A study on *Cucumber sativus* and *Citrullus colocynthus* Seeds Lectins As Immunomodulators in the Rabbit

A thesis

Submitted to the Council College of Science
University of Babylon
In Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science
In biology / Microbiology

By

Ali Malik Saad Al- Khafaji

Jan. 2005 Dhu - hijja 1425

دراسة لكتينات بذور الخيار والحنظل باستعمالها محورات مناعية في الارنب

رسالة مقدمة
إلى مجلس كلية العلوم – جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في
علوم الحياة/ علم الأحياء المجهرية

من قبل
علي مالك سعد الخفاجي

ذي الحجة 1425 هـ كانون الثاني 2005 م

بسم الله الرحمن الرحيم

۞ وَعِندَهُ مَفاتِحُ الغَيبِ لا يَعلَمُها
اِلاّ هُوَ وَيَعْلَمُ ما فِي البَرّ
وَالبَحرِ وَما تسقُطُ مِن وَرَقةٍ اِلاّ
يَعلَمُهَا وَلا حبّةٍ في ظُلُماتِ
الاَرضِ وَلاَ رطبٍ وَلا يابِسٍ
اِلاّ في كتابٍ مبُينٍ ۞

صدق اللهُ العلِي العظيمَ
سورة الأنعام الآية

59

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم / جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية .

التوقيع:
اسم المشرف: أ. **د. إبراهيم محمد سعيد شناوه**
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم/قسم علوم الحياة – جامعة بابل
التاريخ: / / 2005

توصيـة رئيس قسم علوم الحياة

إشارة الى التوصية أعلاه المقدمة من قبل الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الراي فيها.

التوقيع:
الإسم: **أ. د. علي شعلان الاعرجي**
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم – جامعة بابل
التاريخ: / /2005

قرار لجنة المنا قشة

نحن أعضاء لجنة التقويم و المناقشة نشهد بأننا اطلعنا على الرسالة الموسومة دراسة لكتينات بذور الخيار والحنظل باستعمالها محورات مناعية في الأرنب و قد ناقشنا الطالب علي مالك سعد الخفاجي في محتوياتها و فيما له علاقة بها و ذلك بتاريخ 17 / **4 /2005** ووجدنا أنها جديرة بالقبول بتقدير **(جيد جدا)** لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / علم الأحياء المجهرية .

رئيس اللجنة
التوقيع:
الاسم : د . جعفر كاظم نعمة
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة الكوفة / كلية الطب
التاريخ: / /2005

عضو اللجنة

عضو اللجنة:

التوقيع:
الاسم: د. عودة مزعل ياسر
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل / كلية العلوم
التاريخ: / /2005

التوقيع:
الاسم: د. علاء جواد حسن
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل / كلية العلوم
التاريخ: / /2005

التوقيع:
عضو اللجنة(المشرف):
الاسم: **أ. د. إبراهيم محمد سعيد شناوه**
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم /جامعة بابل
التاريخ: / /2005

مصادقة عمادة كلية العلوم – جامعة بابل

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع:
الأسم: **د. عودة مزعل ياسر**
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان : جامعة بابل / كلية العلوم
التاريخ: / /2005

شكر وتقدير

يسعدني وقد أنهيت دراستي هذه ان أتقدم بالشكر الجزيل إلى استاذي الفاضل الدكتور **ابراهيم محمد سعيد عبد الواحد شناوه** لاقتراحه موضوع البحث والاشراف والمتابعة الدائمة والآراء السديدة داعياً الله العلي القدير ان يمنحه الصحة الدائمة وان يمد في عمره انه سميع مجيب الدعاء.

كما أتوجه بالشكر الجزيل إلى السيد رئيس جامعة بابل وإلى السيد عميد كلية العلوم الأستاذ الدكتور **عودة مزعل ياسر** وإلى السيد رئيس قسم علوم الحياة لاتاحتهم الفرصة لي لاكمال دراستي.

كما أتقدم بالشكر والتقدير إلى طلبة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة وإلى كل من مدّ يد العون والمساعدة في اتمام هذا البحث متمنياً للجميع النجاح والتوفيق.

كما اتقدم بالشكر للاستاذ الدكتور **خيري عبد الله داوود** لتقويمه الرسالة علميا. والى الاستاذ المساعد الدكتور محسن حسين علي لتقويمه الرسالة لغوياً.

كما اتقدم بالشكر إلى طالبي الدراسات العليا **نصير جواد المختار ومحمود حسين هدوان** متمنياً لهما التوفيق الدائم.

ولا أنسى ان أتقدم بالشكر الجزيل إلى الست **لمى مجيد** لطباعتها الرسالة متمنياً لها التوفيق الدائم.

علي

الخلاصة

تهدف هــذه الدراسة الــى فصل لكتينات بذور نباتَيْ الخيار (*Cucumber sativus*) والحنظل (*Citrullus colocynthus*) ودراسة اثرها المحور في الاستجابة المناعية في موديل تجريبي لحيوان مختبريّ كالارانب. إذ جرى فصل اللكتين بطريقة الاستخلاص المائي البارد وتنقيته جزئياً بالانفاذ (Dialysis) والتخلص من بعض الموادّ المخالطة باستخدام مبدأ التمليح بكبريتات الامونيوم (40 %) مشبعاً ووصفها جزئياً وشمل الوصف تفاعل بايوريت لتحديد تركيز البروتين، إذ وجد أن تركيز البروتين للخيار 17.40 ملغم/مل في حين وجد ان تركيز بروتين الحنظل 11.5 ملغم/ مل.

واستخدام ظاهرة الاستقطاب لتحديد نوع السكر المرتبط بالبروتين، حيث ظهر بأن المستخلص يحتوي سكريات مشابهة في سلوكها لسكر الكلوكوز من خلال قياس معامل الانكسار وزاوية الانقلاب لكلا المستخلصين (1.335442، 2.74433 للخيار و 1.335542، 2.744335 للحنظل)واستخدام خاصية التلازن الدمويّ المباشر لكريات الدم الحمر للخراف (الخيار 128، الحنظل 2048) بعد ذلك تم دراسة اثرها المحور على الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية للطورين الأوليّ والثانويّ وشمل التحوير المناعيّ تحديد الجرعة المفيدة لحدوث التحوير المناعي اذ تم تجريع ارانب المعاملة بتركيزين 10 ملغم/ مل و5 ملغم/ مل وظهر بان الجرعة 10 ملغم / مل ذات أثر سميّ حادِّ ومميت لحيوانات المعاملة فتم استبعادها من برنامج التمنيع بينما اظهرت الجرعة 5 ملغم /مل نتائج مشجعة فتم اعتمادها في دراسة الأثر المحور لنباتي الاختبار على الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية للطورين الأوليّ والثانويّ. حيث جرى الحكم على حصول التحوير المناعي الخلطي من خلال دراسة عيار الضد المتخصص بمستضد مشتق البروتين المنقى بينما جرى الحكم على حصول التحوير المناعيّ الخلويّ بوساطة اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض واختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة.

أظهرت النتائج أن لكتين الخيار ذو اثر محفز للاستجابة المناعية الخلطية الثانوية وذو اثر غير واضح في الاستجابة المناعية الخلطية الأولية. بينما أظهر لكتين الحنظل تاثيراً محفزاً للاستجابة المناعية الخلطية الاولية والثانوية.

واما بخصوص الاستجابة المناعية الخلوية فوجد أن لكتين الخيار ذو أثر محفز للاستجابة المناعية الخلوية الاولية والثانوية ولكل من معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض واختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية. ولكن عند اعطاء جرعة اضافية ثانية منه أدى إلى تحول تفاعل تثبيط الهجرة الخلوية إلى الناحية غير المعنوية وخفض تفاعل الجلد.

أما الأثر المحور للكتين الحنظل في الاستجابة الخلوية فكان محفزاً لتفاعل تثبيط هجرة الخلايا ومثبطاً لتفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية وللاستجابتين الأولية والثانوية. ولكن عند إعطاء جرعة إضافية ثانية منه أدى إلى تحول تفاعل هجرة الخلايا إلى الناحية غير المعنوية وهذا يفسر على إن لكتين الحنظل أدى إلى تثبيط السايتوكاينات المثبطة لهجرة الخلايا البيض .

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة
-1	المقدمة	1
-2	استعراض المراجع	5
1-2	الاستجابة المناعيّة	5
2-2	سبل تنظيم الاستجابة المناعيّة	13
3-2	التحوير المناعيّ وألياته	16
4-2	موديلات دراسة التحوير المناعيّ	23
5-2	المحورات المناعيّة	27
6-2	اللكتينات بوصفها محورات مناعية	32
-3	المواد وطرائق العمل	36
1-3	المحاليل المستعملة	36
2-3	الأوساط الزرعية	39
3-3	فصل المحاليل اللكتينية من بذور النباتات	40
4-3	وصف اللكتينات	41
5-3	الكواشف المناعيّة	49
6-3	الأرانب	49
7-3	الفرز الغشائيّ	50
8-3	تحديد جرعة اللكتين المفيدة لدراسة الأثر المناعيّ	51
9-3	برامج التمنيع	51
10-3	استحصال الامصال وحفظها	54
11-3	دراسة اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة في الأرنب	57
12-3	تحديد التحوير المناعيّ	57
13-3	بذور النبات	58
14-3	معايير تحديد التحوير المناعيّ	58
15-3	منوال الدراسة	59
-4	النتائج	61
1-4	الوصف الجزئي	61
2-4	اثر لكتينات بذورالخيار والحنظل المحور للمناعة الخلطية	64
3-4	أثر لكتينات الخيار والحنظل المحور للمناعة الخلوية	69
-5	المناقشة	80
1-5	النبات بوصفه دواء الامس واليوم والغد	80
2-5	اللكتينات النباتية بوصفها محوراً مناعياً اختبارياً	81
3-5	مشتق البروتين المنقى (التيوبركلين)	88

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة
4-5	الجهاز المناعيّ الاختباري	90
5-5	اثر لكتين بذور نباتيَْ الاختبار في الاستجابة المناعيّة الخلطية للارانب	90
6-5	اثر لكتينات بذور نباتي الاختبار في الاستجابة المناعيّة الخلوية	91
7-5	الاستنتاجات	95
8-5	التوصيات	95
	المصادر العربية	96
	المصادر الاجنبية	97
	الخلاصة باللغة الانكليزية	A-B

الاشكال

رقم الشكل	اسم الشكل	الصفحة
1-3	مخطط يبين طريقة الاستخلاص المائيّ	41
2-3	منحني المعايرة القياسّي الذي يوضح العلاقة بين التركيز القياسيّ للألبومين مقابل الكثافة الضوئية	44
3-3	مخطط يوضح منوال الدراسة	60
1-4	يبين منحني المعايرة لتقدير تركيز السكر من المستخلص	62
2-4	الدورة الزمنية للاستجابة المناعية الخلطية الأولية والثانوية لحيوانات السيطرة (C) وأثر لكتينات بذور الخيار (Cs) وأثر لكتينات بذور الحنظل (Cc)	68
3-4	الاستجابة المناعية الخلوية الأولية المتخصصة بالتيوبركلين لحيوانات السيطرة(C) وتلك المعاملة بلكتين الخيار (Cs) والمجموعة المعاملة بلكتين الحنظل (Cc) بدلالة قطر التثخن لتفاعل الجلد.	72
4-4	صورة لاختبار الجلد في الأرنب المحفز بمستضد التيوبركلين	73
5-4	الاستجابة الخلوية المناعية الاولية(A) وتفاعل المجموعة الثانوية (B) في حيوانات السيطرة (C) والمعاملة بلكتين بذور الخيار (Cs) ثم المعاملة بلكتين بذور الحنظل (Cc) بدلالة معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض	76
6-4	الاستجابة الخلوية المناعية الأولية (A) والاستجابة الخلوية المناعية الثانوية (B) في حيوانات السيطرة (C) والمعاملة بلكتين بذور الخيار (Cs) ثم المعاملة بلكتين بذور الحنظل (Cc) بدلالة نسبة تثبيط هجرة الخلايا البيض	77

قائمة الجداول

رقم الجدول	اسم الجدول	الصفحة
1-3	البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسيّ لتركيز محلول الالبومين ولتخافيفه القياسيّة	43
2-3	يبين الجرع التي تم استعمالها في تجريع الحيوانات	51
3-3	برنامج تمنيع لمعرفة تأثير كلّ من المستضدّ والمحور على الاستجابة المناعية الأولية الخلطية والاستجابة المناعية الأولية الخلوية	52
4-3	برنامج تمنيع لمعرفة تأثير كلّ من المحوراللكتيني والمستضد على الاستجابة المناعية الثانوية الخلطية والاستجابة المناعية الثانوية الخلوية	53
5-3	النباتات المستعملة والاسم العلمي والشائع واسم العائلة إزاء كلّ منها	58
1-4	الوصف الجزئي للكتينات البذور الجافة لنبات الخيار والحنظل	61
2-4	معامل انكسار الكلّوكوز القياسيّ	62
3-4	الاثر المحور للاستجابة المناعية الخلطية الأولية والمحتمل لكلّ من لكتين بذور الخيار وبذور الحنظل	65
4-4	يبين المعالم والبيانات الإحصائية لأثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعية الخلطية الأولية	66
5-4	الأثر المحور للاستجابة المناعية الخلطية الثانوية المحتمل لكلّ من لكتين بذور الخيار وبذور الحنظل	67
6-4	يبين المعالم والبيانات الاحصائية لاثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعية الخلطية الثانوية	68
7-4	معامل تثبيط الخلايا البيض دليلاً للتحوير المناعيّ الحاصل في الاستجابة المناعية الخلوية (الأولية)	70
8-4	يبين المعالم والبيانات الاحصائية لاثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعية الخلوية الأولية	71
9-4	الاستجابة المناعية الخلوية الأولية بدلالة تفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة لدراسة التحوير المناعي المحتمل بالأرنب	71
10-4	يبين المعالم والبيانات الإحصائية لأثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعية الخلوية الأولية بدلالة تفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة بالتيوبركلّين	74
11-4	الاستجابة المناعية الخلوية (الثانوية) بدلالة تفاعل تثبيط هجرة الخلايا لدراسة التحوير المناعيّ المحتمل بالأرانب	76
12-4	يبين المعالم والبيانات الإحصائية لأثر لكتينات الخيار والحنظل	78

رقم الجدول	اسم الجدول	الصفحة
	على الاستجابة المناعية الخلوية الثانوية	
13-4	الاستجابة المناعية الخلوية الثانوية اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة ومدى التأثر بوجود لكتينات بذور الخيار والحنظل	78
14-4	يوضح الأثر المحور للكتين كلّ من الخيار والحنظل على الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية وعلى طوريهما الأولي والثانوي	79

قائمة الرموز والمختصرات

الرمز أو الاختصار	المفردة الاصطلاحية	المعنى
AFCs	Antibody forming cells	خلايا منتجة للضد
BALT	Bronchus - associated lymphoid tissues	الانسجة اللمفية المشاركة للاقنية التنفسية
BCR	B cell receptors	مستلمات الخلية اللمفاوية B
BHV-I	Bovine herpes virus	فايروس الهربس البقري
CD	Clusters of differentiation	عناقيد التمايز
ConA	Coneanavalin A	أحد أنواع اللكتينات
D	Dextrorotary	ايمن الدوران
DTH	Delayed type hyper sensitivity	فرط الحساسية المتأخر
GALT	Gut- associated lymphoid tissues	الأنسجة اللمفية المشاركة للاقنية الهضمية
HAS	Human albumine serum	الالبومين المصليّ البشريّ
I.D	Intradermal	تحت الأدمة
IL	Inter leukin	أحد أنواع السايتوكينات
IFN	Interferon	أحد أنواع السايتوكاينات
LDH	Lactate dehydrogenase	لاكتيت ديهايدروجينيز
MALT	Mucous- associated lymphoid tissues	الأنسجة اللمفية المشاركة للأغشية المخاطية
MHC	Major histocompatibility complex	مستضدات معقد التوافق النسيجيّ
PHA	Phytohaemagglutinin	أحد أنواع اللكتينات (ملزن الدم النباتيّ)
R.I	Refractive index	معامل الانكسار
S’ IGA	Secertory immunoglobalin A	الكلوبيولين المناعي الافرازي A
TCR	T Cell receptors	مستلمات الخلية اللمفاوية T
TNF	Tumor necrosis factor	عامل تنخر الورم

الفصل الأول CHAPTER ONE
المقدمة: Introduction

اللكتينات : عبارة عن بروتينيات متكونة من ببتيدات متعددة على شكل سلاسل مفردة متكونة من مئتين وسبعة وثلاثين حامضاً أمينيا وكل سلسلة تتكون من موقعين أحدهما للارتباط بالسكر عن طريق الأواصر التساهمية، والآخر للارتباط بالأيونات الفلزية وتصنف على أنها بروتينيات سكرية (Sharon, 1993).

وهناك تعريف آخر للكتينات حيث عرفت على أنها بر وتينات آو بروتينيات سكرية غير أنزيمية ترتبط مع الكاربوهيدرات ذات أصل غير مناعي (Goldstein *et al*.,1980; Hoson &Masuda, 1995). أشار (Barondes, 1988; Arason,1996) إلى أن اللكتينات بروتينات رابطة للسكر خاصة السكر الثنائي المانوز لذلك عرفت Mannose binding protein وهي ليست أنزيمات أو أجساماً مضادة (Anti bodies).

عزلت اللكتينات من النباتات والحيوانات والحشرات والأحياء المجهرية، ووصفت المئات منها وما زالت دراسات التوصيف مستمرة في هذا المجال (Sharon ,1993). توجد اللكتينات وبنسبة عالية جداً في بذور النباتات مقارنةً بأجزائها الخضرية (Beeley, 1985) . وقد عزل اللكتين لأول مرة من بذور فاصوليا جاك (Jack bean) والاسم العلمي له Canavalia ensiformis عزل على هيئة بلورات من المستخلص الخام (Summer, 1919) . ولكتينات النباتات بصورة رئيسة تحتوي معظمها مواد كاربوهيدراتية مرتبطة معها بأواصر تساهمية ولكن هذه الكاربوهيدرات لاتساهم في الفعاليات الحياتية للكتينات.

أما لكتينات الحيوانات الفقرية فتقسم إلى مجموعتين الاولى هي جزء من الأغشية وتحتاج إلى مواد منظفة (detergents) لاستخلاصها والثانية هي اللكتينات الذائبة.(Arason,1996)

إن بعض اللكتينات النباتية لها القدرة على تلزين الخلايا الدموية للإنسان واللبائن والبرمائيات والمجاميع الفقرية واللافقرية الاخرى، وكذلك تمتلك القدرة على تحفيز الخلايا على الانقسام مما جعلها مهمة على صعيد البحث في دراسة الخلايا ولا سيما الخلايا اللمفاوية بنوعيها الخلايا اللمفاوية البائية والخلايا اللمفاوية التائية من هذه اللكتينات :-

1- Concanavalin A ويرمز له (Con A) وهو لكتين نباتيّ رابط للسكر α D-manose , α .D-glucose.ملزن لكريات الدم مصدره نوع من البقول يطلق عليها بقول جاك (Jack bean) اسمها العلمي Canavalia ensiformis هذا اللكتين يحفز خلايا الإنسان اللمفاوية على الانقسام خاصة الخلايا T. فعند تعرض هذه الخلايا للكتين تتنبه وتفرز بعض العوامل مثل اللمفوكينات والانترفيرون. وقد يغير اللكتين من حالتها الوظيفية فتتحول مثلاً الى خلايا سمية للخلايا (Cytotoxic) وكذلك يغير

من شكلها في الزرع النسيجيّ فتتحول من خلايا لمفاوية صغيرة إلى خلايا لمفاوية نشطة كبيرة الحجم لها فعاليات كيموحيوية معقدة. (السعد والزبيدي , 1991)

2- ملزن الدم النباتيّ Phytohaemagglutinin يرمز له (PHA) وهو نوع من اللكتينات ينبه الخلايا اللمفاوية T و B في الإنسان على الانقسام ملزن لكريات الدم الحمر مصدره نوع من البقول (red kideny bean) اسمها العلمي Phaseolus vulgaris هذا النوع من اللكتين متخصص بالسكر (Acetyl D-Galactosamine) . (السعد والزبيدي , 1991)

3- مايتوجين الأعشاب (Pokeweed mitogen) موادّ مستخلصة من جذور العشب واوراقه وسيقانه وثماره (phytolacca americana) ملزنة ضعيفة لكريات الدم الحمر ولكنها محفزة شديدة لانقسام الخلايا اللمفاوية T وB وخاصة الخلايا B في الإنسان ومنشط لكلا النوعين من الخلايا في الفئران. إن المادة الفعالة في هذه المستخلصات بروتينية التركيب (السعد والزبيدي، 1991).

التركيب العام للكتين المعروف بـ Concanavalin A الذي يرمز له اختصاراً بـ (Con A) هو وحدات متطابقة Identical units كلّ وحدة تتألف من مئتين وسبعة وثلاثين حامضاً امينياً وأيون كالسيوم واحد وأيون منغنيز واحد وموقع رابط واحد للكاربوهيدرات على النقيض من معظم اللكتينات لا يحتوي هذا اللكتين الكاربوهيدرات ولا يملك مجموعة إضافية أخرى.

إن تسلسل الأحماض الأمينية يظهر بعض الهيئات غير الاعتيادية وهي وجود بقايا (Residues) 11 فنيل-الانيل تقع كلها في نصف الطرف الكاربوكسيلي للجزيئة وكلّ اللكندات (Ligands) البروتينية لايونات المعادن تقع في المنطقة القصيرة المحبة للماء Hydrophilic short region قرب الطرف الاميني. (Cunningham *et al.* , 1976)

اللكتينات هي بروتينات مرتبطة بالكاربوهيدرات التي تعرف بأنها ذات ألفة تخصص عالية للمخلفات السكرية على غشاء الخلية. لكتينات كثير من النباتات تستخدم كمجسات (probes) لوصف تركيب الاقتران السكري وتنظيمه Glycoconjugates على سطح الخلية والتغيرات التي تعانيها خلال التمايز والتحول السرطانيّ الخبيث.

اللكتينات المفردة ترتبط بالتراكيب بصورة انتقائية عالية وبسبب الانتقاء السكري المتخصص تظهر فعاليات بايلوجية متميزة. الدراسات حول اللكتينات توفر الفهم للآلية الجزيئية لنمو الخلايا وتمايزها، السرطانات الخبيثة، الاستجابة المناعية، تركيب الاغشية الخلوية وتنظيمها. واعتبرت اللكتينات أدوات بايوتكنولوجية جذابة بسبب الثبات والتخصص العاليين لتحديد الكاربوهيدرات وعمل التحوير الكيميائي والاقتران (Sharon ,1993).

آما الوظائف الرئيسة للكتينات فهي الآتي كما في (Sharon, 1976):-
1- تلازن الخلايا الحمر للفقريات والانسان.
2- تلازن الخلايا اللمفية بنوعيها الخلايا اللمفاوية التائية والبائية.
3- تلازن الخلايا السرطانية وامكانية استخدامها في التشخيص.
4- تشطير الخلايا اللمفية بنوعيها الخلايا اللمفاوية التائية والبائية.
5- عوامل فصل للخلايا من الفقريات.
6- تلازن البكتريا والفايروسات.
7- تثبيط النمو الفطريّ.
8- تثبيط عملية البلعمة بوساطة الخلايا الحبيبية.
9- تعمل عمل الأنسولين على الخلايا الدهنية.
10- تثبيط إخصاب البيضة بوساطة النطفة.
11- ترسيب السكريات المتعددة والبروتينات السكرية.
12- العمل كمحوراتً مناعيةً ومضادة للسرطان
(Wang *et al.*, 1998 ;Shnawa *et al.*, 2004)

إن خفض المناعة وتضخيمها بالسبل العلاجية الكيميائية يرافقه مدًى مقبول وربما غير مقبول طبّياً في الحالات التي تستدعي تداخل تحوير مناعيّ كأمراض نقص المناعة التي تحتاج للتضخيم وأمراض المناعة الذاتية وفرط الحساسية التي تحتاج إلى خفض مناعة (Parslow *et al.* 2001)، لذا صار التوجه نحو البحث عن بدائل نباتية المصدر ممكنة الاستخدام بوصفها محوراتٍ مناعيةً إذ وجد بان لكتين الدخن ولكتين البطيخ لهما وسع محور للمناعة في موديل الأرنب (Shnawa *et al.*, 2004) وفي هذه الدراسة محاولة لفصل لكتينات بذور الخيار والحنظل ووصفها ودراسة إمكانية عملها كمحوراتً مناعيةً وبموديل الأرنب أيضا.

الفصل الثاني Chapter two
استعراض المراجع Literature review

1-2 الاستجابة المناعية Immune response

يحتوي جسم الحيوانات كلّ المكونات الضرورية لدعم الحياة واستمرارها ونتيجةً لذلك تكون الأنسجة الحيوانية ذات جاذبية لمدى واسع من الأحياء المجهرية والأجسام الغريبة التي تهاجم ذلك الجسم . إن هذه الأنسجة الحية تكون ذات مقاومة عالية ضد الغزو الماكروبي هذه المقاومة العالية تعود إلى جهاز كامل ومعقد ويقوم بأدوار مهمة في المحافظة على صحة الفرد والموازنة بين أعضائه المختلفة، ذلك الجهاز هو الجهاز المناعيّ Immune System ويتكون الجهاز المناعيّ من الجهاز المناعيّ الجهازي Systemic Immune System والجهاز المناعيّ الموضعيّ Local Immune System تنضبط نشاطات هذا الجهاز الدفاعية المتمثلة بالاستجابة المناعية بمختلف أشكالها بالمحتوى الوراثيّ للفرد (Roitt & Rabson,2000).

تحدث الاستجابة المناعية عند تعرض الجهاز المناعيّ الى المستضدات وتختلف هذه الاستجابة باختلاف طبيعة المستضدات الفيزياوية أو الكيمياوية او البايولوجية. حيث إن كلّ أنواع الاستجابة المناعية هي معقدة وتنظم بسلسلة من الأحداث المعقدة متضمنة عدداً من أنواع الخلايا الهدف عندما يدخل المستضد الجسم يجابه بنوع خاصّ من الخلايا تدعى بالخلايا المقدمة للمستضد Antigen presenting cells (APCs) وتقوم هذه الخلايا بسلب كمية صغيرة من المستضد وتظهره بالشكل الذي يستطيع ان يميز بوساطة الخلايا التائية المساعدة المتخصصة بالمستضد (Tizard, 1997).

