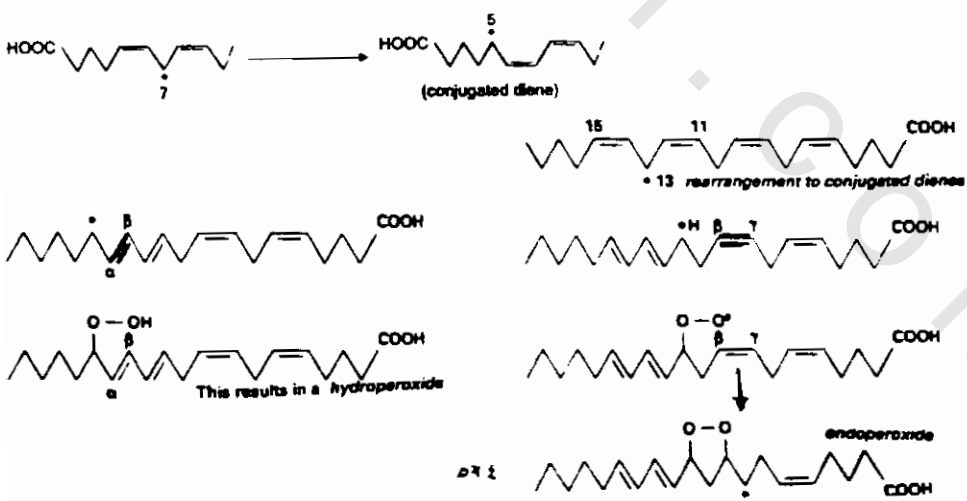
- ومن شقوق الهيدروبيروكسيدات الناتجة ربما تتكون تحت تأثير أيـــون الحديد (Fe^{2+}) خلال تفاعل هابرفايس أو ربما تنشق هذه الشـــقوق فـــى

الموضع (α) مع الأخذ فى الأعتبار أنه عندما تكون الرابطة الزوجية بالحمض بالموضع (١١) يتكون الشكل الحلقى ويسمى بالبيروكسيد الداخلى :



شكل رقم (١٢-٦) : مراحل الأكسدة الفوقية للبيبيدات .

يلى عمليات إنهيار السمية والتى فيها تقف سلسلة التفاعل وهذه العمليات تحدث فى عدة خطوات يشار إليها بالنهاية (Termination) كما سبق وهنا تترتب الشقوق المتكونة لتعطى إرتباط ثابت (diences) كما يلى :



وبكسر فوق الأكسيد الداخلى ينتج مالون داى ألدهيد ونواتج أخـــرى . وإذا ما أشتملت العمليات الســـابقة الأغشـــية الحيويـــة (كأغشـــية الخلايـــا الإندوبلازمية الشبكية وأغشية المتيوكوندريا وأغشية اللسيوســـومال) فأنـــها تسبب تخريب أو هدم قوى لهذه الأغشية .

كذلك يؤثر الشق الهيدروكسيلى الأكسيجينى الفردى على تركيب الغشاء بطريقة غير مباشرة من خلال نواتج الأكسدة الفوقية لليبيد مثـــل مـــالون داى ألدهيد. وبتكثيف الربط العرضى (cross-linking) والمالون داى ألدهيد مـــع مجاميع الأمين الأولية فـــى البروتينـــات والفوســـفوليبدات فينتـــج نواتـــج فلوروسنتية ذات أوزان جزئية عالية عند طول موجى٤٧٠ نـــانوميتر عقـــب أثارتها بطول موجى٣٦٠-٣٨٠ نانوميتر وهو ما يسمى بقاعدة شيف (Schiff base) .

ولدرجة هذه الرابطة علاقة مع العمر فنسيج الرئة لكبار الســـن يظـــهر إحتوائه على كثير من النواتج ذات الأوزان الجزيئية العلية و التـــي تظـــهر إشعاع فلوروسيني أكثر قوة عن الأشخاص الأصغر سنا و يرجع السبب أنـــة يتقدم العمر فإن القدرة على عزل أنواع الأكسيجين النشطة تقل . وكما ســـبق فإن الأكسدة الفوقية لليبيدات وموت الخلية عادة ما يسيرا جنبا لجنـــب ومـــع ذلك فليس واضحاً أن موت الخلية ينتج من الأكســـدة الفوقيـــة لليبيـــدات أو العكس .

فعند دراسة السمية على مركب أسيتامينوفين فى خلايا الكبد المعزولـــة فالعامل المختزل داى سفليد داى ثيوثريتول (Disulfide dithio thretol) يعطـــى الحماية ضد التأثيرات السامة ولكن ليس ضد الأكسدة الفوقية لليبيدات .