هناك مجموعتان رئيسيتان من الخلايا اللمفاوية وهما الخلايا اللمفاوية البائية (B cells) والخلايا اللمفاوية التائية (T cells) , وهذان النوعان من الخلايا تمتلك مستلمات مختلفة للمستضدات ، مستلمات الخلية B (BCR) للمستضدات هي جزيئات مرتبطة بالغشاء ونتيجة لذلك الخلايا B تستطيع أن تشخص بوساطة وجود جزيئات الضد التي تعرف بالكلوبيولينات المناعية وهي مجموعة من البروتينات الكروية السكرية glycoproteins الموجودة في المصل وبعضها تحمل على سطوح الخلايا البائية وتعمل بوصفها مستقبلات للمستضدات المتخصصة آما ما تبقى منها فتكون حرة في مجرى الخلط الدمويّ او في الخلط اللمفيّ، وإن التماس بين الخلايا البائية الأولية Pro B والمستضد ينتج عنه تطور الخلايا البائية إلى خلايا منتجة للأجسام المضادة (Anti body forming cells(AFCS) التي يطلق عليها اسم الخلايا البلازمية التي تفرز كميات كبيرة من الأجسام المضادة، حيث تحتوي اللبائن على خمسة أصناف من الأجسام المضادة وهي IgE, IgD ,IgM, IgA, IgG (Roitt & Rabson,2000).

وتعتمد مستويات الكلوبينات المناعية المصلية على تطور مختلف العوامل البيئية والوراثية التي تتضمن العرق، العمر، الجنس، تاريخ التعرض إلى الممنعات أو الارجينات allergens او تكرار الاخماج والعوامل الجغرافية. وان العمر له تأثير في محتوى هذه الكلوبينات المناعية ، فالأطفال الرضع الأسوياء يولدون مع مستويات واطئة جداً من هذه الكلوبينات المناعية المصلية المنتجة، حيث ان الكلوبيولين المناعيّ IgG المصلي ينتقل من آلام إلى الطفل عن طريق المشيمة. واذا حدث أي خمج في الرحم فسوف يرتفع مستوى الكلوبيولين المناعيّ IgM أولا ثم IgG, IgA ولكن بعد الولادة فإن المستوى المصليّ الاميّ يتلاشى. وهنالك زيادة تدريجية ومتزايدة في مستويات الكلوبيولينات المناعية IgM, IgA, IgG حتى نهاية مرحلة المراهقة. وهنالك بعض الحالات غير الطبيعية لتراكيز IgG المصلي وهذه الحالات لم يتضح بعد ارتباطها مع الحالات المرضية المتخصصة. وإن تركيز IgG المصليّ مهم في تشخيص تغير الكلوبيولين المناعيّ ومتابعته في المرضى الذين يعانون نقصاً في الكلوبيولينات المناعية (Stites *et al*.,2001).

إن الذي يحدث في الاستجابة المناعية المتخصصة هو قيام خلايا البلاعم الكبيرة الملتهمة للمستضد بعملية هضم ذلك المستضد ومن ثم إظهاره على سطح الخلايا البلعمية الكبيرة ثم تقديمه الى الخلايا التائية المساعدة حيث بدورها تنشط الخلايا البائية للتضاعف وتكوين نساءل وتخليق الضد وإنتاجه . هذا وإن الخلايا المقدمة للمستضد يمكن ان تقدم المستضد مقترناً بجزيئات معقد التوافق النسيجيّ مباشرة للخلية B او بمساعدة الخلية T ، وقد تحفز الخلايا B بوجود الخلايا المقدمة للمستضد لانتاج الضد المتخصص بذلك المستضد (Roitt *et al*.,2000) إن الدور الذي تقوم به الخلايا البلعمية في بدأ تنظيم الاستجابة المناعية يمكن إجماله بما يأتي :

1. عملها على تركيز المستضدات .
2. تقديم المستضدات للخلايا اللمفاوية .
3. إفرازها عوامل مختلفة تؤثر بصورة مباشرة أو غير مباشرة في الاستجابة المناعية.
4. إفرازها السايتوكينات التي تقوم بوظائف حياتية كثيرة.
5. تنشيطها للخلايا اللمفاوية B وتنبيه الخلايا اللمفاوية T.

وتكون الاستجابة المناعية أولية وثانوية ويكون صنف الضد المتكون أولا هو IgM في الاستجابة الاولية ثم IgG في الاستجابة الثانوية ، وتنبه الاستجابة الثانوية بجرعة ثانية من المستضد تعطى للحيوان. حيث ينتج عن ذلك استجابة مناعية ثانوية تكون فيها كمية الاجسام المضادة اكثر وتبقى فترة زمنية أطول(Weir,1992) آما في ما يخص الاستجابة المناعية الخلطية المخاطية حيث تعد السطوح المخاطية الاماكن الرئيسة من جسم الانسان او الحيوان التي تجابه بيئته الخارجية بما تحتويه هذه البيئة من المستضدات موجودة في الأغذية والأحياء المجهرية والسموم ومولدات الحساسية (Rusch, 1982). ويتألف الجهاز المناعيّ المخاطيّ من الأنسجة اللمفية المشاركة للأغشية المخاطية Mucous-associated lymphoid tissues (MALT)

فـــي الأقنيـــة الهضميـــة Gut -associated Lymphoid tissues.(GALT) والتنفسيـة Bronchus- associated Lymphoid tissues.(BALT) والبولية التناسلية وهناك اختلافات جوهرية بين الجهاز المناعيّ المخاطيّ والجهاز المناعيّ الجهازيّ متمثلة بالخصائص الآتية التي يتميز بها الجهاز الأول (1) – سيادة الكلوبيولين المناعيّ IgA (2) وجود خلايا تائية ذات خصائص تنظيمية مؤثرة خاصة في الطبقة المخاطية (3) وجود نظام عبور خلويّ موجه عبر المنطقة الحاوية على الخلايا الغشائية للخلايا المحفزة ابتداءً فـي الجريبات المخاطية لتهاجر الى الأنسجة اللمفية المخاطية المنتشرة تحت الظهارة Subepithelium وهذه الخصائص الثلاث جعلت من الجهاز المناعيّ المخاطي كياناً مستقلاً بحد ذاته (Strober &James,1994).

وفي الاستجابة المناعية المخاطية يكون الكلوبيولين المناعيّ الافرازيّ S.IgA ثنائيّ القطعة ومعامل ترسبيه (11S) على حين يكون الكلوبيولين المناعيّ المصليّ IgA أحـــادى القطعـــة ومعامـــل ترســـيبه (7S) ويكـــون القليـــل منـــه (10S) (Kagnoff,1994).

وأوضح(Brandtzage & Frastd, 1999) أن الخلايا البلازمية تكون الكلوبيولين المناعيّ المخاطيّ S. IgM, S.IgA في حين ان الخلايا الظهارية تكون المكون الافرازيّ (Secretary component) لكلا الضدين الإفرازيين على حين تكون الخلايا البلازمية ومصدرها الخلايا البائية من نقي العظم المصدر الذي نشأت منه الاضداد المصلية.

وجد (Fargeas *et al*,1995) من خلال تجارب أجريت على الحيوانات المختبرية كخنزير غينيا حصول تعزيز الاستجابة المناعية المخاطية والجهازية بعد التهاب الأمعاء عند تحفيزها عن طريق الفم، اذ وجد IgA يزداد مخاطياً و IgG يزداد جهازياً دليل على ان الاستجابة المخاطية ليس من الضروريّ اعتمادها على المناعة الجهازية. ويزداد التأهيل للخلايا التائية في الصفيحة الأصلية للأمعاء في حالة التمنيع المخاطي عبر الفم ولا يلاحظ هذا في حالة التمنيع الجهازيّ (Kantle *et al*.,1991). وبذلك يكون استخدام العامل المساعد Adjuvant ضرورياً في حالة التمنيع المخاطي (Stass & Ennis 1999). أشار كلٌّ من (Shnawa Thwaini ,2000) إلى أن حقن خصى ومعي الأرانب بمستضدات المنحنيات الجنينية Cambylobacter fetus ادى إلى حدوث استجابة مناعية خلطية مخاطية في الخصى والمعي واستجابة مناعية خلطية جهازية.

النوع الثاني من الاستجابة المناعية المتولدة نتيجة التعرض المستضديّ تعرف بالاستجابة المناعية الخلوية Cellular Immune response وهي انتاج خلايا لمفاوية تحمل على سطوحها جزيئات شبيهة بالاضداد لها القدرة على التعرف النوعي للمستضدات. هذا النوع من المناعة يمنح الجسم حماية ضد بعض انواع البكتريا مثل مسبب التدرن *M.tuberculosis* وضد الفايروسات والطفيليات بصورة عامة. كما وتشمل هذه الاستجابة تفاعلات رفض الأعضاء المزروعة وابادة الخلايا

الورميـــة وبعـض تفـاعلات الحساسيـــة (السـعد والزبيـدي , 1991) وأشـار (Hyde,2000) إن الاستجابة المناعية الخلوية تقوم بالتعرف المستضدي باسلوب مشابه لما يحدث في التعرف المستضدي الذي تقوم به المناعة الخلطية ماعدا تفاعل ثلاث خلايا هي الخلايا المساعدة التائية ومولدات الخلايا السامة التائية وخلايا البلاعم الكبيرة . تعدّ الخلايا اللمفاوية T مسؤولة عن الاستجابة المناعية الخلوية وتفرز العديد من الافرازات يطلق عليها السايتوكينات تعمل على خلايا أخرى مثل وحيدات النواة الدموية والبلاعم الكبيرة في الأنسجة والخلايا اللمفاوية الأخرى والخلايا البدينة، من أهم إفرازاتها الانترفيرون (Interferon) الذي ينبه خلايا البلعم الكبير ووحيدات النواة الدموية على زيادة قتل الطفيليات والفيروسات داخلها ومن إفرازاتها أيضا الانترليوكين 2 (Interleukin2) الذي يعمل على خلايا لمفاوية أخرى لتضخيم التجاوب المناعيّ.

هذا وتمتلك الخلايا التائية مستلمات مستضدات الخلايا T (TCR) هذه المستلمات تتكون من جزيئات بروتينية متميزة على سطح الخلايا التائية هذه المستلمات تشترك مع تراكيب اخرى من البروتينات السطحية تستخدم لإعطاء الاشارات للخلية تدعى بروتينات CD وهي, CD_3, CD_4 , CD_8 . يوجد CD_4 على الخلايا التائية المساعدة (Stites *et al.* 2001).

أما CD_8 فيوجد على الخلايا T المثبطة والسامة للخلايا. وتوجد مجموعة كبيرة من المستضدات يطلق عليها المستضدات المعتمدة على الخلايا اللمفاوية (T) وهذه تعتمد على وساطة الخلايا T لتخليق أضدادها النوعية من قبل الخلايا اللمفاوية B.

أما المجموعة الأخرى من المستضدات فهي غير معتمدة على الخلايا اللمفاوية (T) وتقوم بتنبيه الخلايا (B) مباشرة لتخليق اضدادٍ نوعية بها (Hyde,2000).

وتعدّ عملية رفض الأعضاء مثالاً جيداً على الاستجابة المناعية الخلوية فمثلاً إذا أزيلت قطعة من الجلد من أحد الأفراد وغرست في فرد آخر فإنها سوف تقاوم حوالي 10 أيام وإن هذه القطعة سوف تظهر بداية بشكل صحيّ والأوعية الدموية سوف تتطور بين العضو المغروس والمضيف. وبعد مرور 7 أيام فإن هذه الأوعية الدموية الجديدة سوف تبدأ بالانحطاط. والتجهيز الدمويّ إلى الغرس ينقطع والغرس سوف يموت ويكون مضللاً. (Tizard , 1997)

في حين إن الغرس الثاني المأخوذ من الفرد المانح الاصلي والمغروس في نفس الفرد المستلم سوف يقاوم لمد يوم او يومين قبل بداية رفضه . (Tizard , 1997)

وهكذا فان رفض الغرس الأول يكون ضعيفاً وبطيئاً ومتشابهاً مع استجابة الضدّ الأوليّ. بينما الغرس الثاني يتحفز بشكل سريع ورفض قويّ ومتشابه بطرق كثيرة لاستجابة الضد الثانوي. رفض الغرس يشبه تكون الاجسام المضادة يكون متخصص والاستجابة الثانوية تحدث فقط اذا كان الغرس الثاني من نفس الشخص

المانح للغرس الاول. عمليات رفض الغرس كذلك تمتلك الذاكرة حيث ان عملية رفض الغرس الثاني قد تكون سريعة وقوية بعد عدة اشهر او سنين بعد فقدان الغرس الأول. (Tizard , 1997)

يعد فرط الحساسية المتاخرة (DTH) هو أحد أنماط فرط الحساسية المتوسطة بالخلايا التائية ويمكن الكشف عنها من خلال التفاعلات الجلدية البطيئة التي يتم من خلالها تقدير الاستجابة المناعية الخلوية لمعرفة الحساسية الجلدية لمستضد معين، أو مجموعة من المستضدات وهو ذو أهمية كبيرة في تقدير الكفاءة المناعية وكذلك المسوحات الوبائية (Stites *et al.*, 2001). ذلك عند حقن خنزير غينيا بالتيوبركلين أو المشتق البروتيني المنقى (PPD) في ادمة الجلد ينتج عن ذلك ظهور تفاعل جلديّ (احمرار) في منطقة الحقن بعد مرور 8-10 ساعات من حقن ذلك الأرجين، وهذا التفاعل يتمثل بارتشاح خلوي للخلايا اللمفاوية والخلايا البلعمية الكبيرة وعدد قليل من كريات الدم البيض المحببة في موقع الالتهاب ويتم ذلك بوساطة توسع الأوعية الدموية الموضعية (Clark,1983)، ويصل ذلك الارتشاح إلى قمته بعد مرور 24-48 ساعة أو 72 ساعة من مدة الحقن. حيث تتميز منطقة التفاعل باحمرار (Redness) وتثخن (Thickness) وتنخر (Necrosis) (Roitt *et al.*, ;Weir, 1992) 1998. وبعد ذلك يبدأ التفاعل يتلاشى تدريجياً (Rajka & Korossy, 1976). ويعتقد أن إليه حدوث التفاعل تتضمن تداخل بعض الخلايا اللمفية المارة في الأنسجة مع المستضد المحقون ونتيجة لذلك تثار بقية الخلايا اللمفية الاخرى والخلايا البلعمية لكي تهاجر الى موقع وجود المستضد، حيث تقوم الخلايا التائية (Tdth) بإنتاج السايتوكينات اللمفية التي تعمل على جذب الخلايا اللمفية الاخرى غير المحسسة الى موقع الالتهاب من ما يؤدي إلى تضخيم الاستجابة المناعية. فتتكاثر الخلايا اللمفية (Tdth) تحت تاثير IL- 2 الذي تنتجه الخلايا التائية المساعدة Th_1 (Hyde, 2000).

وعندما تكون منطقة التفاعل مرتشحة بالخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة مع عدد من الخلايا البلازمية وبقية الخلايا الالتهابية الاخرى فيطلق على هذا الارتشاح اسم الارتشاح الالتهابي المزمن Chronic inflammatory infiltrate وهذا يدل على طول المدة التي يحتاجها التفاعل لكي يتطور ولتميزه عن الارتشاح الالتهابي الحاد acute inflammatory infiltrate الذي يتكون بشكل اساس من العدلات (Stites *et al.*,1994). ويمكن أن تنتج تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة جهازياً في خنزير غينيا المحسس عن طريق حقن التيوبركلين عن طريق الوريد أو عن طريق البريتون وقد يؤدي ذلك إلى حدوث صدمة Shock بعد مرور 5-8 ساعات من حقن المستضد ولكن التفاعل يصل إلى قمته بعد مرور 24 ساعة، ويمكن ان يكون مميتاً علماً أن أساس التفاعلات الجهازية تتم بوساطة تفاعل شوارتزمان(Clark, 1983).

وهنالك جملة من العوامل المؤثرة على تفاعل فرط الحساسية المتأخرة عند التحفيز بمستضد التيوبركلين وهي: جرعة ونوعية الأرجين المستخدم، وسبيل الحقن، وصفات الفرد، ودرجة تحسس المستلم، والعوامل الموضعية والادوية والمواد الكيميائية ونقص الخلايا المسؤولة عن هذا التفاعل، ووجود الهرمونات المحفزة لقشرة الكظر (ACTH) (Rajka & Korossy, 1976). وان تفاعلات فرط الحساسية

المتـــأخرة تحفـــز خصوصـــاً بوســـاطة بكتريـــا Salmonella و Brucellae وStreptococcus ومـدى واسـع مـن الفايروسات مثل فايروس الحصبـة الالمانية German Measles وفايروس النكـاف (Mumps (Weir, 1992).

وخلاصة القول حول الاستجابة المناعية هو كما يأتي:
تتصف الاستجابة المناعية بالتخصص والذاكرة والتعرف على غير الذات. وتكون من طورين طور حث وطور تأثير. والدورة الزمنية للاستجابة المناعية تشمل الخمول وتزايد انتاج الضد واستقرار إنتاجه ثم التلاشي. والاستجابة المناعية أولية وثانوية يرافق الثانوية حصول حالة الذاكرة المناعية هذا على مستوى المضيف بأكمله.

وأما على المستوى الخلويّ فالاستجابة المناعية عبارة عن أخذ المستضد وتهيئته وتقديمه للخلايا التائية المساعدة، حيث بدورها تنشط الخلايا البائية للتضاعف وتكوين نسائل وتخليق الضد وانتاجه او تعرف مستضديّ مباشر من قبل الخلايا البائية وتضاعفها وتكوين نسائل ثم تخليق الضد وإفرازه. وربما تنتهي بخلايا تائية محسسة وسايتوكينات وخلايا ذاكرة بائية وتائية على التوالي.

وتكون الاستجابة المناعية خلطية ، وخلوية، وخلطية خلوية، وفرط حساسية، مناعة ذاتية او خمولاً مناعياً وربما تحمل مناعيّ (Roitt *et al.*, 2001).

2-2 سبل تنظيم الاستجابة المناعية:

تنظم الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية بوساطة تفاعلات متداخلة بين الخلايا البلعمية الكبيرة والخلايا اللمفاوية Bوالخلايا اللمفاوية T تتمثل بتنشيط الاستجابة المناعية. ويعتمد نوع الاستجابة المناعية الحاصلة وبعدها في وقت معين على نوع المستضد وطريقة تقديم المستضد وانواع الخلايا اللمفاوية وأعدادها والأداء الوظيفي لتلك الخلايا (السعد والزبيدي , 1991) .

2-2-1 التنظيم الوراثيّ:

يوجد على سطح الخلايا النسيجية في الإنسان والحيوان تراكيب يطلق عليها مستضدات تثير تفاعلات مناعية شديدة في عملية غرس الأعضاء تعرف هذه المستضدات بمستضدات التوافق النسيجي الرئيسة (MHC). حيث اتضح من خلال التجارب الكثيرة التي أجريت في عمليات زرع الأنسجة والأعضاء من ان الوراثة تسيطر على نوعية المستضدات التي تساهم في إثارة التفاعل المناعيّ. ويطلق على هذه المستضدات في الانسان مستضدات كريات الدم البيض (HLA) تقع مورثات المستضدات (HLA) على الذراع القصيرة للكروموسوم السادس. كلّ الفقريات من الاسماك الغضروفية الى اللبائن تمتلك مستضدات التوافق النسيجيّ (MHC) وتكون متباينة في الطول فمثلاً يحتوي MHC البشريّ على 40 ميكا/Base ويكون أطول بـ 2-3 مرات من (MHC) الفئران كلّ (MHC) يحتوي على 3 أصناف من الجين

لمستضد الصنف الأول دور فعال في عملية السيطرة على الخلايا المصابة بالفايروسات فالخلية T من النوع السام للخلايا (TC) التي تحفز بوساطة التعرض لمستضد فيروس معين على خلية مصابة فإنها تتعرف عليه ضمن تعرفها على مستضدات الصنف الأول من النظام (HLA).

أما جينات الصنف الثاني فتشفر لجزيئات (MHC) على سطح الخلايا المقدمة للمستضد (البلاعم الكبيرة، الخلايا الشجيرية، الخلايا البائية) ويمتلك كلّ من الصنف الأول والصنف الثاني من جزيئات معقد التوافق النسيجيّ MHC تنظيم مؤثر للاستجابة المناعية. أما الصنف الثالث فتشفر لبروتينات المتمم Complement Proteins وكلّ MHC تحتوي على الأصناف الثلاثة من الجينات بالرغم من اختلاف العدد والترتيب (Tizard, 1997).

2-2-2 التنظيم الخلويّ:

تؤدي الخلايا البلعمية دوراً كبيراً في بدء الاستجابة المناعية وتنظيمها وذلك من خلال عملها على تركيز المستضدات وتقديمها للخلايا اللمفاوية وافرازها عوامل مختلفة تؤثر بصورة مباشرة وغير مباشرة على الاستجابة المناعية حيث تقوم خلايا البلاعم الكبيرة بإنتاج عدد من السايتوكاينات منها الانترليوكين (IL1) الذي يقوم بتنشيط الخلايا اللمفاوية وتحفيز الخلايا البلعمية ، IL8 الذي يقوم بعملية الانجذاب الكيمياويّ Chemotaxis لكريات الدم البيض الدفاعية ويحفز تفاعل تلك الخلايا وإنتاج عامل (GM. CSF) الذي يساعد على نمو وتمايز الخلايا وتقوم الخلايا البلعمية المحترقة بهضم جزء من المستضد وتثبت الجزء الآخر على سطحها وعندئذ يصبح المستضد ممنعاً جيداً إذا اشترك مع مستضد معقد التوافق النسيجي الصنف I والصنف II، حيث تقوم الخلايا البلعمية المحترفة وغير المحترفة بتركيز المستضدات الخاصة المعتمدة على الخلايا Tوتقديمها للخلايا التائية المساعدة. هذه الخلايا بعد ذلك تقوم بافراز السايتوكينات التي تقوم بتحفيز الخلايا اللمفاوية البائية الأولية على الاستجابة للمستضد وإنتاج الكلوبيولين المناعي. وتؤدي الخلايا التائية الكابحة دوراً تنظيمياً للاستجابة المناعية من خلال نشاطها بوساطة الارتباط المباشر لهذه الخلايا بالمستضد دون تقديمه بوساطة خلايا البلاعم الكبيرة وتقوم الخلايا الكابحة بتثبيط الاستجابة المناعية من خلال منع تنشيط الخلايا التائية المساعدة ومنع التعاون بين الخلايا التائية المساعدة والخلايا اللمفاوية B وكذلك تقوم بمنع تطور الخلايا اللمفاوية B بصورة مباشرة (Hyde, 2000).

لقد اشار (Tizard, 1997) إلى أن الاستجابة المناعية يجب أن تنظم بإمعان واعتبر هذا التنظيم تنظيماً كمياً ونوعياً حيث إن قابلية الخلايا التائية على الاستجابة للمستضد تعتمد على امتلاكها لمستلمات الخلايا التائية (TCRs) المتخصصة بذلك المستضد وعلى العكس من الخلايا التائية فان التنوع الضديّ يتولد بوساطة مجتمع الخلايا اللمفاوية B في طورين الأول يحدث بوساطة إعادة ترتيب قطع الجين في

الأعضاء اللمفاوية الأولية والطور الثاني يتضمن الطفرة الجينية(الجسمية) العشوائية في المراكز الانتاشية Germinal Centers بالأعضاء اللمفاوية الثانوية .

يكون تنظيم الاستجابة المناعية في المرض حيث ان نقص المناعة يعوض بالكلوبيولين المناعيّ المتخصص وغير المتخصص عن طريق محفزات الانقسام الخلوي في المضيف. اما في حالة زيادة المناعة الخلوية او غرس الاعضاء مثل فرط الحساسية والمناعة الذاتية فتنظم الاستجابة المناعية عن طريق الاثباط المناعي بالادوية او عن طريق استخدام الانترليوكين IL2 عامل نموٍ (Hyde, 2000).

في حين يكون تنظيم الاستجابة المناعية بالصحة عن طريق زيادة الضد، وزيادة المستضد ، ودور الخلايا الكابحة، ونشاط معقد التوافق النسيجي الوراثي ونشاطه المناعيّ (Bellanti, 1985; Roitt *et al.*, 1998)

3-2 التحوير المناعي وآلياته:-

إن عملية التحوير المناعي قد تحدث عن متغيرات داخلية في الجهاز المناعيّ أو بوساطة عوامل خارجية حيث ان تثبيط الاستجابة المناعية أو تحفيزها قد يكون مفيداً او ضارّاً. وفي بعض الحالات يكون التحوير المناعيّ مرغوباً فيه وفي حالات أخرى يكون التحوير المناعيّ غير مرغوب فيه لذا يجب ان يقاوم لمنع حدوث تأثيرات غير مرغوب فيها قد تؤدي الى الهلاك (Bellanti,1985).

أشار كلّ من (Roth & Flaming,1990) إلى عدد من العوامل التي توضح مفهوم التحوير المناعيّ كدراسة الأسس الخلوية والجزيئية الخاصة بالكبح المناعيّ من أجل الاستخدام الأمثل للمحورات المناعية، معرفة التأثيرات الفسلجية للمثبطات المناعية المستخدمة في التحوير المناعيّ، ومعرفة الآلية التي تعمل بها هذه المواد حيث ان بعضها يعمل بصفة محور مناعي مضخم للاستجابة المناعية وبعضها الآخر يكون مثبطاً لتلك الاستجابة أو قد لا يكون لبعض منها تأثير واضح في الاستجابة المناعية، وإمكانية الاستفادة من عملية التحوير المناعيّ في المحافظة على النواحي الصحية ودراسة الاختلافات المعنوية والنوعية لاستجابة الخلايا المناعية لمختلف المحورات المناعية واستخدام موديل تجريبيّ كالأرانب لدراسة التحوير المناعيّ بشكل واضح لأن الهدف من التحوير المناعيّ هو تغيير الوظائف المناعية نحو الأفضل للمضيف وكذلك يتطلب الأمر معرفة الوقت المناسب وتركيز الجرعة المؤثرة اللازمة لحدوث التحوير المناعيّ.

1-3-2 التحوير المتخصص بالمستضد

يقصد بالتحوير المتخصص بالمستضد استخدام اللقاح المحضر من الأحياء المجهرية أو مكوناتها المؤلفة من تحت الوحدات Subunits vaccine في تحوير الاستجابة للمستضدات غير المتخصصة الى استجابة متخصصة بالمستضد تنفع في اكتساب الفرد مناعة في درجات مختلفة طبقاً لطبيعة اللقاح المحقون وطبيعة العامل المشترك مع المرض (Stites *et al.*,2001).

1-1-3-2 تحفيز الاستجابة المناعية Stimulation of Immune response

يحدث التحفيز المناعيّ في كلٍّ من المناعة الخلطية والخلوية عند استخدام بعض مركبات الجدار للبكتريا المكونة للحوامض الشمعية مثل بكتريا *M. tuberculosis* المكونة للحامض Mycolic acid وبكتريا الجذام . *M. lepare* المكونة لحامض Lepronic acid عواملَ تساعد على تحفيز الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية حيث تعمل خلايا T التي تضم CD_4 المرتبطة بجزيئات الصنف الثاني لمعقد التوافق النسيجيّ Major histocompatibility complex(MHC-II) و CD8 التي ترتبط بجزيئات الصنف الأول MHC-I على السيطرة على المرض. هنالك خمجات بكتيرية تحث المناعة الخلطية فقط أي أن مستضداتها السائدة من نوع المستضد المعتمد على الخلايا البائية التي تتمثل بتكوين

الاضداد التي تقوم بوظائف دفاعية مهمة فقد تعمل الاضداد إما وحدها أو بارتباطها مع مكونات المناعة غير المتخصصة.

وبالمقابل هناك خمجات تكون المناعة السائدة مناعة خلوية كبكتريا السالمونيلاً المسببة لمرض التايفوئيد Salmonella typhi . لوحظ أن بعض المواد المحفزة القادرة على تقوية الاستجابة المناعية في أحد الأنظمة قد تكون مثبطة للنظام الأخر. لذلك يجب الأخذ بنظر الاعتبار التأثيرات الحيوية المختلفة للمواد المحفزة المؤثرة في الاستجابة المناعية .(Pell & Aston, 1995, Stites *et al.*, 2001).

بيّن الباحث Anderson (1992) أن تحفيز الاستجابة المناعية يزيد المقاومة ضد الأمراض الخمجية المختلفة، وذلك بتحفيز آليات الدفاع المناعية غير المتخصصة، أشارت العديد من الدراسات الحديثة التي اجريت على الإنسان إلى عدد من الآليات المحتملة لحدوث التحفيز المناعي منها :

1. تنشيط الجهاز الشبكيّ البطانيّ Activation of reticuloendothelial system.
2. تحفيز انتاج اللمفوكينات Stimulation of Lymphokines production.
3. تحفيز الخلايا القاتلة الطبيعية Stimulation of natural Killer cells.
4. زيادة حساسية خلايا السرطان للتحطم Increase sensitivity of tumor cells to destruction.(Bellanti , 1985)

2-3-1-1-1 التمنيع الفاعل Active Immunization

يحدث التمنيع الفاعل نتيجة لاستخدام اللقاحات التي تكون إما كائنات حية مقتولة أو موهنة أو منتجات الكائنات الحية والتي تؤدي إلى نشوء الاستجابة المناعية ويمتاز التمنيع الفاعل بالصفات الاتية:

1. لا يكون التمنيع كاملاً ما لم يتم تنشيط الخلايا بشكل كامل.
2. المناعة تكون طويلة الأمد وتكون سهلة بإعادة التنشيط بوساطة جرعة من المستضد (اللقاح).
3. كلّ من الخلايا المناعية الأساسية B وT يجب أن تنشط.
4. إعادة التنشيط تكون سهلة نسبياً مع بعض الخطورة مثل مرضى المصل لذلك يعول في هذه الحالة على التمنيع المنفعل.

ويعمل هذا المستضد (اللقاح) على تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية المتوسطة بالخلايا اللمفية والخلايا البلعمية الكبيرة. كما يعمل على تحفيز إنتاج الأضداد بصورة مباشرة ضد العوامل الخمجية Infectious agents أو نواتجها السمية. وتكمن أهمية الاضداد المنتجة في تسهيل عملية البلعمة Phagocytosis والتفاعل مع مكونات منظومة المتمم. وعدم تنشيط نواتج البكتريا من البروتين السميّ الذائب ومعادلة الفعل الحيوي للذيفانات ومنع الاصابة الفايروسية وكذلك التفاعل مع مكونات سطح البكتريا لمنع عملية الالتصاق بالسطوح المخاطية(Stites *et al.*, 2001) .

2-1-1-3-2 التمنيع المنفعل Passive Immunization

يحدث التمنيع المنفعل عند نقل النواتج الفعالة للاستجابة المناعية (الأضداد) أو نواتج الخلايا التائبة المتكونة بصورة مسبقة من الأفراد الممنعين إلى الأفراد غير الممنعين ولايتطلب هذا النوع من التمنيع التعرض المستمر الى المستضد ولا ذاكرة سابقة للتعرف على نفس المستضد (Stites *et al.*,1994). وتكمن أهمية هذا النوع من التمنيع في المعالجة الوقائية . Prophylaxis أو معالجة الإصابات المتسببة بوساطة البكتريا المنتجة للذيفات الخارجية exotoxins. كما ويستخدم في معالجة الحالات المرضية كما في حالة الإصابة باللشمانيا(حبة بغداد) وفايروس داء الكلب (Rabies virus) عند عدم فعالية المعالجة بالمضادات الحيوية (Pell & Aston,.1995).

2-1-3-2 تثبيط الاستجابة المناعية Suppression of Immune response

تشير حالة الإثباط المناعيّ إلى منع أو خفض الاستجابة المناعية ويحدث التثبيط المناعيّ عند حصول خلل وظيفيّ دائميّ أو مؤقت في الاستجابة المناعية في ظرف معين مما يؤدي إلى زيادة قابلية الإصابة بالعوامل المرضية المختلفة. وقد يكون التثبيط المناعيّ حالة ثانوية نتيجة التعرض إلى المواد الخارجية مثل المستحضرات الطبية والمضادات الحيوية أو غيرها (Dohms & Saif, 1984).

تعمل العوامل المثبطة للاستجابة المناعية على تثبيط وظائف أعضاء الجهاز المناعي مما يؤدي إلى تغيير فعالية الوسائل الدفاعية للمضيف وتغيير عملية التوازن الوظيفيّ للمنظمات المناعية. قد تكون العوامل المسببة للتثبيط المناعي خمجية كالبكتريا Bacteria ، والفيروسات Viruses والفطريات Fungi والديدان Helminths أو غير خمجية Non-infectious مثل المواد الكيمياوية الهرمونات، المضادات الحيوية والذيفانات Toxins إضافةً إلى تأثير الظروف البيئية المختلفة كالحرارة والرطوبة والكثافة السكانية او عامل الشد Stress factor على الاستجابة المناعية كما يؤدي فقدان العناصر الغذائية الضرورية مثل الأحماض الأمينية، والفيتامينات والمعادن إلى حدوث حالة التثبيط المناعي (Muneer *et al.*,1988).

تعمل المركبات الفسفورية (مبيدات الباراثرمون والمائيون وغيرها) على تثبيط الاستجابة المناعية الخلطية في الحيوانات المختبرية كما تسبب انخفاضاً واضحاً في المراكز الانتاشية Germinal centers، ولكون هذه المركبات مستقرة كيمياوياً وتبقى فترة زمنية طويلة في البيئة فانها يمكن ان تتركز في السلسلة الغذائية وعليه تزيد من تعرض الإنسان إلى تأثيرها السام عموماً وتأثيرها السميّ على النظام المناعيّ في الأرنب خصوصاً (Moutschen,1985 & Colosio *et al.*,.1990) (Al-Gebori , 2003).

لقد وجد أن مبيد 2.4.D ذو تأثير مثبط للاستجابة المناعية الخلطية الجهازية والمخاطية كما أدى تمنيع الحيوانات المختبرية (الأرانب) بخلطات مختلفة من فيتامين D_2 مع مستضد اح البيض الى تثبيط الاستجابة المناعية الخلطية الجهازية والمخاطية . (AlGebori,2003)

إن فوائد عملية التثبيط المناعيّ تكمن في استخدام العوامل المثبطة المناعية في معالجة بعض الظواهر Syndroms أو الأمراض Diseases التي تشير إلى عدم توازن الاستجابة المناعية كأمراض التهاب الروماتيد الرثويّ Rheumatoid arthritis والتهاب الكبد المزمن Chronic hepatitis وفي معالجة أمراض المناعة الذاتية Auto Immnune diseases، أمراض الأرجية Allergic diseases ورفض الأعضاء Allograft rejection. (Hyde,2000).

2-3-1-3 التحمل المناعيّ Immunological tolerance

يشير التحمل المناعيّ إلى حصول اختزال أو انعدام في الاستجابة المناعية للمستضدات او الممنعات ومن الممكن أن يكون التحمل المناعيّ موروثاّ وذاتياّ وهو ما يعرف بالتحمل الذاتيّ Autotolerance أو مستحث بصورة متخصصة Specifically Induced التحمل المناعي المكتسب (Acquired Immne tolerance) (Hyde,2000) ويعرف التحمل الذاتيّ بأنه عدم الاستجابة المناعية الى بعض المستضدات الذاتية التي لم تتمكن من إحداث حالة Central tolerance وتحدث هذه الحالة طبيعياً في فترة مبكرة من الحياة عندما يكون الجنين في الرَّحِم Uterus نتيجة الاختيار السلبيّ للخلايا اللمفية التائية T.cells في غدة التوثة بينما يعرف التحمل المناعيّ المكتسب بأنه عملية تحفيز ا لخلايا اللمفاوية البائية والتائية بوساطة التجارب المختلفة عن طريق حقن المستضد. هناك عدد من العوامل التي تؤثر في حدوث التحمل المناعيّ منها عدم النضج المناعيّ، وخواصّ المستضد، ، وجرعة المستضد، وطريقة إعطاء المستضد والعوامل الوراثية. ويمكن استحثاث التحمل المناعيّ في الحيوانات البالغة عن طريق إعطاء جرعة اقل من الجرعة المثالية (جرعة المستضد التي بامكانها تحفيز أعلى استجابة مناعية) فيحدث ما يسمى بالتحمل المناعيّ بالجرعة الواطئة Low Dose tolerance وهذه الجرعة قد تحدث تأثيرها في الخلايا التائية.

أما عند إعطاء جرعة أعلى من الجرعة المثالية يحدث ما يعرف بالتحمل المناعيّ بالجرعة العالية High dose tolerance وتميز حالة التحمل المناعي عن التثبيط المناعي من خلال ما يأتي:-

1. أن التحمل المناعيّ هو خاصّ ونوعيّ بالنسبة للمستضد على العكس من ذلك المحدث بالعقاقير أو المتعلق بالمرض أو أية حالة تثبيط مناعيّ عام.
2. إن التحمل المناعيّ خاص بالخلايا اللمفية وغير متوسط بالضدوهذا يجعل التحمل المناعيّ مختلفاً عن التثبيط المناعيّ الذي يتوسطه الضدّ.
3. يتسبب التحمل بفعل تعرض الخلايا اللمفية الى المستضدّ لذلك يكون مختلفاً عن الاستجابة التي تقع تحت التأثير الوراثيّ.

4. كما يمكن أن يحدث التحمل المناعيّ بسهولة في الخلايا التائية مما في الخلايا البائية ذلك لأن الخلايا التائية تحتاج إلى جرع قليلة من المستضد وتستمر الاستجابة فيها فترة أطول من الخلايا البائية (Bellanti, 1985).

2-3-1-3-1 التثبيط الاصطناعي Artificial inhibition

يستخدم التثبيط الاصطناعيّ الذي يشمل إدخال المركبات الحيوية، الكيمياوية، أو الإشعاعية وملاحظة مدى تأثيرها في الاستجابة في تغيير الاستجابة المناعية بشكل يؤثر في آلية الوظائف الطبيعية للخلايا المناعية فضلاً عن إجراء العمليات الجراحية لإزالة الأنسجة والأعضاء اللمفية كالاستئصال الجراحي للأعضاء اللمفية الأولية كالغدة التوتية Thymus gland ونقي العظمbone marrow هذا النوع من التثبيط يحدث فقطإذا أزيلت هذه الأعضاء في أثناء فترة الولادة وملاحظة التأثير الناتج عن ازالتها في الجهاز المناعيّ وما يتلوه من تأثير في جسم الكائن الحيّ (Fudenberg *et al.*,1976) وسيقتصر في التثبيط الاصطناعيّ على الوسائل المناعية مع الابتعاد عن التداخلات الاصطناعية الأخرى ونخص بالذكر استخدامه ضد الخلايا اللمفية. يؤدي تجريع الحيوانات بالامصال المضادة المغايرة Heterologaus antisera ضدّ المستضدات الغشائية للخلايا اللمفية الى حدوث حالة التثبيط المناعيّ ويؤدي حدوث هذه الحالة إلى تكوين نوعين من الأضداد هما الأضداد الوحيدة النسيلة Monoclonal anti bodies التي تكون متخصصة بمستضدّ معين وتستخدم في معالجة الأمراض المختلفة الناتجة عن حالة التثبيط المناعيّ مثل أمراض المناعة الذاتية Auto Immune diseases والأمراض الناتجة عن غرس الاعضاء الحية وغيرها (Hyde,2000).

اما النوع الثاني من الأضداد المتكونة هي الأضداد المتعددة النسيلة Polyclonal anti bodies التي تتفاعل مع محددات مستضدية متعددة على سطوح أغشية الخلايا اللمفية لغدة التوتة Thymus gland والطحال Spleen أو الخلايا اللمفية للقناة اللمفية الصدرية Thoracic duct lymphocytes أو الخلايا الدموية اللمفية المحيطية Peripheral blood lymphocytes حيث تعمل هذه الأضداد على توهين وظيفة الخلايا التائية وتقليل عدد الخلايا اللمفية Lymphocytopenia وما يتلوه من تثبيط المناعة الخلوية (Stites *et al.*,1994)

2-3-2 تحوير غير متخصص بالمستضد (التحوير العامّ)

يكون التحوير غير المتخصص بالمستضد عاماً أي لا يقتصر تأثيره في مستضد معين أو حالة مرضية معينة وإنما يشمل جميع المستضدات التي يتعرض إليها الجهاز المناعيّ بشكل خاصّ والجسم بشكل عام، مما يساعد على اكتساب الفرد استجابة مناعية في درجات مختلفة تقيه من الامراض الخمجية المختلفة (Stites *et al.*,2001) ويتم التحوير العامّ عن طريق الآتي :

1. تقوية أو تضخيم الاستجابة المناعية.
2. تثبيط الاستجابة المناعية.

4-2 موديلات دراسة التحوير المناعيّ:-

1-4-2 موديل الاثباط المناعيّ Immuno suppression Model

لقد درس مفهوم التثبيط المناعيّ من خلال استخدام احد المثبطات المناعية وهو السايكلوسبورين Cyclosporine A وهو أحد المنتجات الأيضية (النواتج الثانوية) للفطريات والذي بين أن له تأثيراً مثبطاً لتفاعلات زرع الاعضاء في عدد من الحيوانات المختبرية وخاصة في الأرانب (Salaman & Sampson,1980). كما وجد ان هذا المركب يمتلك تأثيراً مثبطاً للاستجابة المناعية الأولية والثانوية عند التعرض الى المستضد.

لقد أشار الباحثون Borel وآخرون (1977) ان السايكلوسبورين A يعمل مثبطاً مناعيّاً بوساطة عمله الانتقائيّ في بدأ عملية توالد الخلايا التائية التي عرفت بإنها استجابة الأجسام المضادة للمستضدات المعتمدة على الخلايا T متضمنة التعاون بين الخلايا المساعدة التائية والخلايا البائية ونتيجة لهذا التعاون تصبح الخلايا البلازمية منتجة للاجسام المضادة (Antibodies). يعمل السايكلوسبورين بوساطة منع تضاعف الخلايا التائية المساعدة على الاستجابة المناعية الأولية. ومهما يكن فقد بّين الباحث (Borel *et al.*,1977) ان السايكلوسبورين A في الفأر قادر على تثبيط كل من الاستجابتين المناعية الاولية والثانوية من خلال التكوين المباشر وغير المباشر للخلايا المولدة للبقع (Plaque-Forming cells) لقد استنتج من خلال البحث ان السايكلوسبورين A مثبط مجهد جداً للاستجابة المناعية الأولية في الأرنب للالبومين المصلي البشري (HAS) وبجرعة 20mg/ml في حين وجد أن هذه الجرعة تمتلك تأثيراً قليلاً جداً للاستجابة المناعية الثانوية للالبومين المصليّ البشريّ (HAS).

قد تكون عملية التثبيط المناعي مفيدة او مضرة للمضيف (Borel *et al.*,1977) كما هي الحال في تحفيز الاستجابة المناعية في بعض الحالات فإنه قد يكون من الضروريّ في حالات اخرى الانحراف بالجهاز المناعيّ بحيث يصبح غير قادر على الاستجابة للموادّ الغريبة (Bellanti,1985).

تعمل الهرمونات القشرية السكرية Glucocorticoids hormones على تثبيط استجابة الاضداد الى المستضدات المتخصصة واختزال فعالية الخلايا اللمفية في الاستجابة للعوامل المحفزة المشطرة Mitogens ويرتبط اختزال هذه الفعالية بانخفاض تخليق الانترليوكين 2 (Interleukin-2) من قبل الخلايا اللمفية المعاملة بالهرمونات القشرية السكرية (Blecka & Baker,1986).

تم اجراء العديد من التجارب لايضاح مفهوم التحوير المناعي المحدث بوساطة مركب Dexamethasone الذي يسلك عاملاً مثبطاً في الحيوانات الأليفة Domestic animals (الماشية Cattle) (Roth *et al.*,1989; Kaeberle & Roth *et al.*,1984; Roth & Frank, 1989; Roth *et al.*,1990)

ويمكن الإشارة إلى موديل تجريبيّ آخر يوضح حدوث حالة التثبيط المناعي وحالة الخمج الفايروسي Viral infection. إذ لوحظ إن فايروس الهربس البقريّ Bovine Herpes virus BHV-1 يؤدي الى تثبيط الاستجابة المناعية من خلال تثبيط تضاعف الخلايا المعتمدة على الأنترليوكين 2(IL_2) وبذلك فانه يمتلك القدرة على تثبيط التعبير الجيني للانترليوكين 2 ومستلماته (Carter *etal.*,1988).

ويستفاد من عملية التثبيط المناعي في علاج أمراض المناعة الذاتية AutoImmune diseases، أمراض الارجية Allergic diseases ورفض الاعضاء Allograft rejection الذي ينتج من تطور استجابة الخلايا التائية السامة Cytotoxic-T-Cells خلال عملية غرس الأعضاء الحية Organs transplantation (Rosenfeld *et al.*,1998 & Hyde,2000).

2-4-2 موديل التحفيز المناعي Immuno stimulation model

يعدّ فيتامين A مادة عضوية معروفة التركيب لا يستفاد منها بصفة وحداتٍ بنائية في التراكيب الداخلية في الجسم لانها غير قادرة على تزويد الجسم بالطاقة. حيث إنها لا تخلق داخل جسم الكائن الحيّ ولكن توجد بصورة واسعة في الطبيعة. وغالباً ما يتم هضمه مع المواد الغذائية او قد يستخدم دواءً في معالجة بعض الحالات المرضية الناتجة عن نقص الفيتامينات (Tylar *et al.*,1988).

يؤدي نقص فيتامين A الى الاصابة بالعشو الليلي Night-blindness، والتنسج Metaplasia، وفرط التقرن HyperKeratosis وتاخير النمو Growth retardation، وانخفاض مناعة الجسم بالإضافة إلى حدوث الاضطراب الوظيفي في الخلايا المناعية التائية والبائية (Franklin *et al.*,1998 & Semba,1999).

بينما تؤدي زيادة فيتامين A زيادة كبيرة ولفترات طويلة الى حدوث حالات تسمم مزمنة Chronic poisoning، وصداع Headache، وغثيانNausea ، وخمول Drowsiness، وتقيؤ Vomiting، وفقدان الشهية Loss of appetite بالأضافة إلى الأورام المصاحبة لانتفاخ الأوتار (Rama & Rao, 1987).

لقد اشارت (Al-Gebori *et al.*,2003) إلى أن فيتامين A يعدّ محفزاً مناعيّاً Immunostimulator حيث أدى إلى تحفيز المناعة الخلطية في الأرنب.

يعدّ عقار الليفاميزول Levamisole مركباً كيمياوياً معروفاً ذا تأثير محور للاستجابة المناعية وينتمي هذا المركب الى مجموعة مركبات Phenylimidathiazole المضادة للديدان Anti helminthic ذات التأثير المحور لوظيفة الخلايا البلعمية الكبيرة والخلايا التائية ويعتمد هذا التأثير على الجرعة المستخدمة ووقت التمنيع المرتبط بالحالة المرضية او بالحالة النفسية بالإضافة إلى ارتباطه بالمكونات المناعية للمضيف (Blecka & charley,1990) .

كما يعمل عقار الليفاميزول على تحفيز خلايا الذاكرة التائية Memory T-cells في الخنازير بالاعتماد على الملاحظات الناتجة من تكرار المعاملة بهذا العقار والتي بينت انه لا يؤثر في الاستجابة المناعية الأولية ولكنه يعمل على تحفيز الاستجابة المناعية الثانوية بزيادة مستويات عيار الكلوبيولين المناعي صنف IgG بدون أية زيادة في مستويات عيار الكلوبيولين المناعيّ صنف IgM بعد إعطاء جرعة ثانية من اللقاح الى الخنازير المعاملة (Blecka & Charley,1990).

ولوحظ في دراسة أخرى أن الاستخدام المستمر لعقار Levamisole بتركيز 2-5 ملغم/كغم يسبب تحفيز اللزائن الدموية النباتية Phytohaemagglutinin (PHA) لخلايا الدم المحيطية في الدجاج (Confer & Adidinger,1981) بينما لوحظ أن استخدام Levamisole بتركيز 2.5 ملغم /كغم يسبب زيادة الاستجابة الضدية للأمراض من خلال الزيادة المعنوية الحاصلة في عيار الاضداد بعد ستة أسابيع من إعطاء هذا العقار للدجاج (Sulochana *et al*,.1984).

5-2 المحورات المناعية Immunomodulators:

تتضمن المحورات المناعية مجموعة من المواد الفيزيائية والكيميائية والحيوية منها أيونات الفلزات والمعادن الثقيلة والمضادات الحيوية والمبيدات والفيتامينات وبعض المركبات الكيميائية الحيوية والذيفانات الداخلية والخارجية البكتيرية إضافة إلى الأحياء المجهرية مثل البكتريا والفايروسات والمركبات الأيضية الفطرية مثل السايكلوسبورين (Cyclosporine A) والهرمونات مثل الستيرويدات القشرية وغيرها.

حيث تعمل مجموعة من هذه المحورات كمضخمات للاستجابة المناعية أي إنها تؤدي إلى التحفيز المناعي Immunostimulation والقسم الآخر يؤدي إلى تناقص الاستجابة المناعية أي إنها تعمل بالاتجاه السالب مؤدية إلى ما يعرف بالتثبيط المناعي(Immunosuppression) (Stites *et al*.,2001).

1-5-2 المضادات الحيوية Antibiotics:-

وهي من النواتج الأيضية الثانوية Secondary metabolites وتنتج خلال دور الانحدار في نهاية فترة النمو عندما تدخل الخلية في المراحل الأخيرة من دورة حياتها وهي مركبات كيمياوية طبيعية، صنعية أو شبه صنعية من اصل مكروبي ذات أوزان جزيئية متباينة تتداخل مع نمو الأحياء المجهرية ويكون عملها مضاداً للأحياء المجهرية حيث تؤدي إما إلى قتل تلك الأحياء فتدعى في هذه الحالة Bacteriocidal او تؤدي إلى تثبيط النمو الجرثومي دون قتله فتدعى هنا Bacteriostatic (Roger,1996).

أشار الباحث (Muneer *et al.*, 1988) إلى أن المضادات الحيوية تمتلك خاصية التحوير المناعي. حيث تمتلك القابلية على تحفيز الاستجابة المناعية أو تثبيطها. ولقد

استخدمت في مجال الطبّ السريريّ كعوامل مساعدةً للنمو وفي معالجة الإصابات البكتيرية والطفيلية ولوحظ أن الغالبية العظمى من المضادات الحيوية تعمل على تثبيط المناعة الخلطية عند استخدامها بالجرع العلاجية وان تكرار استخدام المضادات الحيوية والافراط في هذا الاستخدام أدى إلى عواقب غير مرغوب فيها من ضمنها الإثباط المناعيّ.

إذ وجـد بـأن المضـادات الحيويـة الريفـادين والكلورامفينيكـول و مستضـد آح البيـض ذات قابليـة محـورة للاستجابـة المناعيـة حيث أدت إلـى تثبيط الاستجابة المناعيـة الخلطيـة الجهازيـة والمخاطيـة فـي الأرنب (AL-Gebori, 2003).

2-5-2 الأدوية السامة Cytotoxic Drugs

الأدويـة السـامة للخلايـا هـي مجموعـة مـن المـوادّ الكيمياويـة ذات خصـائص صـيدلانية علاجيـة قاتلـة للخلايـا التـي لهـا القابليـة علـى التضـاعف الـذاتي Self-replication. تسـتخدم فـي عـلاج الامـراض السـرطانية لأنهـا تمتلـك فعاليـة مثبطـة للمناعة. حيث تكون منافسة للخلايا اللمفاوية التي تشكل مجتمع الخلايا الحساس لهذا النوع من الأدوية. هذه الأدوية تكون غير انتقائية السمية للخلايا اللمفاوية حيث تعمل على قتل الخلايا غير اللمفية متضمنة خلايا المكون الدمويّ Hematopoietic cells، خلايـا ظـاهرة المعـي Gastrointestinal mucosal cells والخلايـا الجنسـية الجنينية (Parslow *et al.*, 1994).

لاحظ الباحث (Stittes *et al.*,1987) عمل هذه الأدوية بشكل واضح عند تحفيز الخلايا البائية والتائية للانقسام بعد تعرضها إلى المستضد. إذ تعمل هذه الأدوية على قتل الخلايا المنقسمة في أطوار مختلفة من دورة حياتها.

3-5-2 الهرمونات التوتية Thymic hormones

هنالـك عـدد مـن المستخلصـات الببتيديـة الطبيعيـة للثـايموس التـي تتضـمن :- Thymic hormonal factor, thymostimulin, thymopoietin, thymulin, thymosins وتمتلـك عمـل محـور منـاعيّ، حيـث تكـون ذات تـأثير مفيـد فـي معالجـة إصابات فايروسية متعددة مثل التهاب الكبد الفايروسيّ B وفايروس الهربس وكذلك فـي معالجـة الالتهابـات المزمنـة التـي يسـببها الفطـر Trichophyton rubrum وكـذلك استخدمت وبنجاح محدود في معالجة المرضى في حالة النقص المناعي مثل متلازمة Digeorge syndrome (Hyde, 2000) ووجد بان هرمونات الثايموس تخدم بوصفها علاجاً مساعداً لبعض الاورام السرطانية (Parslow *et al.*, 2001).

4-5-2 السايتوكاينات Cytokines

هـي بروتينـات أو بروتـينات سكرية Glycoproteins ذات وزن جزيئـي أقل مـن 80 Kda تظهـر تأثيـر الإفـراز الـذاتيّ autocrine والإفـراز الجـانبي Paracrine وفـي بعـض الحالات الإفراز الصميّ Endocrine (Roitt *et al.*, 2000) وتصنف بصورة عامة إلى الانترفيرون والانترليوكين، عوامل تحفيز المستعمرات وعوامل للنمو والتمايز. وتمتلك السايتوكينات بأصنافها المتنوعة فعالية قوية وهائلة

فـي الاستخدام السريري كمحـورات مناعيـة وتخصصاً متنوعاً يخـــدم كمنظم عام للجهاز المناعـيّ (Stites *et al*.,1994).