طرق تقدير الموت الموضعي :التنكرز والإرتباط التساهمى والأكسدة الفوقية للدهون :

ثبات مستوى التنكرز (Establishing the Necrosis level) :

بعد الموت الموضعي : التنكرز مرحلة متقدمة وعادة ما تكون مرحلـــة غير عكسية لتلف (فساد) الخلايا ومحتوياتها كالميتوكوندريا واللسيوســـومات والشبكة الإندوبلازمية الناعمة (SER) والخشنة (RER) وتتميز بوجود أجـزاء الخلية (Cell fragment) مثل الأجزاء الميتوكوندرية واللليسوســـومية وأغشـــية الخلية والإندوبلازم الشبكيى الخشنة المحببة وأنوية الخلية والخلايا الميتة .

ومن الأهمية فى أبحاث السمية الخلوية دراسة التغيرات المورفولوجية باستخدام الميكروسكوب الإليكترونى وهناك أدلة تشير بأن نتائج الأبحاث المورفولوجية ربما تعزى للأبحاث الآلية وعلى سبيل المثال :

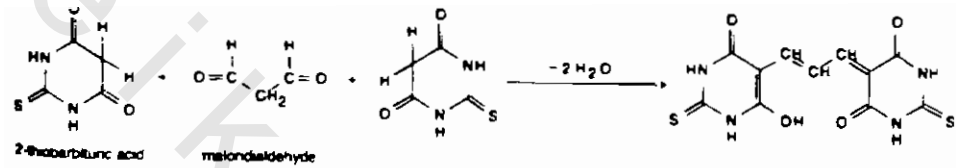
المواد ذات السمية الكبدية تحدث بثرات (blabbing) لأغشية الخلايا الكبدية وبدراسة الأسباب المحتمل أنها السبب فى تكوين البثرات مقارنة بثالث بيوتيل هيدروبيروكسيد $\{(CH_3)_3\text{-}C\text{-}COOH\}$ وآليل أيسوسيانات $\{CH_2=CH\text{-}CH_2N=CS\}$.

وتظهر البثرات نتيجة لتلف الميتوكوندريا عدا حالة آليل أيسوسيانات وكنتيجة لهدم الخلايا ومكوناتها تنفرد أنزيمات مثل بيتا جليكورونيديز من الليسوسوم كما ينفرد الفوسفاتيز الحامضى والقاعدى واللاكيتك ديهيدروجينيز (LDH) والألينين أمينوترانس فيريز (AIT) والأسبارتات أمينوترانس فيريز (APT) والأيزوستيرات ديهيدروجينيز من السيتوسول ويصاحب هذا الأنفراد زيادة فى نشاطهم فى بيئة التحضين وهذه الزيادة عموما تستخدم كدلائل فى تقدير السمية الخلوية كمقياس حساس .

تقدير الارتباط التساهمى والأكسدة الفوقية لليبيدات :

لتقدير الأرتباط التساهمى لمادة مع البروتين يلزم أن تكون المادة معلمة وبعد التحضين معها تعزل وتجانس الخلايا وبالطرد المركزى يتكشف المتجانس ويعطى الأجزاء المتكون منها البروتين والتى بإحداها تكون المادة المعلمة مرتبطة. وتستخدم طرق مختلفة لتقدير الأكسدة الفوقية لليبيدات كطريقة حمض الثيو باربيتيوريك ومنها تكون نواتج الأكسدة الفوقية لليبيدات مثل مالون داى ألدهيد تتكثف مع الحمض كما بالمسار ، شكل رقم(١٢-٧) : ونواتج التكثيف الناتجة لها أقصى امتصاص عند ٥٣٥ نانوميتر وهذه الطريقة غير متخصصة بالنسبة للمالون داي ألدهيد (MDA) ومن عيوبها أن المالون داى الدهيد يدخل فى تفاعل تمثيل داخل الخلية .

أما الطريقة الثانية فهى تقدير أسبكتروفوتومترى للدايين (Dienes) الناتجة من الأكسدة الفوقية حيث أقصى أمتصاص عند ٢٣٣ نانوميتر . وطريقة أخرى حيث النواتج ذات الوزن الجزيئي العالى الناتجة من (Cross linking) مع المالون داى ألدهيد تقدر فلوريا (fluorimetrically) .



شكل رقم (١٢-٧): التفاعل التكثيفى للمالون ذاى الدهيد مع ٢-ثيو باربيتيوريك