بالرغم من أن الانترفيرونـات متميزة أولا بأنها تؤثر فـي الإصـابة الفايروسية إلا أنهـا مفيـدة سـريرياً محـوراتٍ مناعيـة معتمـدة فـــي معالجـة أمـراض neoplastic الانترفيرون نوع INF α منتجاً طبيعياً للبلاعم الكبيرة اكتشف بأنـه ذو فعاليـة مضـادة للامراض في العديد من امراض neoplastic. اكثر من 90% من مرضـى سرطان الخلايا الشعرية يستجيبون للعلاج بـالانترفيرون نـوع α وعلـى الـرغم من الانتكاسات القصـيرة غير المستمرة بعد العلاج. المعالجـة الكيمياويـة الطويلـة الامد تـؤدي الـى حدوث مضاعفات مثل الإعياء المزمن وتطور المقاومـة بسبب انتـاج أجسام مضـادة ، أظهـرت التقـارير بـأن الانترفيـرون α يمتلـك فعاليـة ضـد الاورام الصـلبة متضـمنة سرطان الخلايا الكلويـة وسرطانات المثانـة والمبـايض وكذلك مفيد فـي عـلاج مرض الايدز (AIDS) وبنسبة (40%-25%) ولكن سمية الجرع العالية تحتـاج إلـى عـلاج مؤثر لاختزال هذه السمية او التقليل منها (Stites *et al.* , 2001) .

ينـتج الانترفيـرون كامـا (الانترفيـرون المنـاعيّ) مـن الخلايـا اللمفاويـة ويمتلـك فعالية كبيرة فـــي معالجة العديد من الأورام والإصـابات الفيروسية (Parslow *et al.*, 2001).

الانترليوكينـات مجموعـة متنوعـة مـن السـايتوكانيات. مظهـرة مـدى واسـعاً مـن العمل على الجهاز المنـاعي، تمتلك كثيراً من الفعاليـات المفيدة والتـي تجعلهـا عواملَ معالجة كيمياوية محورة للمناعـة Immunomodulatrs. الانترليـوكين 2(IL2) استخدم وبنجاح في معالجة العديد من السرطانات الخبيثة وخاصةً أورام الكلى حيث يؤدي إلى تثبيط ومضـاعفة الخلايـا اللمفاويـة الفعالـة بالقتـل Lymphocyte-activated Killer (LAK)cell ولكن له تأثيرات جانبية حيث يؤدي إلى سمية متميزة متضـمنة أعـراض كـالحمى، وقشـعريرية، والوذمـة، والتهـاب المعـدة والامعـاء الشـديد وسـمية الجهـاز العصبيّ المركزيّ التي لوحظت في معظم المرضى.

الانترليوكين 4(IL 4) هو لمفوكين الذي يعرف بأنه محفز لإنتـاج الكلوبيـولين المناعيّ IgE وتحفيز الخلايا البدينة (Mast cell) وكذلك يمتلك فعالية مضادة لـلاورام. عامـل تنخـر الـورم (TNF) هـو ذو فعاليـة مضـادة لـلأورام فـي كـل مـن حالـة الحـي والزجاج يكون محدود الاستخدام في المعالجـة الكيمياويـة بسبب السمية الجهازيـة لـه. أما الانترليوكين 10(IL10) هو سايتوكين مـع خصـائص منظمـة ربمـا يكـون مفيداً فـي معالجـة أمـراض المناعـة الذاتيـة حيـث يكـون مضـاداً لتضـاعف الخلايـا ومضـاداً للالتهابات، هذا التأثير يكون فـي الزجـاج *invitro* ومهمـا يكـن مـن أمـر فـإن الاستخدام السـريريّ للانترليـوكين 10(IL10) غيـر معـروف وربمـا يكـون محـدداً فـي التـأثير التحفيـــزيّ للخلايـــا البدينـــة وإنتـــاج الكلوبيـــولين المنـــاعيّ IgE (Stites *et al*., 2001).

6-2 اللكتينات بوصفها محورات مناعية :-

لقد ذكر الباحث (Blecka,1988) أن استخدام المحورات المناعية الفعالة يعمل على تحفيز الوظائف المناعية الطبيعية، معالجة الأورام السرطانية وأمراض العوز المناعي ولأجل فهم ميكانيكية عمل هذه المحورات ودورها في زيادة أو نقصان حث الاستجابة المناعية بنوعيها الخلطية والخلوية لا بد لنا من تعريف التحوير المناعيّ بأنه عملية تغير الاستجابة المناعية الطبيعية ويكون هذا التغير في واحد من اتجاهين اما في الاتجاه الموجب وهو حدوث تحفيز مناعيّ Immunostimulation او الاتجاه السالب أي حدوث تثبيط مناعيّ Immunosuppression وذلك باستخدام مواد فيزياوية،أو كيمياوية أو حيوية كالمضادات الحيوية والفيتامينات والمستخلصات النباتية وملاحظة مدى تأثيرها في الاستجابة المناعية الطبيعية *et al* and studnicka *al*.,1994 (Stites *et* ,2000).

أما المحورات المناعية فهي مجموعة من الموادّ المتباينة في تراكيبها الكمياوية والمختلفة في تأثيراتها الفسلجية. فالمضادات الحيوية،المبيدات والفيتامينات تعمل عمل محورات مناعية عند إعطائها قبل المستضد أو بعده يعني أنها قد تؤدي إلى تضخيم الاستجابة المناعية للمستضد أو تؤدي إلى خفض الاستجابة المناعية المتخصصة بالمستضد قياساً مع الحالة عند التنبيه بالمستضد وحده (ALGebori,2003).

هذا وقد عزل الباحثون (Wang *et al*.,1998) اللكتينات من بعض العراهين (Mushrooms) ووجدوا أنها قد تكون معدلة للجهاز المناعي وضد السرطان ولها فعاليات سمية ومن هذه الأنواع

Boletus satanas, Agaricus bisporus, Grifola frondosa, Ganoderma lucidum, Flammulina velutipes,Tricholoma mongolicum.

ومن صفات هذه اللكتينات تشطير الخلايا، وتحفيز الجهاز المناعيّ، وتثبيط تكاثر الخلايا، وفعل مضادّ للخلايا السرطانية، وتوسيع الأوعية الدموية.

وقد بين Tanaka وآخرون (1999) التأثير المحور لوظائف خلايا البلاعم الكبيرة والخلايا اللمفاوية حيث قاموا بتجريع إناث الفئران بمستخلص أيورابتين (Auraptene) الذي عزل من الحمضيات وبجرع 400،200،100 ملغم/كغم مرة واحدة في اليوم، ولمدة 10 أيام متوالية ولاحظ استهلاك الكلوكوز في خلايا البلاعم الكبيرة البريتونية بتميز عالٍ مقارنة بفئران السيطرة وبمستوى $P < 0.005-0.001$ في الفئران التي عوملت باليورابتين auraptene وفي كل الجرع وبمدد 24 و 48 و72 ساعة تحضين ما عدا تلك التي أعطيت 200 ملغم/كغم اليورابتين auraptene عند مدة تحضين 24 ساعة. فعالية الفوسفوتيز الحامضيّ (APH) في خلايا البلاعم الكبيرة في البريتون قد ازدادت في الفئران التي عوملت باليورابتين auraptene عند مستوى جرعة 100 ملغم/كغم

($P < 0.001$) وكذلك وجد أن فعالية إنزيم بيتا كلوكويوروندين (Gluase) في خلايا البلاعم الكبيرة البريتونية كان أعلى من ما هو عليه في مجموعة السيطرة ولكل الجرع ($P < 0.001$) ولكن فعالية إنزيم لاكتيت ديهايدروجنيز (LDH) كانت غير متميزة في الخلايا المذكورة في أية جرعة.

بينما كان إنتاج الانترليوكين (Interleukin) في خلايا البلاعم الكبيرة متميز وبمستوى أعلى من ما هو عليه في مجموعة السيطرة وبمستوى معنوية ($P < 0.05$-0.001) وإنتاج عامل تنخر الورم نوع α (TNF α) عند الجرعة 200 ملغم/كغم كان بمستوى أعلى من ما هو عليه في مجموعة السيطرة ($P < 0.05$). ولكن اليورابتين auraptene لم يؤثر على مضاعفة خلايا الطحال اللمفاوية التلقائية في الفئران عند أي جرعة. التحفيز أسس في الفئران التي أعطيت اليورابتين auraptene بجرعة 200 ملغم/ كغم وبمستوى أعلى من ما هو عليه في مجموعة السيطرة ($P < 0.05$). وعندما زرعت خلايا الطحال اللمفاوية بدون IL_2 ,Interferon (IFN) (conA) لم تظهر في المحلول الطافي للزرع supernatant حيث إن إنتاج IL_2 والانترفيرون (IFN) يتحفز بوساطة conA الذي ازداد بشكل متميز في الفئران التي حقنت بمستخلص اليورابتين auraptene عند مستوى جرعة 100 ملغم/كغم و200 ملغم/كغم ($P < 0.05$-0.001). اليورابتين auraptene لم يحفز انتاج IL_4 بوساطة خلايا الطحال وقد وجد الباحث أن هناك علاقة وثيقة بين الغذاء المتناول والوظائف المناعية من جهة والمواد المسرطنة carcinogenesis من جهة أخرى.

لقد جاء في بحث (Patrick *et al*.,2003) أن لكتين نبات Mistletoe الذي درس التأثير البايلوجي لهذا اللكتين في العديد من الدراسات في الزجاج (invitro) حيث وجد أن لكتين النبات المنقى الذي يكون بثلاثة أنواع (MtI to III) يمتلك تأثيرين أحدهما سام للخلايا اللمفاوية البلاعم الكبيرة والخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer cells (Nk) وكذلك أشار الباحث إلى وجود تأثير محفز لتلك الخلايا ويكون هذا التأثير من خلال تحفيز إفراز عدد من السايتوكينات، عامل تنخر الورم (TNF α) والانترليوكين 1 (IL_1) والأنواع الأخرى من الانترليوكينات مثل (IL_6) قد حفزت بوساطة لكتين النبات عند زراعة الخلايا وحيدة النواة. لكتين النبات النوع الاول (ML.I) ربما يمتلك تأثيراً سامّاً للخلايا القاتلة الطبيعية بوساطة تثبيط إفراز (IL-12) كذلك لوحظ زيادة إفراز كل (TNF α)، (IL_1)و(IL_6) في الزجاج (invitro) من الخلايا الدم المحيطيّ المشتقة من عينات المرضى. جرعة مفردة من ML.1 حقنت فأدت إلى زيادة إفراز TNF α وIL_6 خلال 1 الى 3 ساعات في 8 عينات لمرضى السرطان (Hajto *et al*.,1990) .

إن تخليق الأجسام المضادة يكون مباشرة ضد لكتين نبات Mistletoe وقد وثق هنا في عدد من الدراسات البحثية. إذ تم حقن 23 من مرضى السرطان بجرع Mistletoe Lectin لمدة شهرين الى 6 سنوات أدى إلى ارتفاع عيار الأجسام المضادة (Parslow *et al*.,1994).عيار الأجسام المضادة حسبت مع الآخذ بنظر الاعتبار طريقة الإعطاء وحجم الجرعة. وكان أكثرها ظهوراً وأسرعها هو

IgG وتحت الصنيفات التابعة لـه مثل:IgG_1,$IgG_2$and IgG_3 ،4 فقط من مجموع 23 من المرضى أنتجوا IgG_3 . كذلك اكتشف IgA في 9 مرضى، بينما IgE،IgM لم تكتشف على الإطلاق.(Patrick *et al.* , 2003)

ووصف اللكتين كلايكوبروتين بأنه يساعد على عودة الوظائف الحيوية داخل الجسم خلال 24 ساعة عند إعطائه في حالات النزف الشديد في ذكور القطط(Dzhuko,1995). كما ان لـه دوراً في خفض سكر مصل الدم ، فقد وجد (Lazarus *et al.*, 1998) أن إعطاء اللكتين المنقى من عشب عنب الثعلب(PKW) (Lectin pokeweed mitogen) بجرعة 15 ملغم/كغم من وزن الجسم في الفئران السليمة بالحقن بالبريتون يؤدي إلى انخفاض في سكر مصل الدم.

أهداف الدراسة :

1. محاولة فصل اللكتينات من بذور الخيار والحنظل باستخدام طريقة الاستخلاص المائي البارد ثم التمليح بكبريتات الامونيوم (40%) مشبعاً وتنقيتها جزئياً بالإنفاذ Dialysis .
2. توصيف حياتي جزئي لهذه اللكتينات عن طريق دراسة خاصية التلازن الدموي المباشر لهذه اللكتينات لكريات الدم الحمر للخراف (1%) .
3. دراسة تركيز هذه اللكتينات ويشمل كلاً من تفاعل بايوريت لتحديد تركيز البروتين الكليّ واستخدام ظاهرة الاستقطاب لتحديد نوع السكر المرتبط بالبروتين.
4. دراسة الأثر المحور لهذه اللكتيات بوصفها محورات مناعية ولكلّ من المناعة الخلطية والخلوية في الأرنب وعلى صعيد الاستجابة الأولية والثانوية .

الفصل الثالث Chapter Three

3-المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1 المحاليل المستعملة:

3-1-1 : المحلول الملحيّ الطبيعيّ Normal saline:

حضر هذا المحلول بتركيز (0.85%) بإذابة 0.85 غم من مادة كلوريد الصوديوم (NaCl) شركة BDH- (الوزن الجزيئيّ58.44)-في كمية قليلة من الماء المقطر وأكمل الحجم النهائيّ إلى 100مل وتعقيم المحلول في جهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط (15) بار لمدة 15 دقيقة . استعمل هذا المحلول في تحضير المحلول الملحيّ الفورماليني Formal saline وفي معايرة الأضداد المصلية مع المستضدات للعينات المأخوذة من الحيوان المختبريّ (Garvey *et al.*,1977)

3-1-2 محلول الملح الفورماليني Formal saline

حضر هذا المحلول باضافة 0.5 مل من الفورمالديهايد (H-CHO) –شركة BDH (الوزن الجزيئيّ 30.03) إلى 99.5 مل من المحلول الملحيّ المعقم ليصبح التركيز النهائيّ للفورمالين في هذا المحلول 0.5% حيث استخدم هذا المحلول لغرض منع نمو الأحياء المجهرية في المستخلصات النباتيّة المحضرة (Kwapinski, 1972).

3-1-3 محلول ازايد الصوديوم Sodium Azide

حضر هذا المحلول باذابة 1 غم من مادة ازايد الصوديوم (NaN_3) شركة BDH الوزن الجزيئيّ (65.01) في 100 مل من الماء المقطر بحيث اصبح التركيز النهائيّ 1% استعمل هذا المحلول في حفظ عينات المصل لمدة طويلة (Frei *et al.*, 1995).

3-1-4 المحلول الفوسفاتي المنظم Phosphate Buffer Solution (pH =7.2)

حضر هذا المحلول بإذابة 21.3 غم من مادة فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم (Na_2HpO_4)-شركة BDH (الوزن الجزيئيّ 148) و20.4 غم من مادة فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) شركة BDH (الوزن الجزيئيّ 116) و 8.8غم من مادة كلوريد الصوديوم (NaCl) شركة BDH (الوزن الجزيئيّ58.44) و8غم من مادة كلوريد البوتاسيوم (KCl) شركة BDH (الوزن الجزيئيّ 54) في كمية قليلة من الماء المقطر، وتم اكمال الحجم النهائيّ إلى لتر بإضافة الماء المقطر وعُدّل الأس الهيدروجينيّ إلى 7.2 بوساطة 0.1% HCl (حجم / حجم) . تم تعقيم المحلول في جهاز الموصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 15 بار ولمدة 15 دقيقة. استخدم هذا المحلول في تحضير المستخلص النباتيّ وفي معايرة الاضداد المصلية مع المستضدات للعينات المأخوذة من الحيوان المختبريّ (Garvey *et al.*, 1977).

1-5-3 محلول كبريتات الأمونيوم Ammonium sulfate Solution

حضر هذا المحلول بتركيز 40% باذابة 40 غم من مادة كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ -شركة BDH (الوزن الجزيئيّ132.13) في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم النهائيّ إلى 100 مل في قنينة حجمية.

تم استعمال هذا المحلول لغرض ترسيب البروتينات في المستخلصات النباتيّة المستعملة (Johnstone & Thorpe,1982).

6-1-3 محلول حامض التانيك Tanic Acid solution

حضر هذا المحلول بإذابة 0.5 غم من مسحوق حامض التانيك ($C_{76}H_{52}O_{46}$) - شركة BDH (الوزن الجزيئيّ 1701.22) في كمية قليلة من الماء المقطر وأكمل الحجم النهائيّ إلى 100 مل ليصبح التركيز 0.5%. تم استعمال هذا المحلول لإزالة المستضدات الموجودة على سطوح كريات الدم الحمر للخراف (Garvey *et al.*,1977).

7-1-3 محلول السيفر Alsever's Solution

حضر هذا المحلول بإذابة 24.6 غم من مادة الكلوكوز-شركة BDH و 9.6 غم من مادة سترات الصوديوم الثلاثية –شركة TAAB- و5.04 غم من مادة كلوريد الصوديوم(NaCl) –شركة BDH في 1200 مل من الماء المقطر وعدِّل الأس الهيدروجينيّ إلى 6.1 بوساطة 15% حامض الليمون (Citric acid).

تم تعقيم المحلول بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 15 بار لمدة 15 دقيقة ثم رشح المحلول بمرشح دقيق قطر ثقوبه 0.22 مايكرومتر واستعمل هذا المحلول لمنع تجلط عينات الدم وحفظها لفترة زمنية طويلة (Talib,1996).

8-1-3 محلول الالبومين وتخافيفه القياسيّة Standard Albumin Solution

حضر هذا المحلول باذابة 60 غم من الالبومين البقريّ في كمية قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم(0.6 عياري) واكمل الحجم النهائيّ إلى لتر باستعمال نفس المحلول ليكون التركيز النهائيّ للألبومين 60 غم /لتر ومن هذا المحلول تم تحضير التخافيف القياسيّة (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1, 32:1, 64:1, 128:1) على التوالي، التي تمثل التراكيز (60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.9875, 0.46875) غم/لتر على التوالي، وتم التخفيف باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.6 عياريّ) وجرى استعمال هذه المحاليل لغرض تحضير المنحني القياسيّ (Standard Curve) لمعرفة تركيز البروتين الكلي للمستخلصات النباتيّة قيد الدراسة أو البحث (Bishop *et al.*, 1985).

9-1-3 محلول البايوريت Biuret solution

جرى تحضير هذا المحلول باذابة 3 غم من مادة كبريتات النحاس ($CuSO_4.5H_2O$) –شركة BDH (الوزن الجزيئيّ 249.5) في نصف لتر من الماء المقطر وتم اضافة 9 غم من مادة ترترات الصوديوم-البوتاسيوم $NaKC_4H_4O_6.\ 4H_2O$ شركة BDH (الوزن الجزيئيّ 166) – وتم اضافة 5 غم من مادة يوديد البوتاسيوم-شركة Evans-وبعد اذابة هذه المكونات الثلاثة اضيف 100 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) شركة BDH-بتركيز (0.6) عياري وتم إكمال الحجم النهائيّ إلى لتر بإضافة الماء المقطر- وقد استعمل هذا المحلول في طريقة بايوريت Biuret Method لغرض قياس تركيز البروتين في المستخلصات النباتيّة المستعملة (Bishop *et al.*,1985).

2-3 الأوساط الزرعية

1-2-3 وسط Eagle medium

تم تحضر هذا الوسط باذابة 0.2 غم من وسط Eagle medium شركة SIGMA في كمية قليلة من الماء المقطر وإكمال الحجم النهائيّ إلى 20 مل من الماء المقطر ثم رشح المحلول بمرشح دقيق قطر ثقوبه 0.22 مايكرومتر واستعمل هذا المحلول لغرض تنمية الخلايا البيض، حيث يحتوي على كلّ المتطلبات الغذائية لنمو الخلايا البيض بجميع أنواعها (Garvey *et al.*,1977).

2-2-3 وسط الاكار-اكارAgar-Agar medium

حضر هذا الوسط باذابة 2 غم من مادة الاكار-اكار شركة BDH في كمية قليلة من الماء المقطر وإكمال الحجم النهائيّ إلى100مل من الماء المقطر وتعقيم المحلول في جهاز الموصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 15 بار لمدة 15 دقيقة، استخدم هذا الوسط في إجراء الفحوصات المناعية الخلوية. (Macfadin, 2000)

3-3 فصل المحاليل اللكتينية من بذور النباتات
Isolation of Lectin Solutions from Plant Seeds

1-3-3 تقنية الاستخلاص اللكتيني بالماء البارد.

استعملت طريقة (Garvey *et al.*,1977) والمحورة من قبل Shnawa وآخرون (2004) التي يمكن ايجازها فيما يأتي :

1 - غسلت البذور النباتيّة بالماء وجففت في الفرن بدرجة حرارة 45 مْ ولمدة ساعة واحدة.

2- طحنت البذور لتحول إلى مسحوق باستعمال الهاون والمطحنة الكهربائية.

3-أخذ غرام واحد من المسحوق ووضع في انبوبة وأضيف اليها 10 مل من المحلول الملحيّ الفسلجيّ.

4-رجت الانبوبة جيداً باستعمال الرجّ الكهربائيّ ثم حفظت في الثلاجة(4مْ) لمدة يوم واحد.

5-وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزيّ بسرعة (4000 دورة /دقيقة) (627 xg) ولمدة 10دقائق.

6-نقل 5 مل من المحلول الطافي إلى أنبوبة أخرى وأضيف إليها حجم مساوٍ من محلول سلفات الأمونيوم بتركيز 40%.

7-وضعت الأنبوبة في الثلاجة لمدة ساعة واحدة ثم وضعت في جهاز الطرد المركزيّ بسرعة (10000 دورة/دقيقة) (1567 ,5 xg) لمدة 30 دقيقة.

8-أهمل الراشح وأذيب الراسب في 0.5 مل من المحلول الملحيّ الفسلجيّ الفورماليني.

البذور النباتيّة

↓

تغسل بالماء

↓

تجفف بدرجة 45ْم

↓

تطحن لتحول إلى مسحوق

↓

1 غرام من المسحوق +10 سم^{3}محلول الملح الطبيعيّ (الفسيولوجيّ)

↓

يؤخذ الراشح ويضاف له محلول سلفات الامونيوم (40%)

↓

ينبذ المحلول لمدة 30 دقيقة (10000 دورة/دقيقة) (1567 xg)

↓

يؤخذ الراسب

↓

شكل (3– 1): مخطط يبين طريقة الاستخلاص المائي (شناوة وجماعته،2004)

↓

3-4 وصف اللكتينات

3-4-1 دراسة المنحني القياسيّ لتقدير تركيز البروتين

في تجربة لبناء المنحني القياسيّ لتقدير تركيز البروتين استعمل بروتين قياسيّ هو الالبومين البقريّ بتركيز 60 غم/لتر وحضرت سلسلة تخافيف منه وجرى تقدير الكثافة الضوئية لكلّ تخفيف في سلسلة التخافيف بطريقة تفاعل البايوريت لخمسة مكررات

وباستعمال تحليل الانحدار الخطيّ البسيط، احتسبت القيمة المقدرة للتركيز وحددت معادلة الخط المستقيم البسيطة وكانت معادلة من الدرجة الأولى للعلاقة بين قيمة الكثافة المطيافية (x) والتركيز (y).

وقد استعمل محلول البايوريت لانه يقيس البروتينات المحتوية على حوامض أمينية أروماتية ولتوفر مواده الأولية وعدم الحاجة فيه إلى أجهزة قياس معقدة علماً أنه تمت القراءة بطول موجيّ (540 nm) . جدول(3-1) شكل(3-2) ، وهذا يتفق مع باحثين آخرين (Bishop *et al.*, 1985) المعادلة المستعملة

$$y^{\wedge} = b\, x_i + a$$

إذ إن:

$y^{\wedge}$= تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحني القياسيّ لتقدير كمية البروتين الكلي للمستخلصات النباتيّة قيد البحث.

X_I= الكثافة الضوئية

a= تمثل الفرق بين متوسط التركيز وبين حاصل ضرب معامل الانحدار (b) في متوسط قيم الامتصاص في قراءة المطياف الضوئيّ.

b= يمثل عامل الانحدار ويحسب من المعادلة الآتية:

$$b = \frac{SXY}{SXX}$$

إذ إن:

SXY= تمثل مجموع مربعات الانحراف لقيم x/y

SXX= تمثل مجموع مربعات الانحراف لقيم x (Dawed & Al-Yas, 1990)

وتحسب a من المعادلة الآتية:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

إذ إن:

$\bar{y}$= الوسط الحسابيّ للتركيز

$\bar{x}$= الوسط الحسابيّ للكثافة الضوئية

وحسب عامل الارتباط بوساطة المعادلة الآتية:

$$r = \frac{\sum xy - (\sum x \frac{\sum y}{n})}{\sqrt{\sum X^2 - \left[\frac{(\sum x)^2}{n}\right] \sum y^2 - \left[\frac{(\sum y)^2}{n}\right]}}$$

جدول(3-1): البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسيّ لتركيز محلول الالبومين ولتخافيفه القياسيّة

X_I	y_i	xy	X^2	Y^2
0.339	60	20.34	0.1149	3600
0.22	30	6.6	0.0484	900
0.065	15	0.975	0.004225	225
0.043	7.5	0.3225	0.001849	56.25
0.032	3.75	0.12	0.001024	14.06
0.025	1.875	0.046875	0.000625	3.516
0.01	0.937	0.00937	0.0001	0.877
0.008	0.468	0.003744	0.000064	0.219
0.005	0.234	0.00117	0.000025	0.0547
0.003	0.117	0.00035	0.000009	0.0136
0.75	119.881	28.419	0.171221	4799.9896

$$b=\frac{\sum xy-(\sum x\frac{\sum y}{n})}{\sum X^2-\left[\frac{(\sum x)^2}{n}\right]\sum y^2-\left[\frac{(\sum y)^2}{n}\right]}=\frac{19.427925}{0.114971}$$

$b= 168.9$

$a= -b\,\bar{x} + \bar{y}$

$a = -12.6675 + 11.9881 = -0.67$

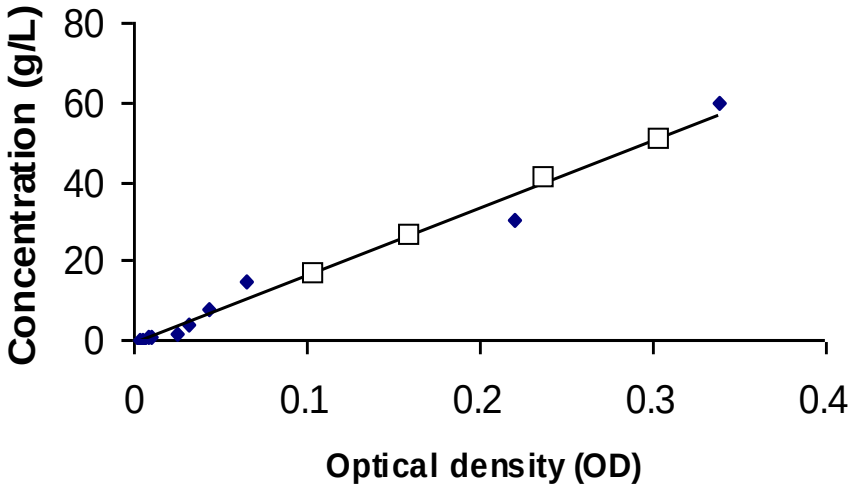
$\hat{y} = bX + a$

$\hat{y} = 168.9\,x_I - 0.67$

$$r=\frac{\sum xy-(\sum x\frac{\sum y}{n})}{\sqrt{\sum X^2-\left[\frac{(\sum x)^2}{n}\right]\sum y^2-\left[\frac{(\sum y)^2}{n}\right]}}$$

$$r=\frac{19.427925}{\sqrt{(0.114971)(3362.8442)}}=\frac{19.427925}{\sqrt{386.62956}}$$

r= 0.988



الشكل (3-2): منحني المعايرة القياسيّ الذي يوضح العلاقة بين التركيز القياسيّ للألبومين مقابل الكثافة الضوئية.

□ **Best Fitting Point**

◆ **Actual Point**

3-4-2 تقدير تركيز البروتين الكلي في المستخلصات النباتيّة

Total Protein Estimation of Plant Extracts

أستعملت طريقة البايوريت لقياس تركيز البروتين الكليّ (Bishop *et al.*,1985) وتتضمن الطريقة الخطوات الاتية:

1- وضع 4.8 مل من محلول البايوريت في انبوبة خاصة في جهاز المطياف (Spectronic 21).

2- أضيف حجم 0.2 مل من المستخلص النباتيّ المحضر كما جاء في الفقرة 3-3-1 إلى الأنبوبة المذكورة في الخطوة الاولى التي تمثل انبوبة الفحص.

3- أضيف 0.2 مل من المحلول الملحيّ الفسلجيّ إلى أنبوبة أخرى تحوي 4.8 مل من محلول البايوريت لغرض معايرة الجهاز(أنبوبة السيطرة).

4- خلطت الأنابيب جيداً وتركت في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة ثم قرئت الكثافة الضوئية لأنبوبة الفحص بعد معايرة الجهاز عند طول موجي مقداره (540 نانوميتر).

5- استعملت المعادلة الرياضية

$$\hat{y} = -0.67 + 168.9\ X$$

لحساب تركيز البروتين الكليّ حيث إن :
$\hat{y}$ = تركيز البروتين الكليّ بوحدة ملغم/مل.
X= الامتصاصية.

3-4-3 تحديد نوع السكر المرتبط بالبروتين(Clark and Switzer,1977).

لأجل معرفة زاوية الدوران النوعيّ للسكر الموجود في المستخلص النباتيّ الذي تم تحضيره استخدم جهاز(polarimeter)وكانت العملية كآلاتي:

1- تمت عملية تخفيف المستخلص النباتيّ المحضر بمادة الفورمالين Formal Saline وبمقدار(50µl) من المستخلص النباتيّ لكل 10مل من مادة الفورمالين المحضر.

2- أُستخدم جهاز Polarimeter بوساطة معايرته بمادة الفورمالين حيث ان الجهاز له قيمتان للمعايرة هما (180,0).

3- تم إضافة المستخلص النباتيّ المحضر الذي تم تخفيفه في أنبوبة الجهاز الخاصة مع ملاحظة تجنب تكون فقاعة داخل الأنبوبة لأنها تؤثر في عملية القراءة.

4- تم قراءة زاوية الدوران النوعيّ التي تعتمد على تساوي الشدة الضوئية بين انقلابين الذي يتكون فيه نصفان مظلم ومضيء وسجلت النتيجة باستخدام القانون الآتي:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha \times 100}{L \times C}$$

حيث إن :
C:g /100ml
زاوية الدوران النوعي $[\alpha]_D^T = \phi$
زاوية الدوران المقروءة $\alpha = \phi$

من خلال تطبيق القانون اتضح بأنه يجب معرفة تركيز المستخلص النباتيّ، وقياسه الذي تم عن طريق استخدام جهاز قياس معامل الانكسار (Refrectometer) كالآتي:

1. تم أوّلاً تحضير منحني قياسيٍّ لسكر معروف مسبقاً مثل سكر الكلوكوز، لأن التوقع كان بأن هذه المستخلصات النباتيّة حاوية على هذا النوع من السكر.
2. حضرت سلسلة تخافيف لسكر الكلوكوز حيث أذيب(0.1 غم) من الكلوكوز في (10 مل) من الماء المقطر، وهذا يعدّ التركيز الأول (1/100). اما التركيز الثاني فكان (2/100) والذي حضر بإذابة (0.2 غم) من الكلوكوز في (10مل) من الماء المقطر اما

التركيز الثالث فكان (3/100) وحضر باذابة (0.3غم) من الكلوكوز في (10 مل) من الماء المقطر. وأما التركيز الرابع فكان (4/100) وحضر باذابة (0.4غم) من الكلوكوز في (10 مل) من الماء المقطر، وأخيراً التركيز الخامس (5/100) وحضر بإذابة (0.5غم) من الكلوكوز في (10 مل) من الماء المقطر.

3. تم قياس معامل الانكسار (Refraction Index)، لكلّ تركيز من تراكيز المستخلصات الكلوكوزية المستخدمة.
4. رسم منحني قياسيّ (Calibration curve) للتراكيز المختلفة من سكر الكلوكوز، والذي كان يربط كلاً من التركيز ومعامل الانكسار.
5. تم تحضير المستخلصات النباتيّة المختلفة باضافة (50 مايكرولتراً) من كلّ مستخلص نباتيّ إلى (10 مل) من المحلول الملحيّ الفورماليني.
6. صفّر الجهاز باستخدام المحلول الفورماليني الفسلجيّ وحده، والذي عُدّ محلول سيطرة.
7. أضيفت عدة قطرات من كلّ مستخلص نباتيّ إلى المكان المخصص للقياس في الجهاز وقرئت النتيجة عندما أصبح خط الوسط الفاصل بين النصفين المظلم والمضيء بين المحاور بالضبط.
8. وجد بأن النتائج المستحصلة تتوافق مع نتائج المحاليل المخففة لسكر الكلوكوز.
9. تم تطبيق المعادلات السابقة لاستخراج زاوية الدوران النوعيّ لكلّ مستخلص ومطابقة النتيجة بالجدول القياسيّ لأنواع السكريات المختلفة.

3-4-4 جمع الدم واستحصال عالق كريات دم الضأن

1-جمع دم الخراف في أثناء ذبح الحيوان باستعمال قنينة زجاجية معقمة حاوية على مانع التخثر محلول السيفر Alsever's Solution بنسبة 1:1 ومزجت جيداً.

2- نقل 3 مل من دم الخراف بوساطة ماصة نظيفة ومعقمة إلى أنبوبة الطرد المركزي.

3- شُغِلَ جهاز الطرد المركزيّ لمدة 5 دقائق وبسرعة 2500 دورة /دقيقة، ترك الراشح وتم الاحتفاظ براسب كريات الدم الحمراء.

4- أضيف إلى كريات الدم الحمر كمية من المحلول الملحيّ الفسلجيّ وخلط المحلول بوساطة ماصة باستور (Pastaur pipette) نظيفة ومعقمة، كررت الخطوة السابقة مرتين لغرض غسل كريات الدم الحمراء جيداً.

5-يؤخذ حجم 0.25 مل من الخلايا الدموية الحمراء المضغوطة ويضاف لها 10 مل من المحلول الفسلجيّ، حيث يصبح تركيز الخلايا 2.5%، يحفظ بالثلاجة لحين الاستعمال.

3-4-5 تلازن كريات الدم الحمراء بوساطة اللكتين
Agglutination of Erythrocytes by Lectin

أُستعمل طبق المعايرة لغرض إجراء التلازن كالاتي:

1- وضع في كلّ حفرة 50 مايكروليتر من المحلول الملحيّ الفسلجيّ.

2- أضيف إلى الحفرة الأولى 50 مايكروليتر من المستخلص اللكتينيّ المحضر وخلط بالماصة المايكروية .

3- نقل 50 مايكروليتر من الحفرة الأولى إلى الحفرة الثانية وخلط بالماصة المايكروية.

4- كررت الخطوة السابقة إلى حين الوصول إلى آخر حفرة، حيث أهمل منها 50 مايكروليتر وبذلك يكون المستخلص اللكتينيّ قد خفف مرات عديدة بحيث يبقى حجم السائل في الحفر ثابتاً.

5- أضيف إلى كلّ حفرة 50 مايكروليتر من محلول الدم المخفف ورّج الطبق بلطف.

6- حضن الطبق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 45 دقيقة.

7- أخرج الطبق من الحاضنة وتم تدويره بلطف وسجل مقدار العيار .

3-5 الكواشف المناعيّة

3-5-1 مشتق البروتين المنقىّ Purified Protein Derivative (P.P.D)

مستحضر مشتق البروتين المنقى 10,5 وحدات وبتخافيف مختلفة من بكتريا *M. tuberculosis* ، إذ استحصل من معهد المصول واللقاحات –بغداد، حيث استخدم هذا الكاشف في تمنيع الحيوانات وفي الفحص في الزجاج.

3-6 الارانب

تم استعمال (54) أرنباً من الأرانب المحلية البالغة Oryctolagus Cuniculus حسب تصنيف متحف التاريخ الطبيعي معززة باراء (Hime & Donoghue, 1979) وبمعدل 5 مكررات لكل مجموعة من مجاميع الاختبار (حسب طبيعة المعاملة) بسبب وجود تغاير في

الاستجابة المناعية بين الحيوانات المختلفة (Beck *et al.*,1993) وكانت ذات اوزان تتراوح بين (كيلو-كيلو ونصف).

اما العمر فكان في حدود شهرين- ثلاثة أشهر وجرت أقلمتها بجوّ البيت الحيوانيّ لمدة خمسة عشر يوماً تحت الظروف القياسية للاكل والشرب والتأهيل Ad libitum (Schneider *et al.*,1999) طعام الحيوانات هو العليقة الخضراء (نبات الجت + نبات الدريس (البرسيم)) وماء الشرب هو ماء الصنبور، تم تجريب المستخلصات النباتية المستعملة ودراسة اثرها المحور للجهاز المناعي لهذه الحيوانات.

7-3 الفرز الغشائيّ Dialysis

بعد عملية فصل المستخلصات النباتية اللكتينيّة باستعمال محلول كبريتات الأمونيوم (40%) (Mahdi, 2000)، تم اجراء عملية الفرز الغشائيّ لغرض تخليص المحاليل اللكتينيّة من البقايا الملحيّة والجزيئات العضوية الصغيرة التي يحتمل وجودها بعد عملية الفصل، حيث تم إجراء هذه العملية حسب ما ذكره (1986, Boyer) وكما يأتي:

1- استخدمت أغشية ديلزة بأبعاد (15× 1) سم وقطر ثقوب M.W. cut off (12-14) K.D. بعد فتح فوهتي الغشاء بترطيب طرفيه بالماء تم ملؤه بالماء للتأكد من عدم وجود انسياب للماء إلى الخارج بعد غلق فوهتي الكيس.

2- وضع المحلول المراد فرزه غشائياً بوساطة قمع زجاجيّ في داخل الغشاء وربطت نهايتي الغشاء بإحكام مع ترك فراغ فوق سطح المحلول داخل الغشاء مساوٍ تقريباً لنسبة (15%) من حجم غشاء الفرز الكلّيّ.

3- حضر وعاء الفرز الغشائيّ (Dialysis /Jar) الحأوي على الماء المقطر بنسبة 20 حجماً من الماء المقطر إلى حجم واحد من محلول اللكتين المحضر.

4- جرى تعليق أغشية الديلزة في وعاء الفرز الغشائيّ وذلك بتثبيت الخيط الرابط للنهاية العليا لأغشية الفرز بوساطة مسمار والمحافظة على وضع شاقوليّ لأغشية الفرز داخل الوعاء ثم ربط مثقال معدنيّ صغير في الخيط الرابط للنهاية السفلى لغشاء الفرز.

5- وضع الوعاء على جهاز مغناطيسيّ Magnetic Stirrer دور بسرعة ملائمة لتحريك الماء داخل الوعاء ثم وضع الجهاز داخل الثلاجة بدرجة حرارة 4°م.

6- جرى تبديل الماء الموجود داخل وعاء الفرز كلّ 24 ساعة.

7- أجريت عملية الفرز الغشائيّ لمدة 3 أيام متواصلة.

8- رفعت أنابيب الفرز الغشائيّ وفرغت من المحلول المفرز غشائياً بقطع إحدى نهايتي غشاء الفرز في أنابيب جمع نظيفة ومعقمة ومغلقة الفوهة وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

8-3 تحديد جرعة اللكتين المفيدة لدراسة الأثر المناعيّ:

جرى جلب 24 أرنباً من السوق المحلية وبعد ثبوت سلامتها من العدوى البكتيرية والطفيلية وأقلمتها بجو البيت الحيوانيّ. جرعت المجموعة الأولى بتركيز 10 ملغم /مل والثانية 5ملغم /مل وبجرعتين متتاليتين لمدة يومين فتبين بان الجرعة 5 ملغم /مل ليس لها فعل سميّ حاد للأرانب فتم اعتمادها في دراسة الأثر المحور للكتين، بينما أظهرت الجرعة 10 ملغم/ مل أثر سميّ حاد ومميت على حيوانات المعاملة فتم استبعادها من برنامج

التمنيع. كما في الجدول أدناه وجرعت المجموعة الثالثة ماء ملح وظيفيّ. (Lindsey *et al.*, 1980)

جدول(3-2): يبين الجرع التي تم استعمالها في تجريع الحيوانات.

التركيز ملغم/مل	العدد	الخيار Cs	الحنظلCc
10	8	1D	3D
5	8	0D	0D
0	8	0D	0D

حيث إن:
D = Death

3-9 برامج التمنيع Immunization programe

3-9-1 الاستجابة المناعيّة الأولية (الخلطية والخلوية)

لقد تم انتقاء خمسة عشر أرنبا والتأكد من سلامتها من الأمراض المعدية والإصابات البكتيرية والطفيلية وتم جلبها من السوق المحلية ثم وضعت في البيت الحيواني وتم أقلمتها على ظروف التجربة من الآكلّ والشرب وظروف التأهيل حيث استمرت فترة التأقلم هذه خمسة عشر يوماً وبعدها تم إجراء برنامج تمنيع الحيوانات، حيث تم تجريع كلّ من مجموعتي الاختبار ومجموعة السيطرة بجرعة واحدة من مستضدّ التيوبركلّين بحجم واحد مل وبتركيز 0.1 IU وتم الحقن في ستة مناطق هي منطقة العضلتين ومنطقتي فوق الحوض ومنطقتي قرب لوح الكتف وتبعه تجريع مجموعتي الاختبار في أعلاه بخمس جرع لكتينية بتركيز 5 ملغم/ مل ولخمسة أيام متوالية (Lindsey *et al.*1980) وبعد انتهاء برنامج التمنيع هذا تم سحب الدم في اليوم السادس والتاسع والثاني عشر والخامس عشر والثامن عشر وإجراء اختبار المناعة الخلطية (التلازن الدمويّ المنفعل Passive Haemagglutination) واختبار المناعة الخلوية (معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض Leucocytes inhibition Factor) واختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة (Skin Test) وقد وضحت عملية حقن المستضدّ التيوبركلّين والمادة المحورة للاستجابة المناعيّة (اللكتين) على وفق الجدول (3-3)

جدول (3-3) :برنامج تمنيع لمعرفة تأثير كلّ من المستضدّ والمحور على الاستجابة المناعيّة الأولية الخلطية والاستجابة المناعيّة الأولية الخلوية

المجموعة	عدد الحيوانات	تركيز المستضدّ IU	تركيز المحورmg/ml	تردد الحقن للمستضد	تردد الحقن للمحور
I مجموعة السيطرة	5	0.1	0	جرعة واحدة	لم تجرع
II مجموعة	5	0.1	5	جرعة	خمسة جرع

الحنظل				واحدة	ولخمسة أيام متوالية
III مجموعة الخيار	5	0.1	5	جرعة واحدة	خمسة جرع ولخمسة أيام متوالية

3-9-2 الاستجابة المناعيّة الثانوية (الخلطية والخلوية):

بعد تهيئة الحيوانات تهيئة مسبقة جرى تنفيذ برنامج تمنيع الحيوانات المعاملة لمعرفة تاثير كلّ من المحور اللكتينيّ والمستضدّ التيوبركلّين، حيث جرع المحور بمعدل خمس جرع لكلّ من لكتينيّ الدراسة (الخيار والحنظل) وبتركيز 5 ملغم /مل فصلت بين جرعة وأخرى مدة أمدها خمسة أيام (Lindsey *et al.*, 1980) وتبعه تجريع كلّ من حيوانات المعاملة وحيوانات السيطرة بمستضد التيوبركلّين بحجم1 مل وبتركيز 0.1 IU ذي التركيز القياسي 5 وحدات وبمعدل ثلاث جرع فصلت بين جرعة وأخرى مدة زمنية أمدها سبعة أيام، وتم الحقن في ستة مناطق هي منطقتي العضلتين ومنطقتي فوق الحوض ومنطقتي قرب لوح الكتف ثم بعد ذلك تم سحب الدم من القلب مباشرةً Heart Puncture وإجراء اختبارات المناعة الخلطية والمناعة الخلوية واختبار فرط الحساسية المتأخرة وقد نفذ برنامج التمنيع هذا وفق الجدول (3-4)

جدول (3-4): برنامج تمنيع لمعرفة تأثير كلّ من المحوراللكتينيّ والمستضدّ على الاستجابة المناعيّة الثانوية الخلطية والاستجابة المناعيّة الثانوية الخلوية

المجموعة	عدد الحيوانات	تركيز المستضدّ IU	تركيز المحور mg/ml	تردد الحقن للمحور	تردد الحقن للمستضد
I مجموعة السيطرة	5	0.1	0	لم تجرع	اسبوعياً ولمدة ثلاثة اسابيع
II مجموعة الحنظل	5	0.1	5	خمسة جرع تفصل بين جرعة وأخرى خمسة أيام	اسبوعياً ولمدة ثلاثة اسابيع
III مجموعة الخيار	5	0.1	5	خمسة جرع تفصل بين جرعة وأخرى خمسة أيام	اسبوعياً ولمدة ثلاثة اسابيع

3-10 استحصال الأمصال وحفظها Serum collection and preservation

بعد إنهاء عملية تمنيع الحيوانات تم جمع الأمصال منها وذلك بسحب الدم من القلب مباشرة (Heart puncture)، حيث جمع الدم في أنابيب معقمة وتركت كي يتخثر الدم، بعدها وضعت هذه الانابيب في جهاز الطرد المركزي ونبذت لمدة 5 دقائق وبسرعة 2500 دورة /دقيقة، ثم فصل المصل بوساطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة ووضع في انابيب لحفظ العينات وحفظت في المجمدة لحين الاستعمال.

3-10-1 طريقة تحضير عالق كريات الدم الحمر للخراف المغطاة بمستضد التيوبركلّين

تم دبغ وتغطية الكريات الحمر بمستضد التيوبركلّين على وفق الطريقة Garvey (*et al.*, 1977) كالآتي:

1- تم الحصول على عالق كريات الدم الحمر للخراف في اثناء ذبح الحيوان باستعمال قنينة زجاجية معقمة.

2- تم اضافة مانع التخثر محلول السيفر Alsever's solution إلى عالق كريات الدم الحمر بنسبة 1:1 ومزج معه بلطف، وتم حفظ الدم بدرجة حرارة 4 مْ.

3- نقل 3 مل من دم الخراف بوساطة ماصة نظيفة ومعقمة إلى انبوبة الطرد المركزيّ بعد ذلك نبذ بجهاز الطرد المركزيّ لمدة 5 دقائق بسرعة 2500 دورة / بالدقيقة.

4- سحب الراشح بوساطة ماصة باستور معقمة وتم الاحتفاظ بالراسب ونقل اليه 10 مل من محلول الملح الوظيفيّ وبعد ذلك مزج جيداً بوساطة ماصة باستور.

5- نبذت هذه الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي 5 دقائق بسرعة 2500 دورة / بالدقيقة ثم ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب.

6- تم إضافة 10 مل من محلول الملح الوظيفي إلى راسب كريات الدم الحمر ومزج جيداً بوساطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة.

7- أخذ 3 مل من العالق أعلاه (الفقرة6) أضيف إليه 3 مل من محلول حامض التانيك (0.5%) ثم مزجا جيداً بوساطة ماصة باستور معقمة وبعد ذلك وضعت الأنبوبةفي حمام مائي درجة حرارته 37مْ ولمدة 10دقائق.

8- نبذت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزيّ لمدة 5 دقائق وبسرعة 2500 دورة /الدقيقة، بعد ذلك ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب.

9- تم إضافة 3 مل من محلول الملح الوظيفي إلى راسب كريات الدم الحمر ومزج جيداً بوساطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة أضيف إلى هذا المعلق 3 مل من مستضدّ التيوبركلّين وذلك لتغطية كريات الدم الحمر كافة بهذا المستضدّ وترك هذا المعلق لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

10- نبذت الأنبوبة الحاوية على عالق كريات الدم الحمر المغطاة بالمستضدّ في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 2500 دورة /الدقيقة.

11- ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب أضيف إليه 5 مل من محلول الملح الوظيفي لأجل غسل كريات الدم الحمراء، ثم نبذت الأنبوبة بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة /بالدقيقة ولمدة 5 دقائق وترك الراشح واحتفظ بالراسب.

12- تم إضافة 4 مل من محلول الملح الوظيفي الفسلجيّ إلى راسب كريات الدم الحمر المغطاة بالمستضدّ وذلك لغرض استخدامه في معايرة الأضداد الجهازية المصلية.

3-10-2 التلازن الدموي غير المباشر

Indirect Passive Haemagglutination

استعمل طبق المعايرة لغرض اجراء التلازن الدموي غير المباشر وفقاً لطريقة Garvey واخرون (1977) وكالاتي:

1- وضع في كلّ حفرة 50 مايكروليتر من المحلول الملحيّ الفسلجيّ.

2-أضيف إلى الحفرة الأولى 50 مايكروليتر من المصل المحضر وخلط بالماصة المايكروية.

3- نقل 50 مايكروليتر من الحفرة الأولى إلى الحفرة الثانية وخلط بالماصة المايكروية.

4- كررت الخطوة السابقة إلى حين الوصول إلى آخر حفرة، حيث أهمل منها 50 مايكروليتر وبذلك يكون المصل قد خفف مرات عديدة كي نحصل على تخافيف2/1، 4/1، 8/1، 16/1، 32/1، ..... 4096/1 بحيث يبقى حجم السائل في الحفر ثابتاً.

5- أضيف إلى كلّ حفرة 50 مايكروليتر من عالق كريات الدم المغطاة بمستضد التيوبركلّين ورج الطبق بلطف.

6- حضن الطبق بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 45 دقيقة.

7-أخرج الطبق من الحاضنة وتم تدويره بلطف وسجل مقدار العيار.

8-وضع الطبق في الثلاجة لمدة 24 ساعة وسجل العيار مرة أخرى.

3-10-3 جمع عينات دم مع مانع تجلط

بعد إنهاء برنامج تمنيع الحيوانات تم سحب الدم من القلب مباشرة، حيث جمع الدم في أنابيب معقمة حأوية على مانع تجلط AFMA. Dispo. EDTA التي تستعمل مرة واحدة معقمة حأوية على مادة EDTA كمادةً مانعةً للتجلط وحفظت في الثلاجة لأجراء اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض الجهازية (Soberg, 1969).

3-10-4 قياس عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض في الدم للأرانب (Soberg, 1969)

تم هذا الاختبار للكشف عن وجود عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض في الدم للأرانب كما ياتي:

1- تم تحضير وسط Agar - Agar في أطباق بلاستيكية معقمة وتم عمل حفرتين بقطر 2 سم على طبقة الاكار.

2- وضعت في كلّ حفرة أنبوبة شعرية حأوية على راسب كريات الدم الحمر وطبقة Buffy coat بعد إزالة طبقة البلازما منها بعد ان تم طردها مركزياً بجهاز Haematocrite لمدة (10) دقائق.

3- أضيف حجم 50 مايكروليتر من محلول Basal medium Eagle إلى الحفرتين، حيث تكون إحداهما للسيطرة (Control).

4- أضيف 0.1 ملليتر من محلول مستضدّ التيوبركلّين ذي التركيز u 5 (معهد المصول واللقاحات) و 0.1 مل من المحلول الملحيّ الفسلجيّ إلى كل من حفرتي الاختبار والسيطرة على التوالي.

5- حضنت بدرجة حرارة (37 مْ) داخل Anaerobic Jar مع وضع قطعة مبللة لمدة 24 ساعة في الحاضنة.

6- تم حساب معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض بحسب ما ذكره (Soberg, 1969):

$$\text{معامل التثبيط} = \frac{\text{قطر دائرة الهجرة مع المستضدّ}}{\text{قطر دائرة الهجرة من دون المستضدّ}} \times 100$$

11-3 دراسة اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة في الأرنب

أخذ ثلاثون أرنباً وقسمّوا إلى مجموعتين كلّ منها 15 أرنباً للاستجابة الأولية و15 أرنباً للاستجابة الثانوية وكلّ مجموعة قسمت إلى ثلاث مجاميع بمعدل خمسة أرانب لكلّ مجموعة وتم بعد ذلك إجراء برنامج منوال تمنيع الحيوانات لدراسة الاستجابة المناعيّة الأولية وتبعه منوال تمنيع الحيوانات لدراسة الاستجابة المناعيّة الثانوية، جرى بعد ذلك حقن 0.1 مل من مشتق البروتين المنقى بالأدمة بعد حلاقة الشعر من منطقة جنب البطن لدراسة تفاعل فرط الحساسية المتأخرة (Burrell, 1979).

12-3تحديد التحوير المناعيّ Immunomodulation Determination

إن زيادة عيار الضد المتخصص بمستضدّ مشتق البروتين المنقى (.5unit PPD) زيادة واضحة في المجاميع المعاملة باللكتينات عن تلك المجاميع غير المعاملة بها يعني حصول تحوير مناعيّ مضخم للاستجابة المناعيّة. ونقصان العيار بصورة واضحة عن تلك غير المعاملة بها يعني حصول تحوير مناعيّ خافض للاستجابة المناعيّة، وحصول تأجج في تفاعل اختبار الجلد المتأخر أو زيادة معنويّة في التثبيط ونسبه بالنسبة للخلايا البيض يعني حصول تحوير مناعيّ.

13-3 بذور النبات Plant Seeds

أُستعملت في هذا البحث بذور جافة لنباتات محلية زرعت في القطر ونبات محليّ بريّ ينمو بصورة طبيعية في المناطق الصحراوية الجافة يعود إلى العائلة القثائية (القرعية)

وفي ما يأتي جدول بأسماء النباتات المحلية وأسمائها الشائعة والعلمية واسم العائلة، بحسب تصنيف لينايوس.

جدول (3-5): النباتات المستعملة والاسم العلمي والشائع واسم العائلة ازاء كلّ منها

الاسم العربي للنبات	الاسم العلمي	الاسم الشائع	اسم العائلة

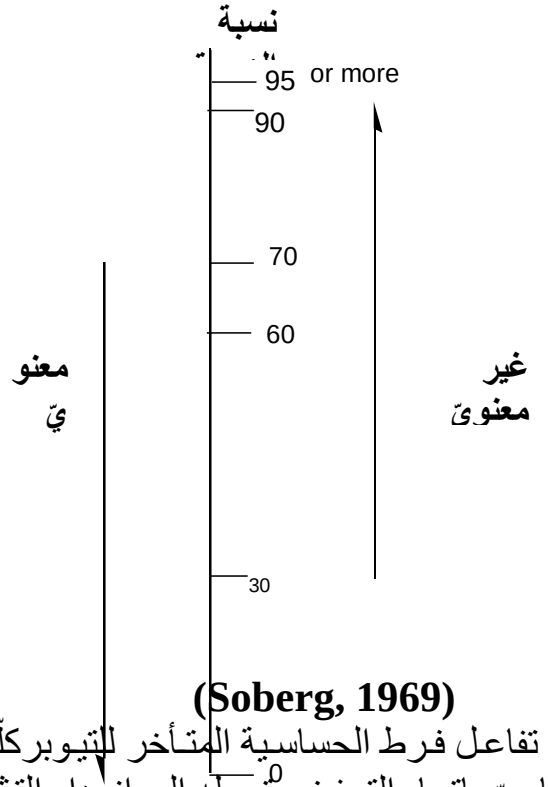
Cucurbitaceae	Colocynthus (Bitter Apple)	Citrullus colocynthus	الحنظل (التفاح المر)
Cucurbitaceae	Cucumber Gherkin	Cucumber sativus	خيار ماء

14-3 معايير تحديد التحوير المناعيّ:

اعتمدت ثلاثة معايير لتحديد حدوث التحوير المناعيّ كما هو موضح في آلاتي:

1- الاستجابة المناعيّة الخلطية:- زيادة عيار الضدّ أو انخفاضه في المعاملة عن ما هو عليه في السيطرة.

2- اختبار تثبيط هجرة الخلايا:- تحول التثبيط من معنويّ إلى غير معنويّ يعني حصول تحوير مناعيّ مثبط وتحول غير المعنويّ إلى معنويّ يعني حصول تنبيه مضخم للاستجابة المناعيّة الخلوية.



(Soberg, 1969)

3- اختبار الجلد:- ظهور تفاعل فرط الحساسية المتأخر للتيوبركلّين بقطر تثخن كبير يعني حصول تحول مناعيّ باتجاه التحفيز وتحوله إلى انعدام التثخن والاحمرار يعني حصول تحوير باتجاه التثبيط.

15-3 منوال الدراسة

جرى اتباع منوال الدراسة يبدأ بفصل والتعرف الجزئيّ للكتين ثم دراسة دوره كمحور مناعيّ كما هو مبين في الشكلّ الآتي:

بذور النبات

↓

↓

|

فصل اللكتين

التعرف الجزئي

التعرف على البروتين التعرف على السكر التلازن الدمويّ المباشر

الإنفاذ

تحديد جرعة المحور المناعيّ

دراسـة الأثر

مناعـة خلـطية مناعـة خلـوية

أوليـة ثانويـة أوليـة ثانويـة

التحري: عيار الضد التحري: Skin test
LIF

الفصل الرابع Chapter four
النتائج Results

1-4 الوصف الجزئي Partial characterization

بعد تحضير مسحوق دقيق من بذور نبات الحنظل وبذور نبات الخيار جرى تنقيعها بماء مقطر ليلة واحدة بدرجة 4 مْ ثم فصل اللكتين بطريقة الاستخلاص المائي البارد ثم رسب باستخدام مبدأ التمليح بكبريتات الامونيوم 40% مشبعاً وتنقيتها جزئياً بالإنفاذ Dialysis ثم جرى وصفها جزئياً إذ تضمن الوصف كلاً من تفاعل بايوريت لتحديد تركيز البروتين واستخدام ظاهرة الاستقطاب لتحديد نوع السكر المرتبط بالبروتين وخاصية التلازن الدمويّ المباشر لعالق كريات دم الخراف 1% (الضأن).وخصائص ظاهرة الاستقطاب هذه تماثل خاصية استقطاب الكلّوكوز في المنحني القياسيّ ولتخافيف هذا السكر. وكان عيار الضدّ التلازنيّ 2048 في الحنظل في حين كان في خيار الماء 128 وكان تركيز البروتين في لكتين الخيار 17.40 ملغم/مل بينما كان تركيز البروتين في لكتين بذور الحنظل 11.5 ملغم/مل. كما هو مبين في (جدول 4-1) و (جدول 4-2) و (شكلّ4-1)

جدول 4-1 الوصف الجزئي للكتينات البذور الجافة لنبات الخيار والحنظل

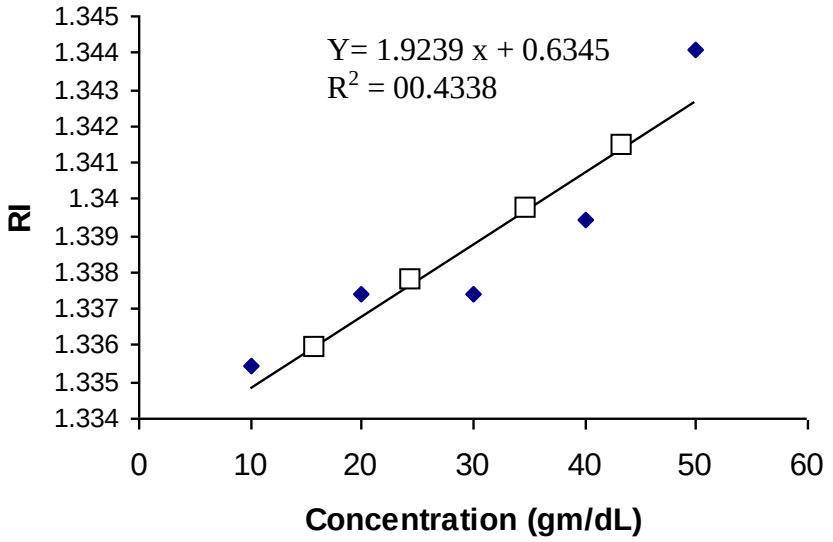
نوع اللكتين	تركيز البروتين ملغم/مل	الاستقطاب (معامل الانكسار)	عيار التلازن الدموي المباشر لكريات الدم الحمر للضأن
لكتين بذور الخيار	17.40	1.335442	128
لكتين بذور الحنظل	11.15	1.335542	2048

جدول(4-2) معامل انكسار الكلّوكوز القياسيّ

تركيز الكلّوكوز g/dL	درجة الحرارة ْC	معامل الانكسار RI
10	15.1	1.33541
20	15.2	1.33741
30	15.3	1.33742
40	15.4	1.33941

1.3441	15.5	50

شكلّ(4-1) يبين منحني المعايرة لتقدير تركيز السكر من المستخلص



وباستخدام خاصية زاوية الدوران

□ **Best fitting point**

◆ **Actual point**

$$[\alpha]^{T}{}_{D} = \frac{\alpha \times 100}{L \times C}$$

حيث إن :

α = زاوية الدوران

$[\alpha]^{T}{}_{D}$ = زاوية الدوران النوعيّ

L = طول الأنبوبة المستخدمة في الجهاز

C = تركيز المستخلص بوحدة g/dL

ولتحديد تركيز السكر في المستخلص اللكتينيّ

$$[C] = \frac{R.I - Intercept\ (b)}{Slope\ (a)}$$

حيث إن:

R.I = معامل الانكسار Refractive Index

b = التقاطع Intercept

a = الميل Slope

b,a ثوابت تم استخراجها من معادلة الخط المستقيم

$$y\hat{} = 1.9239X + 0.6345$$
$$R^2 = 0.4338$$

حيث وجد إن تركيز الحنظل في المستخلص اللكتينيّ هو

$$[C] = \frac{1.335542 - 0.6345}{1.9239} = 0.3643858$$

في حين وجد إن تركيز الخيار في المستخلص اللكتينيّ هو

$$C = \frac{1.335442 - 0.6345}{1.9239} = 0.364387$$

وان زاوية الدوران النوعيّ للحنظل في المستخلص

$$[\alpha]_D^T = \frac{0.1 \times 100}{10 \times 0.363858} = 2.744335$$

في حين ان زاوية الدوران النوعيّ للخيار في المستخلص

$$[\alpha]_D^T = \frac{0.1 \times 100}{10 \times 0.363858} = 2.744335$$

ومن الخصائص الواردة آنفا عُدّ المستخلصان حاويين على لكتينات كلايكوبروتينية الطبيعة ملزنة لكريات دم الضأن 1%.وستكون الدراسة حول الأثر المحور لهذين اللكتينين على الاستجابة المناعيّة الخلطية والخلوية وفي طوريهما الأوليّ والثانويّ.

2-4 أثر لكتينات بذورالخيار والحنظل المحور للمناعة الخلطية:

1-2-4 الاستجابة المناعيّة الخلطية الأوليّة:-

جرى تجريع كلّ من حيوانات السيطرة وحيوانات المعاملات بمستضدّ مشتق البروتين المنقى PPD لبكتريا التدرن *M. tuberculosis* ثم تبعها خمس جرع لكتين فموية بمعدل 5mg/mL ، ولكلّ من لكتينيّ الدراسة.

وجرى جمع عينات دم من حيوانات السيطرة في اليوم 6،9،12،18 بعد التجريع. وكانت عيارات الضدّ المتخصص بالتيوبركلّين 32،64،16،32 للأيام المشار إليها آنفاً على التوالي.

أما تلك الحيوانات التي عوملت بلكتين الخيار بعد تجريعها بالمستضدّ PPD فكانت عيارات الضدّ المتخصص بـ PPD هي 64،32،32،32 على التوالي في حين أن الحيوانات المعاملة بلكتين الحنظل بعد التجريع بالمستضدّ كانت عيارات الضدّ المتخصص بمشتق البروتين المنقى PPD 128،128،64،64 للأيام 6،9،12،18 على التوالي .

وهذا يعني أن وجود لكتينات الخيار والحنظل قد أدى إلى زيادة نسبية طفيفة في عيار الضدّ المتخصص بمستضدّ مشتق البروتين المنقى. كما هو موضح في الجدول (4-3) شكلّ (4-2).

جدول 4-3 الاثر المحور للاستجابة المناعيّة الخلطية الأوليّة والمحتمل لكلّ من لكتين بذور الخيار وبذور الحنظل.

نوع الممنع	عيار الضدّ المتخصص بمستضدّ مشتق البروتين المنقى PPD بعد حقن اللكتين			
	اليوم (6)	اليوم (9)	اليوم (12)	اليوم (18)
PPD وحده	32	64	16	32
PPD ثم لكتين الخيار	64	32	32	32
PPD ثم لكتين الحنظل	128	128	64	64

4-2-1-1 التقويم الاحصائي لاثر لكتينات الخيار والحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلطية الأوليّة:

جرى احتساب معدل عيارات الضدّ المتخصص بالتيوبركلّين بالنسبة لدورة الاستجابة المناعيّة الخلطية الأوليّة وتم احتساب الخطأ المعياريّ لكلّ حالة على حدة، بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكلّ من الخيار- سيطرة، الحنظل – سيطرة والخيار- حنظل عن طريق استخدام إحصاء t ذي النهايتين، فوجد بان قيمة t الجدولية معنوية عند مقارنة الحنظل – سيطرة والحنظل- خيار وغير معنوية في حالة الخيار – سيطرة عند مستوى معنوية p:0.05 إذ كانت tالمحسوبة في حالة الحنظل- سيطر ة 2.8 وفي حالة الخيار- حنظل 2.77 و t الجدولية عند درجة حرية 6 وبمستوى معنوية P: 0.05 كانت 2.447.

جدول (4-4) يبين المعالم والبيانات الإحصائية لأثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعيّة الخلطية الأوليّة.

المقارنة بين	t المحسوبة	t الجدولية	الفروق	درجة	مستوى

الخيار – سيطرة	0.310	2.447	غير معنوي	6	0.05
الحنظل – سيطرة	2.8	2.447	معنوي	6	0.05
الخيار – حنظل	2.77	2.447	معنوي	6	0.05

4-2-2 الاستجابة المناعيّة الخلطية الثانوية.

تم تهيئة الأرانب تهيئة مسبقة بخمس جرع فموية من لكتين بذور الخيار ولكتين بذور الحنظل بتركيز 5 ملغم/مل بعدها جرعت بمستضدّ مشتق البروتين المنقى بمنوال تمنيع متعدد الحقن ولعدة جرعات يفصلها خمسة أيام بين جرعة واخرى وبعد فترة التمنيع جرى اخذ عينات دم واستحصلت الامصال وحدد مدى عيار الضدّ المتخصص بمشتق البروتين المنقى لكلّ من المدد 35, 40, 45 بعد فترة التمنيع فكانت العيارات في حالة لكتين الخيار 2048, 4096, 4096 وحالة لكتين الحنظل 2048, 4096, 4096 مقارنةً بعيار حيوانات السيطرة إذ كانت 1024,1024,2048 وعلى التوالي للأيام المشار إليها آنفا بعد فترة التمنيع. كما هو في الجدول (4-5) والشكلّ(4-2).

ويلاحظ من جدول(4-5) والشكلّ(4-2) بان هناك ارتفاعاً نسبياً في عيارات الضدّ المتخصص بمشتق البروتين المنقى بوجود لكتين بذور الخيار والحنظل.

جدول 4-5 الأثر المحور للاستجابة المناعيّة الخلطية الثانوية المحتمل لكلّ من لكتين بذور الخيار وبذور الحنظل

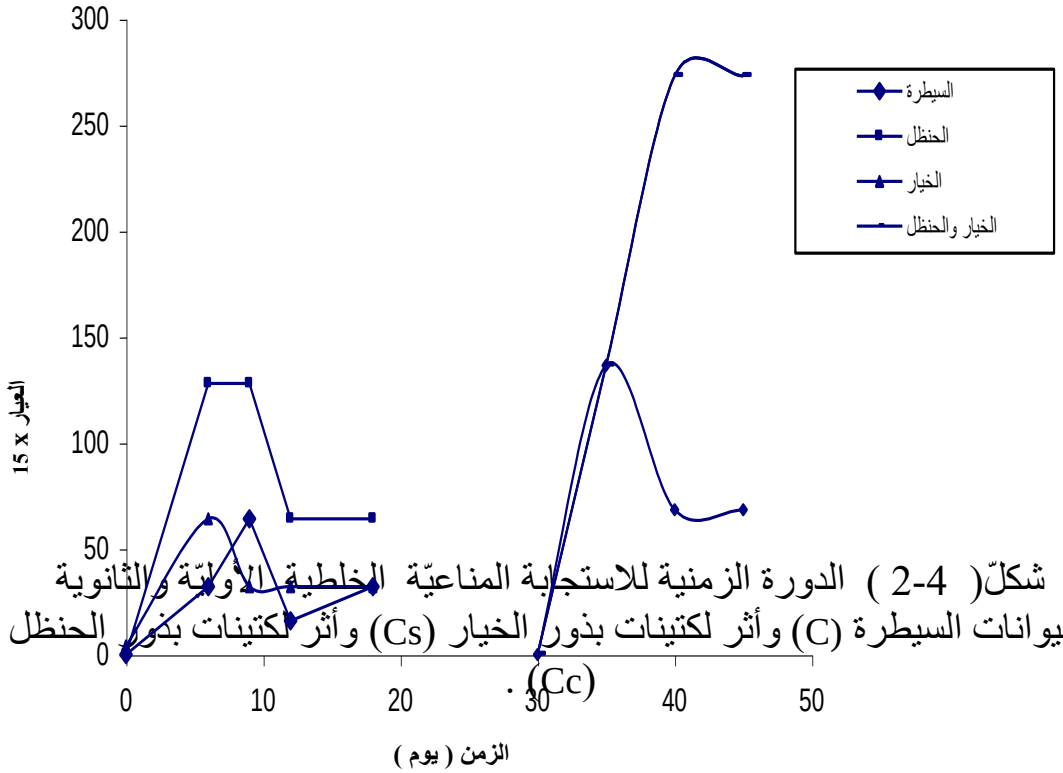
نوع الممنع	عيار الضدّ المتخصص بمستضدّ مشتق البروتين المنقى بعد حقن اللكتين		
	اليوم (35)	اليوم (40)	اليوم (45)
مستضدّ PPD وحده	2048	1024	1024
مستضدّ PPD بعد تهيئة مسبقة بلكتين بذور الخيار	2048	4096	4096
مستضدّ PPD بعد تهيئة مسبقة بلكتين بذور الحنظل	2048	4096	4096

4-2-2-1 التقويم الإحصائيّ لأثر لكتينات الخيار والحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلطية الثانوية:

جرى احتساب معدل عيارات الضدّ المتخصص بالتيوبركلّين بالنسبة لدورة الاستجابة المناعيّة الخلطية الثانوية وتم احتساب الخطأ المعياري لكلّ حالة على حده. بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكلّ من الخيار – سيطرة، الحنظل- سيطرة و الخيار – حنظل عن طريق استخدام إحصاء t ذي النهايتين، فوجد بإن قيمةt الجدولية معنوية عند مقارنة الخيار –سيطرة والحنظل –سيطرة وغير معنوية عند مقارنة الخيار – حنظل عند مستوى معنوية P: 0.05، إذ كانت t المحسوبة في حالة الخيار- سيطرة والحنظل – سيطرة 2.633 و كانت t الجدولية عند درجة حرية 6 ومستوى معنوية P: 0.05 2.447.

جدول (4-6) يبين المعالم والبيانات الإحصائية لاثر لكتينات الخيار والحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلطية الثانوية.

المقارنة بين	t المحسوبة	t الجدولية	الفروق	درجة الحرية	مستوى الاحتمال P
الخيار – سيطرة	2.633	2.447	معنوي	6	0.05
الحنظل – سيطرة	2.633	2.447	معنوي	6	0.05
الخيار – حنظل	0	2.447	غير معنوي	6	0.05



شكلّ(4-2) الدورة الزمنية للاستجابة المناعيّة الخلطية الأوليّة و الثانوية لحيوانات السيطرة (C) وأثر لكتينات بذور الخيار (Cs) وأثر لكتينات بذور الحنظل (Cc).

4-3 أثر لكتينات الخيار والحنظل المحور للمناعة الخلوية

4-3-1 الاستجابة المناعيّة الخلوية (الأوليّة)

بنفس منوال تمنيع الحيوانات في الاستجابة المناعيّة الخلطية جرى برنامج تمنيع الحيوانات في الاستجابة المناعيّة الخلوية (الأوليّة). إذ جرعت مجموعة السيطرة ومجاميع الاختبار بمشتق البروتين المنقى PPD لمستضدّ بكتريا *M. tuberculosis* 0.1 مل ثم جرعت مجاميع الإختبار بخمسة جرع لكتين بتركيز 5 ملغم/ مل وجرى جمع عينات دم في الأيام 3 و 6 و 9 و12 و15 و18 مع مانع تجلط لدراسة اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض وكذلك جرى دراسة فرط الحساسية المتأخر والمتمثل بإختبار الجلد.

فكان معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض في السيطرة هو0.33 و0.38 و0.30 و0.38 و0.38 و0.38 في حين كانت معاملات التثبيط بوجود لكتين الخيار هي 0.98 و0.16 و0.38 و0.66 و0.70 و0.61 أما بوجود لكتين بذور الحنظل فكانت معاملات تثبيط هجرة الخلايا البيض 0.97 و 0.66 و0.57 و 0.46 و0.75 و 0.53 للأيام 3 و 6 و9 و 12 و15 و18 على التوالي (جدول 4-7) وشكلّ (4-4).

وكانت أقطار تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة من نوع التيوبركلّين للأيام 3 و6 و9 و12 و15و18 هي 6 و 24 و24 و 24 و18 و12 ملم في حيوانات السيطرة وعلى التوالي و3 و 18 و 18 و 18و3 و12 ملم بالنسبة للخيار مقارنة بالحنظل الذي سجل 3 ,3 ,3 ,3 ,3 ,3 على التوالي للأيام 3 و6 و9 و 12و15 و18 بعد الحقن بالمستضدّ جدول (4-9) و(شكلّ 4-3).

جدول(4-7) الاستجابة المناعية الخلوية الاولية (معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض) للكتين الخيار والحنظل:

نوع الممنع	معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض بعد نهاية منوال حقن اللكتين					
	اليوم (3)	اليوم (6)	اليوم (9)	اليوم (12)	اليوم (15)	اليوم (18)
PPD	0.33	0.38	0.30	0.38	0.38	0.38
PPD ثم لكتين الخيار	0.98	0.16	0.38	0.66	0.70	0.61

PPD ثم لكتين الحنظل	0.97	0.66	0.57	0.46	0.75	0.53

4-3-1-1 التقويم الإحصائيّ لأثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعيّة الخلوية الأوليّة

جرى احتساب معدل معامل تثبيط هجرة كريات الدم البيض عند استخدام التيوبركلّين كمحسس للخلايا البيض بالنسبة لدورة الاستجابة المناعيّة الخلوية الأوليّة وتم احتساب الخطأ المعياريّ لكلّ حالة على حدة بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياريّ لكلّ من الخيار – سيطرة، الحنظل- سيطرة و الخيار – حنظل عن طريق استخدام إحصاء t ذي النهايتين فوجد بان قيمة t الجدولية معنوية عند مقارنة الخيار – سيطرة عند مستوى معنوية P: 0.1 ومقارنة الحنطل سيطرة عند مستوى معنوية p:0.01 وغير معنوية عند مستوى P 0.05 و كانت غير معنوية عند مقارنة الخيار – حنظل عند مستوى معنوية P: 0.05، إذ كانت tالمحسوبة في حالة الخيار – سيطرة 1.94, الحنظل – سيطرة 3.925 والخيار – حنظل 0.5466 و كانت t الجدولية على درجة حرية 10 عند مستوى معنوية 0.05 2.2281 وعند مستوى معنوية 0.01.كانت 3.169 وكانت 1.812عند مستوى معنوية 0.1.

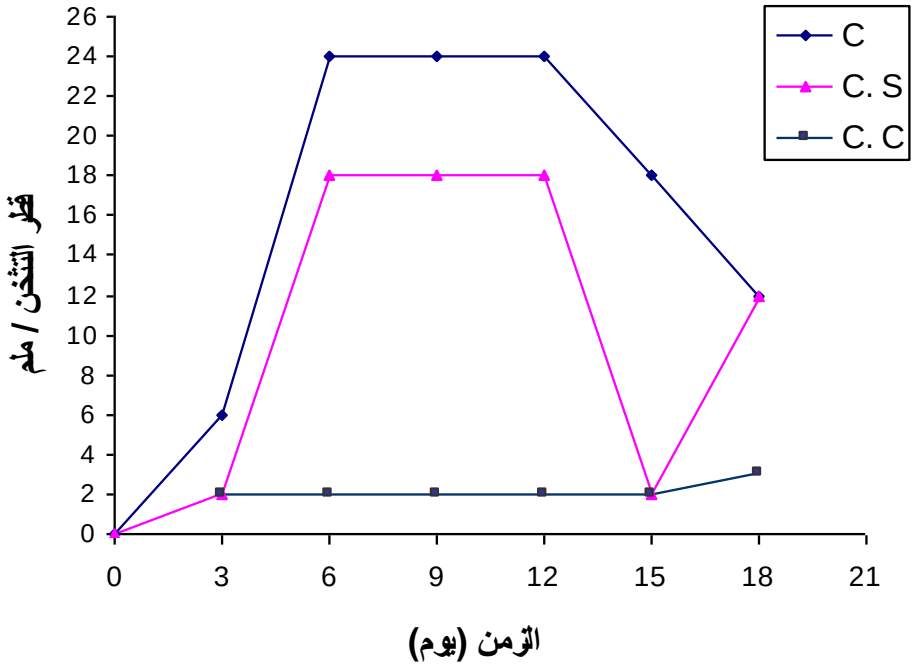
جدول (4-8) يبين المعالم والبيانات الإحصائية لأثر لكتينات الخيار والحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلوية الأوليّة.

المقارنة بين	t المحسوبة	t الجدولية	الفروق	درجة الحرية	مستوى الاحتمال P
الخيار – سيطرة	1.94 1.94	2.228 1.812	غير معنوية معنوية	10 10	0.05 0.1
الحنظل – سيطرة	3.925	3.169	معنوية	10	0.01
الخيار – حنظل	0.5466	2.228	غير معنوية	10	0.05

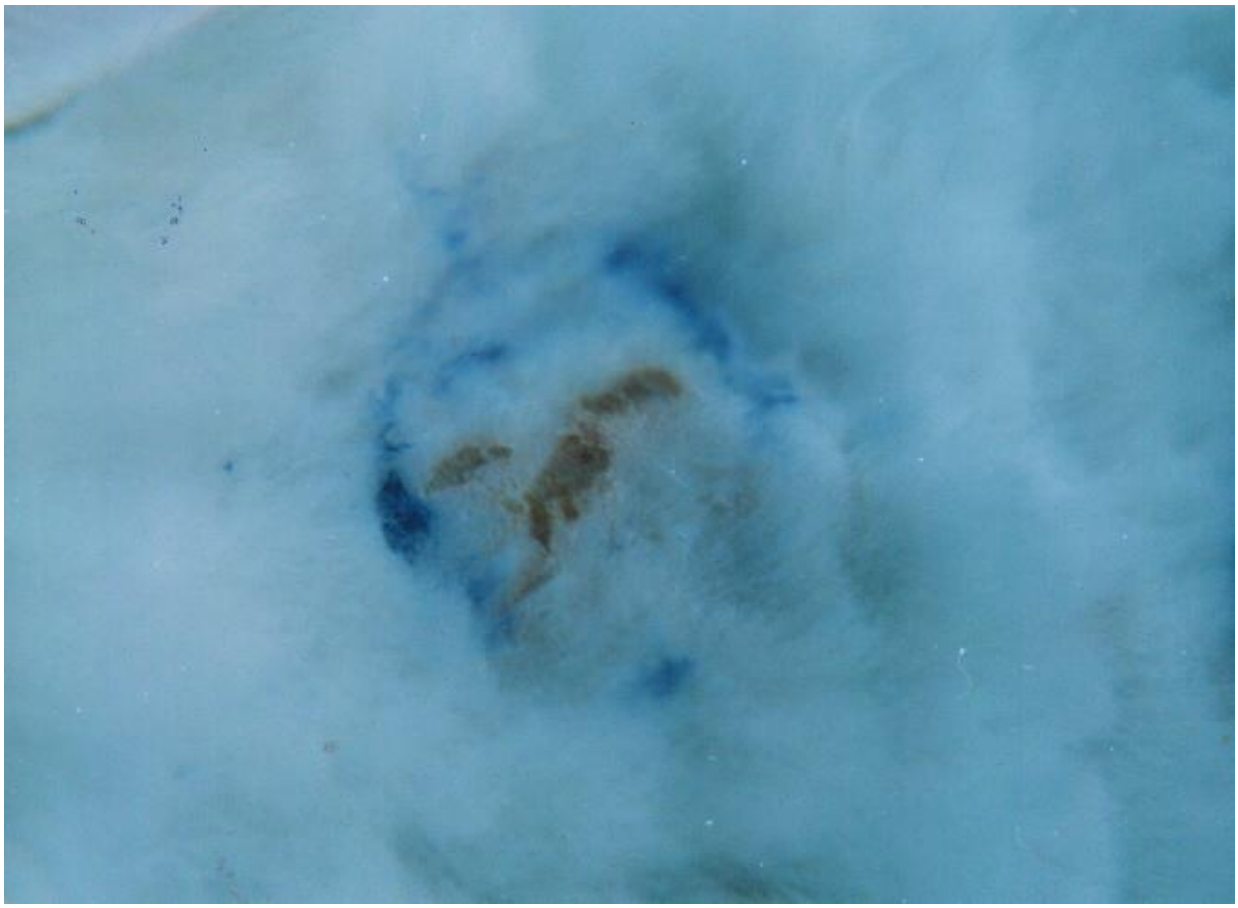
جدول(4-9) الاستجابة المناعية الخلوية الأولية (تفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة) للكتين الخيار والحنظل في الأرنب

نوع الممنع	قطر تفاعل الجلد (ملم) بعد نهاية منوال حقن اللكتين					
	اليوم (3)	اليوم (6)	اليوم (9)	اليوم (12)	اليوم (15)	اليوم (18)
السيطرة PPD لوحده	6	24	24	24	18	12

PPD ثم لكتين الخيار	3	18	18	18	3	12
PPD ثم لكتين الحنظل	3	3	3	3	3	3



شكلّ (4-3) الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية المتخصصة بالتيوبركلّين لحيوانات السيطرة (C) وتلك المعاملة بلكتين الخيار(Cs) والمجموعة المعاملة بلكتين الحنظل (Cc) بدلالة قطر التثخن لتفاعل الجلد.



شكلّ(4-4): صورة لاختبار الجلد في الأرنب المحفز بمستضدّ التيوبركلّين

4-3-1-2 التقويم الاحصائي لاثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية بدلالة تفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة بالتيوبركلّين

جرى احتساب معدل تفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة بالتيوبركلّين بالنسبة لدورة الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية وتم احتساب الخطأ المعياريّ لكلّ حالة على حده. بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياريّ لكلّ من الخيار – سيطرة ، الحنظل – سيطرة و الحنظل- خيار عن طريق استخدام إحصاء t ذي النهايتين فوجد بأن قيمة t الجدولية معنوية عند مقارنة الخيار – سيطرة عند مستوى معنوية 0.2 وغير معنوية عند مستوى معنوية 0.05 P وعند مقارنة الحنظل- سيطرة عند مستوى معنوية 0.01، اذ كانت معنوية في هذه الحالة وقيمتها 3.169 ومعنوية أيضا عند مستوى معنوية 0.001 اذ كانت 4.587 وكانت معنوية عند مقارنة خيار – حنظل عند مستوى معنوية 0.05. إذ كانت قيمة t المحسوبة في حالة الخيار – سيطرة 1.39 والحنظل – سيطرة 5، بينما كانت قيمتها في حالة الحنظل-خيار 3 في حين ان t الجدولية عند درجة حرية 10 ومستوى احتمال 0.05 هي 2.228.

جدول (4-10) يبين المعالم والبيانات الاحصائية لاثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية بدلالة تفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة بالتيوبركلّين

المقارنة بين	t المحسوبة	t الجدولية	الفروق	درجة الحرية	مستوى الاحتمال P
الخيار – سيطرة	1.39	2.228 1.372	غير معنوية معنوية	10 10	0.05 0.2
الحنظل – سيطرة	5	3.169 4.587	معنوية معنوية	10 10	0.01 0.001
الخيار – حنظل	3	2.228	معنوية	10	0.05

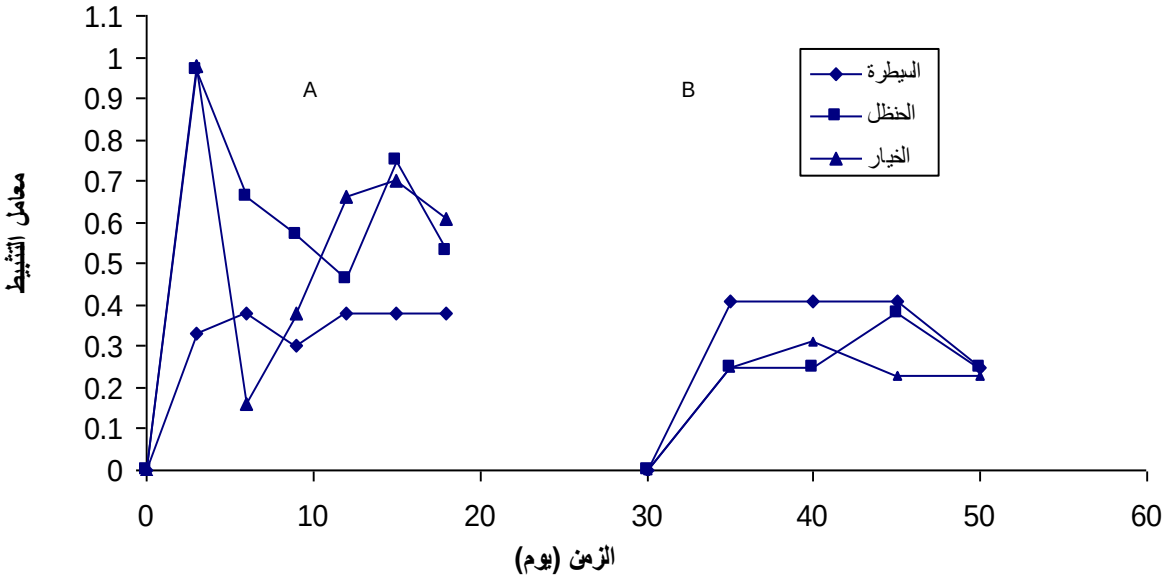
4-3-2 الاستجابة المناعيّة الخلوية (الثانوية):

كما في حالة الاستجابة المناعيّة الخلطية الثانوية لمستضدّ مشتق البروتين المنقى جرى تهيئة الأرانب تهيئة مسبقة باللكتين لبذور الخيار وبذور الحنظل. ثم جرى جمع دم من القلب مباشرة مع مانع تجلط ودرس معامل تثبيط هجرة الخلايا للأيام 35 و 40 و45 و 50 يوماً، وكانت معاملات تثبيط هجرة الخلايا في أرانب السيطرة هي 0.41 ,0.41 ,0.41 ,0.25 على التوالي للأيام المشار إليها أعلاه.

أما في حالة لكتين بذور الخيار هي 0.31,0.25 ,0.23 ,0.23 في الأيام 35 و 40 و45 و 50 يوماً بعد منوال التمنيع على التوالي وفي حالة لكتين بذور الحنظل ولنفس الأيام وعلى التوالي أيضاً هي 0.25 ,0.25 ,0.38 ,0.25 جدول (4-11)و شكلّ (4-5).

وكان تفاعل الجلد في اليوم الثالث بعد منوال التمنيع غير متميز No significant كانت أقطار تفاعل التيوبركلّين للسيطرة 12 والخيار 24 والحنظل 6 ملم جدول (4-13).

أي إن وجود لكتين الخيار قد أدى إلى تحفيز تفاعل الجلد المتأخر ولكن وجود لكتين الحنظل قد أدى إلى اختزال تفاعل الجلد إلى 6 ملم.

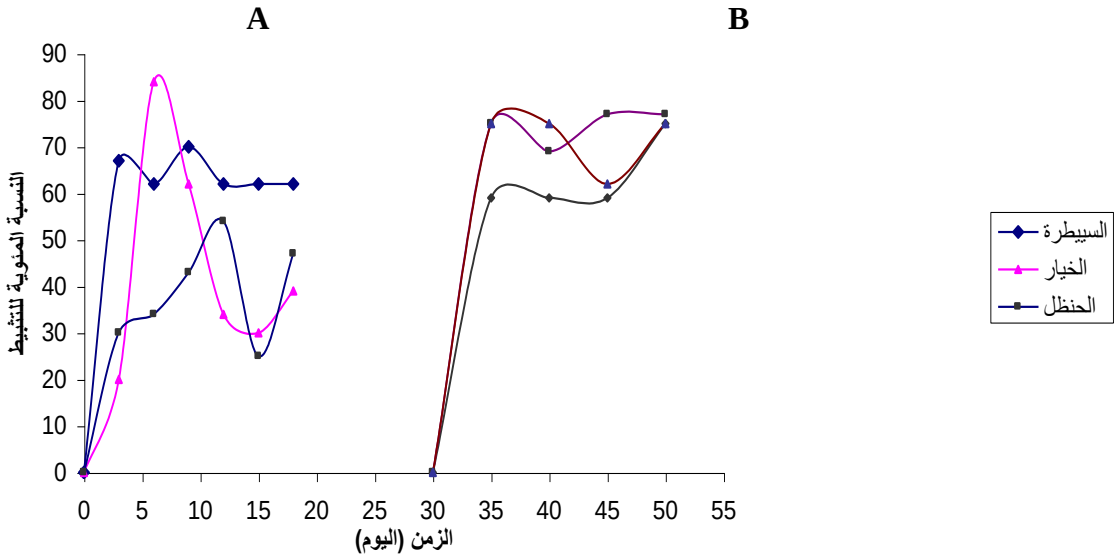


شكلّ(4-5)الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية (A) والاستجابة المناعية الخلوية الثانوية (B) في حيوانات السيطرة (C) والمعاملة بلكتين بذور الخيار (Cs) ثم المعاملة بلكتين بذور الحنظل (Cc) بدلالة معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض

ان وجود هذه اللكتينات قد ادى الى زيادة في انتاج المواد المثبطة لهجرة الخلايا البيض مما قلل من معامل تثبيط هجرة الخلايا فكان LIF اكثر معنوية من حيوانات المقارنة.

جدول(4-11) الاستجابة المناعيّة الخلوية الثانوية (تفاعل تثبيط هجرة الخلايا) للكتين الخيار والحنظل في الارنب

المعاملة	معامل تثبيط هجرة الخلايا			
	اليوم (35)	اليوم (40)	اليوم (45)	اليوم (50)
السيطرة PPD وحده	0.41	0.41	0.41	0.25
لكتين الخيار ثم مستضدّ PPD	0.25	0.31	0.23	0.23
لكتين الحنظل ثم مستضدّ PPD	0.25	0.25	0.38	0.25



شكلّ(4-6)الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية (A) الاستجابة المناعيّة الخلوية الثانوية (B) في حيوانات السيطرة (C) والمعاملة بلكتين بذور الخيار (Cs) ثم المعاملة بلكتين بذور الحنظل (Cc) بدلالة نسبة تثبيط هجرة الخلايا البيض

4-3-1-2 التقويم الاحصائي لأثر لكتينات الخيار والحنظل على الاستجابة المناعيّة الخلوية الثانوية:

جرى احتساب معدل معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض عند استخدام التيوبركلّين كمحسس للخلايا البيض بالنسبة لدورة الاستجابة المناعيّة الخلوية الثانوية. وتم احتساب الخطأ المعياريّ لكلّ حالة على حده. بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياريّ لكلّ من الخيار – سيطرة، الحنظل-سيطرة والحنظل –خيار عن طريق استخدام إحصاء t ذي النهايتين فوجد بان قيمة t الجدولية معنوية عند مقارنة الخيار – سيطرة والحنظل- سيطرة وغير معنوية في حالة الحنظل- خيار عند مستوى معنوية P: 0.05 . إذا كانت tالمحسوبة في حالة الخيار – سيطرة 2.57 والحنظل – سيطرة 2.3 وكانت t الجدولية على درجة حرية 10 وبمستوى معنوية P: 0.05 2.228.

جدول (4-12) يبين المعالم والبيانات الاحصائية لأثر لكتينات الخيار والحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلوية الثانوية

المقارنة بين	t المحسوبة	t الجدولية	الفروق	درجة الحرية	مستوى الاحتمال P
الخيار – سيطرة	2.57	2.228	معنوية	10	0.05

الحنظل – سيطرة	2.3	2.228	معنوية	10	0.05
الخيار – حنظل	0.7206	2.228	غير معنوية	10	0.05

جدول(4-13) الاستجابة المناعيّة الخلوية الثانوية (اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة) الى لكتينات بذور الخيار والحنظل

نوع الممنع	قطر تفاعل الجلد (ملم)
السيطرة PPD لوحده	12
الخيار ثم PPD	24
الحنظل ثم PPD	6

هذا وإن تأثير لكتينات بذور نبات الخيار والحنظل على معامل تثبيط هجرة الخلايا يبدو انه يزيد من انتاج الوسائط الكيميأوية المثبطة لهجرة الخلايا. وعلى صعيد تفاعل الجلد فان وجودها يحول تفاعل الجلد المتوسط بفرط الحساسية إلى تفاعل مختزل جداً أو معدوم. ويصح ذلك على تأثير اللكتين في الاستجابة الخلوية. أي إن الإثباط لتفاعل الجلد مرتبط بوجود اللكتين مع الخلايا المقتدرة مناعيّاً للجهاز المناعيّ وبانعدامه من محيط هذه الخلايا تعود الفاعلية المناعيّة لهذه الخلايا.

جدول(4-14) يوضح الأثر المحور للكتين كلّ من الخيار والحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلطية والخلوية وفي طوريهما الأولي والثانوي

الاستجابة الخلطية	أولية		ثانوية	
	مضخم	مثبط	مضخم	مثبط
خيار	NE		+	
حنظل	+		+	
الاستجابة الخلوية	أولية		ثانوية	
	LIF	Skin Test	LIF	Skin Test
خيار	مضخم	مضخم	مضخم	مضخم
حنظل	مضخم	مثبط	مضخم	مثبط

NO EFFECT = NE

Chapter Five الفصل الخامس
Discussion المناقشة

5-1 النبات بوصفه دواء الأمس واليوم والغد:

إن موضوع استخدام الأعشاب والنباتات الطبية لفوائد علاجية ليس موضوعاً مستجداً في عالم اليوم واكتشفه الناس حديثاً بل هو موضوع قديم قدم الانسان وصاحبه على مرّ العصور، وهو على الرغم من ما شهده عالم الطبّ من تطور فلا يزال في الواجهة وازداد حضورهُ بعد أن أوضح العلم الحديث خواصّ النباتات والأعشاب الطبية.

وتعود فوائد الأعشاب والنباتات الطبية لثلاثة أمور:-

1- الوحي فقد نزل بعضها على الأنبياء كما هو الحال عند سيدنا النبي آدم وسيدنا النبي إدريس اللذين تقدما ببعض الوصفات الطبية من النباتات أشار الرسول الكريم محمد (صلى الله عليه وآله وسلم) إلى الأهمية العلاجية للحبة السوداء عندما قال (الحبة السوداء شفاء من كلّ داء إلا السام).
2- التجربة وشرطها النتيجة.
3- القياس أي قياس صفات النبات الجديد وصفاته نسبة إلى نبات ذي فعل علاجيّ معروف.

إن العمل في ميدان الأعشاب والنباتات الطبية يتأتى من ثلاث أمور من دون شك وهي الوحي والتجربة والقياس (تذكرة الأنطاكي الحديثة 2002)، وهنالك الكثير من الفوائد العلاجية للحنظل حيث يسهل البلغم الغليظ من المفاصل والعصب(الأدوية المفردة - ابن سينا تحقيق 1986)،كذلك فان الثمرة ملينة جيدة لعلاج الصفراء والامساك وطاردة للديدان من طفيليات الأمعاء وكذلك تنفع في انقطاع الحيض وتستخدم لعلاج التهابات المعدة والامعاء، خفض سكر الدم في مرضى السكر، علاج أنواع مختلفة من السرطان وعلاج الإصابات الفايروسية (الرأوي وجاكروفارتي 1976).

اما بالنسبة للخيار فتناول بذوره بصفة خاصة يقلل من ورم الكبد والطحال والآم الرئة (تذكرة دأوود 2002) وتنفع بذور الخيار من قروح الرئة وتنفع في علاج اليرقان وللخيار فوائد علاجية أخرى في علاج انتفاخ الأجفان واحتقان الوجه (قدامه 1981 ,).

وقد أثبت حديثاً جماعة العلاج بالطبّ المثليّ Homoeopathy بان هناك بعض النباتات والأعشاب الطبية ذات آثار مختلفة في الجهاز المناعيّ ووظائفه الخلطية والخلوية كما في Arnica و Acontlum وكذلك العراهين (Wang, 1997; Dsouza- Francisco 2003) وموضوع هذه الدراسة هو أثر بعض لكتينات بذور الخيار والحنظل على الجهاز المناعيّ للأرانب .

5-2 اللكتينات النباتية بوصفها محوراً مناعيّاً اختبارياً:

تم تتبع إشارات علمية واضحة تدل على إمكانية استخدام اللكتينات النباتية بوصفها عوامل محورة للمناعة (Wang *et al.*, 1998; Wang, 1997; Shnawa *et al.*, 2004).

وجماعته (2003) من دراسة التأثير الحياتي المحور Patrickإذ تمكن كلّ من ، حيث وجدوا أن لكتين النبات المنقى يمتلك تأثيرين أحدهما Mistletoeللكتين نبات سام للخلايا اللمفأوية، خلايا البلاعم الكبيرة والخلايا القاتلة الطبيعية. والأخر ذات تأثير محفز لتلك الخلايا من خلال تحفيز إفراز عدد من السايتوكينات مثل عامل تنخر الورم والانترليوكين1.

تمكن Shnawa واخرون(2004) من الوصف الجزئيّ لكلّ من لكتينات الرز والبطيخ والدخن. وذكروا أن هذه اللكتينات تعمل محورات مناعيّة والتحوير المناعيّ لها من النوع المعتمد على الجرعة حيث وجد أن التراكيز الواطئة لها أثر محفز للمناعة الخلطية المتخصصة بمستضد أح البيض وتصبح مثبطة لهذه المناعة بالتراكيز العالية.

ذكر الباحثون Ko واخرون (1995) ان الفعالية المحورة للمناعة للكتين الفطر Flammulina velutipes تكون بوساطة خلايا الدم المحيطي اللمفأوية للانسان وكذلك العمل على زيادة إنتاج الانترليوكين 2 والانترفيرونγ.

كما تمكن كلّ من Lin ∞Chou,1984; Kawagishi *et al.*, 1990Wang *et al.*, 1995, 1996a) من عزل لكتين فطر *Agaricus bisporus* وتنقيته، حيث ذكروا أن هذا اللكتين يمتلك فعالية محورة للمناعة ويعدّ عاملاً مضاداً للسرطان.

وجد أن اللكتين المعزول من الفطر *Boletus* Satanas محور للمناعة وذلك من خلال تحفيز انتاج الانترليوكين 1 والانترليوكين 2 وعامل تنخر الورم (TNFα) بوساطة الخلايا وحيدة النواة (Ennamany *et al.*, 1994; Licastro *et al.*, 1993). بناءاً على ما ورد أعلاه جرى فصل لكتينات بذور الخيار والحنظل والتعرف عليها جزئياً.

5-2-1 الوصف الجزيئيّ للكتينات

Partial Characterization of Lectins

5-2-1-1 تقدير كمية البروتين الكلّي في المستخلصات النباتية

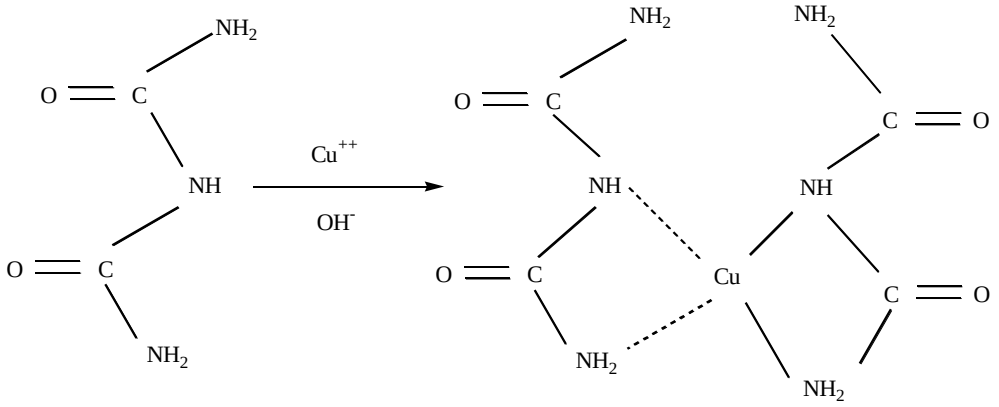
جرى تقدير كمية البروتين في المستخلصات النباتية المستعملة بوساطة طريقة القياس اللوني طريقة بايوريت Biuret Method، حيث إن تفاعل بايوريت يعد من التفاعلات المتخصصة للمركبات الحأوية على أكثر من ثلاث أواصر ببتيدية كالمركبات البروتينية، حيث تتفاعل مجموعة الأمين (NH_2) للاحماض الأمينية الموجودة في السلاسل المتعددة الببتيدية لجزيئة البروتين مع أيونات النحاس ثنائية

التكافؤ Cu^{++} في كبريتات النحاسيك القاعدية الموجودة في تركيبة البايوريت مكونة معقداً ارجوا نيا بين ذرة النحاس واربع ذرات نتروجينية وتزداد شدة اللون كلّما زاد عدد الأواصر الببتيدية الموجودة في المستخلص المراد حساب تركيز البروتينات الموجودة فيه ومن ثم فان الكثافة الضوئية تتفق مع قانون (بير ولامبرت) والذي ينصّ على انه يمتص مـن الضوء المار فـي محلول بقدر تركيز الجزيئات المذابة فـي ذلك المحلول (Baron and Finegold, 1982; Bishop *et al.*, 1985).

هذا وقد استخدمت هـذه الطريقة لغرض قياس تركيز البروتين الكليّ للمستخلصات النباتية لتوفر موادها الأولية وبساطتها وعدم الحاجة فيها إلـى أجهزة قياس معقدة وهذا وقـد أظهرت المستخلصات النباتية قيد البحث قراءات مختلفـة تدل علـى وجـود بروتين بتراكيـز مختلفـة بضمنه البروتين السكري (Lectin) وقد استخدمت طريقة البايوريت في العديد من البحوث منها (Ray and Chattergee, 1995; Suseelan and Mitra, 2001; Shnawa, 2001)
هناك طرائق أخرى لتقدير البروتين منها طريقة لوري التي استعملت من قبل باحثون منهم (Suseelan *et al.*,1997a ; Suseelan *et al.*, 1997 b).

ولابد من الإشارة إلى أن طريقة بايوريت تستجيب لجميع المركبات التي تحتوي على مجموعة كاربونيل مرتبطة بذرة N أو C ويجب التقيد بكمية البايوريت المضافة لان الزيادة منه تؤدي إلى تكوين مركب ذو لون ازرق هو هايدروكسيد النحاسيك بدل من المعقد ذو اللون الأرجواني ويتم تفاعل بايوريت وفق المعادلة الآتية: (Stryer , 2000)

هذا وان تركيز البروتين الكلّي في مستخلص لكتين الخيار قد بلغ 17.40 ملغم/ مل في حين ان تركيز البروتين الكلّي لمستخلص لكتين الحنظل كان مسأوياً



سلسلة ببتيدية **معقد بايوريت الارجواني**

إلى 11.15ملغم/مل وبهذا فقد استفيد من تفاعل البايوريت بالتعرف على صفة المحلول المفصول كونه بروتيناً أولاً وثانياً جرى بوساطته تقدير تركيز ذلك البروتين.

2-1-2-5 تلازن كريات الدم الحمر للخراف بوساطة اللكتين:

عندما يكون المستضدّ في المحلول على شكلّ جسيمات (غير ذائبة) فان تفاعل هذا المستضدّ مع الضد النوعي يطلق عليه بالتلازن وقد يكون المستضدّ بشكلّ عالق من الجراثيم أو عالق من كريات الدم الحمراء)الزبيدي(1984).

درست قدرة اللكتينات على تلزين كريات الدم الحمر في العديد من البحوث ومنها بحث ,Shnawa وجماعته (2004) الذين درسوا اللكتينات في نباتات البطيخ Cucumis melo والدخن Panicum meliaceum ولقد لزنت بذور البطيخ كريات دم البشر من نوع A وB وO وظهر بان محلول لكتين الدخن ملزن لكريات الدم الحمر من نوع B و O.

وكذلك درس Shnawa(2001) اللكتينات في نباتات اللوبيا *Dolichos biflorus* ،والباقلاء *Vicia faba*، الفاصوليا *Phaseolus Laurantus* ، والماش *Phaseolus aureus*، والحمص *Cicer orientum* ، حيث اخذت معلقات من كريات الدم الحمراء بنسب تترأوح ما بين 2.5 %و 50%، إذ وجد ان احسن تخفيف هو 2.5 % أخذت درجات حرارة مختلفة ْ4م، و ْ25م، و ْ37م وكانت درجة الحرارة المثلى هي 37%، جربت مدد حضن متنوعة 10، و25، و35، و45 دقيقة كانت فترة الحضن الافضل هي 45 دقيقة وأيضا استعملت محاليل ملحية فسلجية مختلفة بتراكيز 0.5%، و 0.6%، و0.85% كان التركيز الأمثل هو 0.85%.

درس الباحثان Ray and Chatter Jee (1995) لكتين بذور نبات السراكة الهندية Saraca indica النقي ولوحظت قابلية تلزينه لكريات الدم الحمر للانسان، والدجاج، والماعز، والبط، والجرذ والأرنب. حيث لزن هذا اللكتين فصائل دم البشر Aو Bو Oو AB بصورة متسأوية تقريباً مما يدل على هذا اللكتين ذو تخصص واسع لاكثر من مجموعة دم واحدة، لزن هذا اللكتين أيضا كريات الدم الحمر للدجاج والماعز و البط والأرانب، وبشكلّ ضعيف لكريات الدم الحمر للجرذ.
ودرس Suseelanوجماعته (a 1997) نوعين من اللكتين في بذور نوع من اللوبيا Vigna radiata، حيث استعملوا كريات الدم الحمر للارانب اذ سجل اللكتين الأول ما يسأوي 198 وحدة تلازنية لكلّ مايكروغرام لكتين في حين سجل اللكتين الثاني 88 وحدة تلازنية بالمايكروغرام لكتين.

تلازن اللكتين مع المستضدّات السطحية لكريات الدم الحمر يعني أن اللكتين قد يتفاعل مع السكريات الجانبية على سطح كريات الدم الحمر فمثلاً تلازن اللكتين مع مستضد زمرة الدمO يعني أن اللكتين قد تفاعل مع السكر السطحي الجانبي على سطح كرية الدم الحمر وهو (L-Fucose) وفي حالة التفاعل مع مستضد زمرة الدم A فان اللكتين سيتحد مع سلسلة السكر الجانبية وهــي نوع N- Acetyl- D- galactosamine، اما عند التفاعل مع مستضدّ زمرة الدم B فانه يدل على تفاعل اللكتين مع سلسلة السكر الجانبية D-galactose. عند حصول تفاعل مع اكثر من

مستضدّ سطحيّ على الكريات الحمر فانه ربما يعني وجود لكتين متعدد التخصص أو نوعين لكتين، وان زيادة عيــار التلازن الدموي اللكتيني يعني وجــود تركيز أعلى للكتين فــي النوع النباتـــي المحدد (Sheeler and Bianchi, 1983).

هناك عدد من العوامل تؤثر على التلازن الدموي منها: طريقة فصل اللكتين، نوع اللكتين المستعمل، نوع كريات الدم الحمر، نسب المواد المتفاعلة وظروف التفاعل المختلفة(Sharon , 1993) .

أما الباحثان Suseelan وMitra (2001) اللذان فصلا لكتين نبات رجل الأوز Chenopodiums amaranticola بشكلّ نقي ولاحظا ان هذا النوع من اللكتين قد لزن كريات الدم الحمر للأرنب ولم يلاحظ أي نشاط تلازني لخلايا الدم الحمر للإنسان بفصائلها المختلفة مما يدل على هذا اللكتين غير متخصص بمجموعة دموية.

لاختبار التلازن الدموي متطلبات عديدة منها: وجود خلايا ثابته أو محلول دقائقي، وجود واحد أو اكثر من المستضدّات بالقرب من السطح، توفر الاملاح الزبيدي , (1994)

وخلاصة القول ان جزيئات الكتين بتلازنها مع كريات الدم الحمر تبدي تشابهاً كبيراً مع الكلّوبيولينات المناعيّة (Immuuoglobulins) وعلى العموم فان جزيئات اللكتين تكون ذات خصوصية واسعة نسبة إلى خصوصية الكلّوبيولينات المناعيّة (Sharon, 1993).

3-1-2-5 تحديد نوع السكر المرتبط بالبروتين:

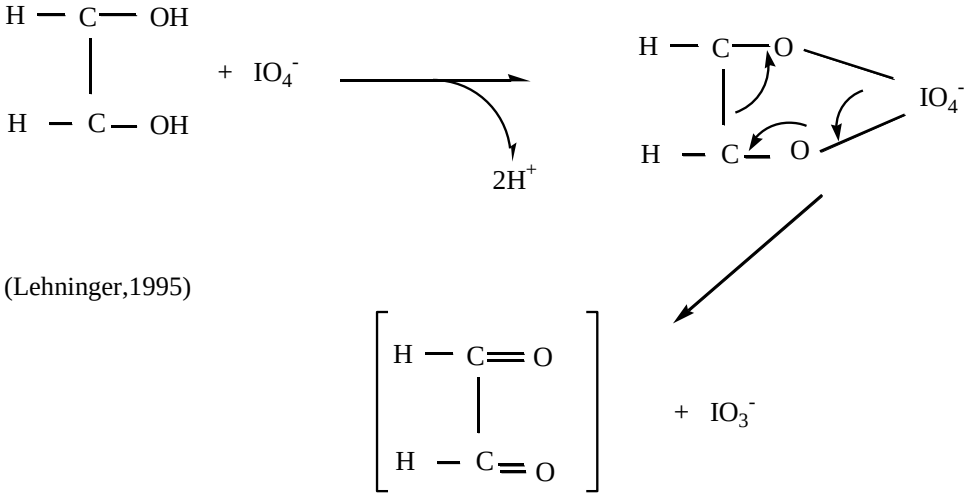
جرى تحديد السكر في المستخلصات النباتية المستعملة بوساطة طريقة الاستقطاب Polarization حيث ان هذه الطريقة تستخدم لقياس حجم واتجاه مستوى الضوء للجزيئات غير المتناظرة في المحاليل مثل السكريات عندما يكون مستوى استقطاب الضوء قد مر خلال المحلول الحأوي على المركبات فان درجة مستوى الضوء تكون قد دورت باتجاه مناسب مع عدد الجزيئات غير المناظرة للمركب خلال مرور الضوء ويعتمد الدوران على العديد من العوامل منها طبيعة المركب غير المتناظر، وتركيز المركب في المحلول وطول الضوء المار خلال المحلول. ان الدوران الملاحظ يختلف باختلاف الطول الموجي للضوء المار خلال مستوى الاستقطاب ودرجة الحرارة وان زأوية الدوران النوعي تحسب بوساطة المعادلة الآتية:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha x 100}{L x C} \qquad .....(A)$$

وتتواجد السكريات المختزلة على شكلّ حلقة Hemiacetal والتبلور للسكر يؤدي إلى انتاج شكلّ واحد من الهمي استايلα أوβ D-gluco pyranose. . السكر حسب المفهوم الكيميأوي هو جزيئة الديهايدية أو كيتونية متعددة الهايدروكسيل واصغر سكر الديهايدي هو كلّيسرالديهايد في حين اصغر جزيئة سكر كيتونية هو

داي هايدروكسي اسيتون، وتتواجد السكريات بعدة أشكال منها السكريات الحرة كالسكريات الاحادية مثل الكلّوكوز والسكريات الثنائية والسكريات المتعددة الهايدروكسيل كالنشأ والكلايكوجين وهناك السكريات المركبة مثل السكريات المرتبطة بالبروتين (glycoproteins) والسكريات المرتبطة بالدهون glycolipids (Clark & Switzer, 1977).

إن افضل الطرائق المستعملة للكشف عن السكريات المرتبطة بالبروتين تتضمن استخدام محلول البريودات بسبب الانتقائية العالية جداً لهذا المحلول تجاه بعض المركبات (السكريات والهايدروكسيدات والكاربونيلات والامينات الأولية) وتكون النواتج لتفاعل هذا المحلول مع هذه المركبات محددة بسبب تضمنها لميكانيكية تفاعل شبيه الحلقة ring Like Intermediate كما في المعادلة الآتية:



(Lehninger,1995)

مركبات لها ألوان محددة

كما يمكن استخدام طرائق دقيقة جداً لتشخيص المركبات السكرية المرتبطة بالبروتين تتضمن استخدام التنقية بإحدى طرائق الكروموتوغرافيا وعزل الناتج وتجفيفه، ثم اجراء قياسات لدرجتي الانصهار والغليان ومقارنة النتيجة بالقيم المتوفرة لدرجات الانصهار والغليان للمركبات الحياتية. أو إجراء قياسات الترحيل الكهربائيّElectrophoresis لتحديد الوزن الجزيئيّ بوجود مركبات ذات أوزان جزيئيّة معلومة (Stryer, 2000).

في هذه الدراسة تم تحديد قيمة(α) بوساطة جهاز قياس الاستقطاب Polarimetry ومن خلالها تم الاستدلال على ان السكر هو كلّوكوز ونوع الارتباط بالبروتين هو من نوع (α) باستخدام المعادلة (A) ثم تحديد تركيز السكر المرتبط بالبروتين.

3-5 مشتق البروتين المنقى (التيوبركلّين):

خلاصة بروتينية الطبيعة مستحصلة من بكتريا *M. tuberculosis* وتسمى بالتيوبركلّين وهو مركز الراشح للجراثيم الصامدة للحمض التي نمت لمدة أسابيع وحأوية على بروتينات عصيات التدرن. الدراسة الكيميائية الحيوية لتركيب التيوبركلّين الكيميائي أظهرت انه مكون من سبعة أجزاء ومن بين هذه الأجزاء السبعة وجد جزء مستحصل بالمعاملة بالتربسين تتحفز فيه الفعالية المناعيّة للتيوبركلّين وان تتابع الاحماض الأمينية في هذا الجزيء البيتيدي مؤلف من التتابع التالي للاحماض الأمينية وهي Asn- Gly-Ser-Gln-Met-Arg (Kwcwabra. 1975).

يتصف مشتق البروتين من *M. tuberculosis* بأنه مستضدّ عالي القدرة التمنيعية وعالي القدرة المستضدّية وينبه الخلايا التائية المساعدة Th_2 لانتاج أضدادّ متخصصة ذات صفة وقائية واطئة أو معدومة وربما يكون له دور مثبط أو منظم للاستجابة المناعيّة الخلطية)الزبيدي ,(1984) 1984, Stites *et al.*, 1994; Parslow *et al.*, 2001, Roitt *et al.*, 2000; Hyde, 2000) وينبه كذلك استجابة الخلايا اللمفية التائية المساعدة Th_1 أي نسائل Tdth و Ts التي تشارك في المظاهر المناعيّة الخلوية للتدرن ولاختبار الجلد، ويعد اختبار الجلد المتوسطة بفرط الحساسية المتاخرة أحد سبل قياس نشاط المناعة الخلوية في الفقريات بضمنها الإنسان كما يعد فرط الحساسية المتأخرة (DTH) أحد أنماط فرط الحساسية متوسطة بالخلايا التائية ويمكن الكشف عنها من خلال التفاعلات الجلدية البطيئة التي تم من خلالها تقدير الاستجابة المناعيّة الخلوية لمعرفة الحساسية الجلدية لمستضدّ معين، أو مجموعة من المستضدّات وهو ذو أهمية كبيرة في تقدير الكفاءة المناعيّة وكذلك المسوحات الوبائية (Stites *et al.*, 2001). حيث عند حقن خنزير غنيا بالتيوبركلّين أو المشتق البروتيني المنقى (PPD) في أدمة الجلد ينتج عن ذلك ظهور تفاعل جلدي (احمرار) في منطقة الحقن بعد مرور 8-10 ساعات من حقن ذلك الارجين وهذا التفاعل يتمثل بارتشاح خلوي للخلايا اللمفاوية والخلايا البلعمية الكبيرة وعدد من كريات الدم البيض المحببة في موقع الالتهاب ويتم ذلك عن طريق توسع الأوعية الدموية الموضعية (Clark, 1983) ويصل ذلك الارتشاح إلى قمته بعد مرور 24-48 ساعة أو 72 ساعة من مدة الحقن حيث تتميز منطقة التفاعل باحمرار (Redness) وتثخن (Thickness) وتنخر (Necrosis) (Weir, 1992; Roitt and Rabson2000).

4-5 الجهاز المناعيّ الاختباريّ:

صار التفكير العلمـــي العمـــلي صوب خيار الجهاز المناعيّ للارنب بأنه جهاز مناعيّ إختباريّ في هذه الدراسة وذلك لجملة من المبررات منها:-

1- كونه حيواناً لبوناً يضاهي في الاستجابة الحيوية ما قد يحدث في الجهاز المناعيّ البشريّ.
2- سهولة إدارته وإدامته في جوّ المختبر.
3- سهولة التعامل معه من ناحية الحقن، السحب والملاحظة العلمية.

(Al-Gebori, 2003)

5-5 أثر لكتين بذور نباتيْ الاختبار في الاستجابة المناعيّة الخلطية للأرانب

5-5-1 أثر لكتين بذور الخيار في الاستجابة المناعيّة الخلطية

جرى التحري عن الأثر المحور للكتين بذور نبات الخيار في الاستجابة المناعيّة الخلطية وذلك من خلال الكشف عن التغير الحاصل في الاستجابة المناعيّة الخلطية الأولية والثانوية من خلال الارتفاع والانخفاض الحاصل في عيارات الضد الموجود في المصل المستحصل من الأرانب التي استخدمت في الدراسة وتم تحديد عيار الضد المتخصص بمستضّد مشتق البروتين المنقى بوساطة إجراء اختيار التلازن الدموي المنفعل Passive haemagglutination ومن نتائج الدراسة وجد بان هذا اللكتين يحفز الاستجابة المناعيّة الخلطية الثانوية وليس له تأثير واضح في الاستجابة الأولية. هذه النتيجة يمكن تفسيرها بأن اللكتين قد أدى إلى زيادة في خلايا الذاكرة المناعيّة البائية أو زاد في وظيفتها بإنتاج الضد (Thomas et al ,1998 ,Zubler ,2000.,وعدم تاثيره في الاستجابة الأولية ربما يعود إلى انه ليس ذا تأثير واضح علـــى الخلايا Th_2 أو Th_0 من حيث دوره منشطاً لآليات التعـــرف المستضدّي والتقديـــــم المستضدّي (Parslow, 2001; Roitt *et al.*, 2001).

5-5-2 أثر لكتين الحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلطية

بعد إعطاء المستخلص النباتي للكتين بذور الحنظل لحيوانات المعاملة بتركيز 5 ملغم/ مل التي جرعت بمستضدّ مشتق البروتين المنقى (PPD) جرى اخذ عينات دم واستحصلت الامصال وبعدها تم الكشف عن التغير الحاصل في الاستجابة المناعيّة الخلطية الأولية والثانوية من خلال الارتفاع والانخفاض الحاصل في عيارات الضد المتخصص بالتيوبركلّين واظهرت نتائج الدراسة بان هناك ارتفاعاً في عيارات الضد المتخصص بمستضد مشتق البروتين المنقى بوجود لكتين الحنظل. أي ان لكتينات بذور الحنظل كانت محفزة للاستجابة المناعيّة الخلطية الأولية والثانوية. وهذا يمكن تفسيره بأن هذه اللكتينات لها أثر منشط للخلايا التائية المساعدة Th_2 في الأولية ولها دور ربما يكون محفزً لإنتاج الخلايا البائية الذاكرة أو محفزاً لنشاط هذه الخلايا في الاستجابة الثانويةZubler, 1998

جاءت هذه الدراسة موافقة مع دراسة الباحثين (Wang *et al.*, 1998) الذين عزلوا ودرسوا اللكتينات من بعض العراهين وذكروا أن هذه اللكتينات يمكن ان تكون معدلة للجهاز المناعيّ ومضادة للسرطان ولها فعاليات سمية وشملت العراهين كلاً من:

Laetiporus sulphureus, Lactarius deterrimus, Ischoderma esinosum, Hericium erinaceum.

حيث يمكن أن تكون لكتينات هذه العراهين مشطرة للخلايا منبهةً ومحفزةً للجهاز المناعيّ، ومضادة لتكاثر الخلايا، ومضادة للخلايا السرطانية، وموسعة للأوعية الدموية أو خافضة للضغط.

5-6 أثر لكتينات بذور نباتي الاختبار في الاستجابة المناعيّة الخلوية

5-6-1 أثر لكتين الخيار في الاستجابة المناعيّة الخلوية للارنب

تم دراسة الأثر المحور للكتين الخيار في الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية بوساطة عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض (LIF) وكذلك اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة.

ويلاحظ من جدول (4-7) وشكلّ (4-5) ان أثر لكتين الخيار في عامل تثبيط الهجرة الخلوية كان محفزاً لذلك العامل في الاستجابة الأولية إذ إنه قد أدى إلى زيادة في تثبيط هجرة الخلايا أي بمعنى أنه ربما يزيد إنتاج السايتوكاينات التي تعمل كمثبطاً لهجرة الخلايا البيض. وعند إعطاء جرعة إضافية ثانية منه قد أدى إلى تحول تفاعل تثبيط هجرة الخلايا إلى الناحية غير المعنويّة أي أنه قد ثبط من إنتاج السايتوكاينات (Milssa *et al.*, 1988).

اظهر التحليل الاحصائي بوساطة اختبار t ذي النهايتين أن الأثر المحفز للخيار غير المعنويّ علـى معامل تثبيط الهجرة الخلوية عند مستوى معنويّة ($P> 0.05$).

أما الأثر المحور للكتين الخيار في الاستجابة المناعيّة الخلوية الثانوية فقد كان ذا أثر محفز لعامل الهجرة الخلوية عند مستوى معنويّ ($P< 0.05$) ويعود السبب في هذا التأثير المعنويّ إلى أنه يؤدي إلى زيادة في تثبيط هجرة الخلايا أي يزيد مـن إنتاج السايتوكاينات المثبطة لهجـرة الخلايـا البيض (Parslow *et al.*, 2001; Playfair and Chain, 2001).

أما بخصوص تفاعل الجلد فان الأثر المحور للكتين الخيار كان أثراً محفزاً لتفاعل الجلد في الاستجابة المناعيّة الأولية والثانوية ولكن في الأولية وجد عند إعطاء جرعة منه يؤدي إلى خفض تفاعل الجلد أي إنه يعتمد على توقيت إعطاء

اللكتين والفترة الزمنية بعد إعطاء ذلك اللكتين. جدول (4-9) وشكل (4-3) وجدول(4-13).

5-6-2 أثر لكتين الحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلوية:

تم دراسة الأثر المحور للكتين الحنظل في الاستجابة المناعيّة الخلوية الأولية بوساطة عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض (LIF) واختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتأخرة ويلاحظ من جدول (4-7) وشكلّ(4-5) أن الأثر المحور للكتين الحنظل كان محفزاً لإنتاج عامل تثبيط هجرة الخلايا في الاستجابة الخلوية الأولية إذ أنه أدى إلى زيادة في تثبيط هجرة الخلايا البيض وبشكلّ معنويّ أما عند حقن هذا اللكتين ثانيةً في وقت محدد ولفترة محددة بعد الحقن كان مثبطاً أي أنه حول معامل تثبيط هجرة الخلايا إلى الناحية غير المعنويّة ولكن كان محفزاً لمعامل تثبيط هجرة الخلايا في الاستجابة الخلوية الثانية أي أنه قد أدى إلى زيادة في السايتوكاينات المسؤولة عن تثبيط هجرة الخلايا وهذا يعني أنه قد أثر في الخلايا التائية الذاكرة.

وبالنسبة لتفاعل الجلد المتأخر فقد كان مثبطاً للتفاعل في الاستجابة المناعيّة الأولية طالما هو بتماس مع الخلايا المناعيّة. مما يعني أنه ثبط عمل الخلايا Tdth والخلايا Th_2 الذاكرة وكان ذا تأثير مثبط أيضاً للاستجابة المناعيّة الثانوية.

وعند مقارنة فرط الحساسية لتفاعل الجلد وتفاعل تثبيط هجرة الخلايا في الاستجابة الأولية نجد أن هناك تثبـيطاً للجلد وتحفيـزاً لهجرة الخلايا مما يعني انعـزال المناعة الخلوية عن تفاعل فـرط الحساسية المتأخـرة. (Playfair and Chain, 2001; Shnawa *et al.*, 1999).

جاءت هذه الدراسة موافقة مع دراسة قام بها الباحث Clark (1983) حيث ذكر أن تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة يمكن ان تنتج في خنزير غينيا المحسس عن طريق حقن التيوبركلّين وقد يؤدي ذلك إلى حدوث صدمة Shock بعد مرور 5-8 ساعات من حقن المستضدّ ولكن التفاعل يصل إلى قمته بعد مرور 24 ساعة ويمكن ان يكون مميتاً علماً ان اساس التفاعلات الجهازية يتم بوساطة تفاعل شوارتزمان أو الانافلاكسس(Anaphylaxis).

هناك جملة من العوامل التي تؤثر في تفاعل فرط الحساسية المتأخرة عند التحفيز بمستضد التيوبركلّين وهي جرعة الارجين المستخدم ونوعيته وسبل الحقن وصفات الفرد، ودرجة تحسس المستلم والعوامل الموضعية والادوية والمواد الكيميأوية ونقص الخلايا المسؤولة عن هذا التفاعل ووجود الهرمونات المحفزة لقشرة الكظر (ACTH) (Rajka and Korossy, 1976).

المصادر العربية

الزبيدي، طارق صالح.(1984).علم المناعة والمصول. مطبعة دار السلام، بغداد.

السعد، مها رؤوف وطارق الزبيدي.(1991). علم المناعة. ص 128-130، الطبعة الثانية.

قدامه، احمد .(1981). قاموس الغذاء والتداوي بالنبات، دار الثقافة- بيروت.

الراوي، علي وجاكروفارتي ج-ل.(1976). النباتات الطبية في العراق. الطبعة الثانية، مطبعة اليقظة بغداد.

الانطاكي، داوود.(2002). التداوي بالأعشاب والنباتات الطبية. طبعة حديثة من منشورات دار التيار الجديد – بيروت.

الاعسم، مهند عبد الأمير. (1986). تحقيق كتاب الأدوية المفردة في كتاب القانون في الطب لابن سينا. دار الشوؤن الثقافية العامة. بغداد.

7-5 الاستنتاجات Conclusions

1. باستخدام الجهاز المناعي للأرنب أمكن إيضاح أنّ كلاً من لكتين بذور الخيار والحنظل محفز لإنتاج الضد بالاستجابة الثانوية مما يفسر أثرها المنشط للخلايا البائية الذاكرة أو الخلايا المنتجة للضد وان لكتين بذور الحنظل محفز في الاستجابة الخلطية الأولية مما قد يفسر بأثره التنشيطي للخلايا التائية المساعدة Th2 أو الخلايا البائية المنتجة للضد .
2. كان لكتين بذور الخيار والحنظل محفزا لعامل تثبيط هجرة الخلايا في الاستجابة الخلوية الأولية والثانوية ولكن قد تتحول هذه اللكتينات إلى فعل مثبط في تكرار الجرعة أو يتحول إلى تثبيط غير معنوي لهجرة الخلايا أي يثبط إنتاج السايتوكينات المثبطة لهجرة الخلايا . وقد أدى لكتين بذور الحنظل إلى تحفيز الاستجابة بزيادة في تثبيط هجرة الخلايا.
3. وجد أن لكتين بذور الخيار محفز لتفاعل الجلد بفرط الحساسية في الاستجابة الأولية والثانوية في حين كان لكتين بذور الحنظل مثبطا لاستجابة الجلد الأولية والثانوية .
4. ظهر أن هناك انعزالاً بين تثبيط هجرة الخلايا واختبار الجلد في حالة الحنظل مما يوحي بالتأثير في الخلايا التائية المساعدة Th1 دون التأثير في الخلايا القاتلة Tc في هذه الحالة.

8-5 التوصيات Recommendations

محاولة الحصول على محلول لكتينيّ ذي نقاوة عالية باستخدام طرائق التنقية الحديثة والكشف عن امكانية عمله كعامل مضاد للسرطان.

References

Al- Gebori, S. A. K. (2003). Adrug induced experimental lapin immunomodulation. M. SC. Thesis, Babylon University, Babylon.

Anderson, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aqriculture,p:281-307 .

Arason, G. J. (1996). Lectins as defence molecules in verte brates and invertebrates. fish and shell fish Immunol. 6: 277-289.

Baron, E. J. and Finegold ,S. M., (1982). Baily and scott's diagnostic microbiology. 8th ed, Mosby- Year book, Inc, London p: 249-257 .

Barondes, S. (1988). Bifunctional properties of lections: lectins redefined- Trends Biochem. Sci. 13: 480-483.

Beck, D. P., Materon, L. A. and Afandi, F. (1993). Practical rhizobium legume technology manual. International Center For Agricultral Research in the Dry Areas, Syria, pp:130-137

Beeley, J. G. (1985). Lectin techihnques. In: laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. 16: 301-364. Academic Press, New York.

Bishop, M. C.; Dben-Von Laufer, J. L.; Fody E. P. and Thirty three contributors.(1985). Clinical chemistry principles, procedures and correlations. The Murray Printing company, Philadelphia p:181-182 .

Blecka, F. and Charely, B. (1990). Immunomodulation in domestic food animals. Adv. Vet. Sci. 35: 103-119, Academic Press, Inc.

Blecka, F. B. and Baker, P. E., (1986). Effect of cortisol *invitro* and *invivo* on production of bovine interleukin-2, Am. J. Vet. Res. 47: 841-845.

Borel, J. F., C., Feurer and C. Magnee, (1977). Immunology 32: 1017.

Boyer, R. F. (1986). Modern experimental biochemistry. PP: 46-276, Addison- wesley- Publishing Company, Massachusetts.

Bellanti, J. A. (1985). Immunology III.Acadamic press of W.B. Saunders company. USA.

Brandtzaeg, P. and I. N. Farstad.(1999). The human mucosal B-cell system, mucosal immunology. P. L. Ogra; W. Strober; J. Mastecky; J. R. Mc Ghee; M. E. Lamm and Bienenstock, Academic Press, Sandiego, CA,PP: 439-468.

Burrell, R. (1979). Experimental immunology. 5th ed., PP: 12-80, Burgess Publishing Company. USA.

Carter, J. J., Weinberg, A, D., Pollard, A., REEVES, MAGnuson, J. A. and Magnuson, N. S. (1988).Inhibition of T-lymphocyte mitogenic responses and effects on cell functions by Bovine Herpes virus 1. J. of Virology, 63(4): 1525-1530.

Clark, J. M. and Switzer, R. L. (1977). Experimental biochemistry. 2nd ed., P: 147-148. University of iLionis, Sanfrancisco.

Clark, W. R., (1983). The experimental foundation of immunology, 2nd ed., Academic Press, John Wiley and Sons, USA.

Colosio, C., Corsini, E.; Barcellini, W. and Maroni; M.,(1999). Immunoparameters in biological monitoring of Pesticide exposure Current Knowledge and Prespectives. Toxicol-Lett., 108(2-3)p:285-295 (Midline Abst).

Confer, A. W. and Addinger, H. K., (1981). The invivo effect of levamisole on phytohaemagglutinin stimulation of lymphocytes in normal and marek's disease virus inoculated chickens. Res. Vet. Sci. 30: 243-245.

Cunningham, A., B. Sela, I. Xahara and G. M. Edelman, (1976). Structure and activities of lymphocyte mitogens. In: Mitogens in Immunology. J. J. Openheim and D. L. Rosen streich (eds.), PP: 13-30 Academic press,New york.

Dohms, J. E. and Saif, Y. M, (1984). Causes of immunosuppression, Avian Diseases, 28: 305.

Dawed, K and Al-Yas Z. A(1990). Statistical methods in agricultural researches:(in arabic). Al- Mosul University-Iraq.pp:430-446 .

Dsouza- Francisco. (2003). Homoeo pathy and immunol, H. P. M. thesis British Institute of Homoeo pathy.

Dzhuko, Bl. (1995). Analysis of various mechanisms of action lectin on plasma volume restoration in hemorrhagic shock, Patol. Fiziol. Eksp-Ter. Jan. (1): 29-31.

Ennamany, R., Kretz, O., Badoc, A., Deffieux, G. and Creppy, E. E. (1994). Effect of bolesatine, aglycoprotein from Boletus satanas, on rat thymus inviv Toxico 89: 113-118.

Fargeas, M. T., V. Theodoru; J. More; J. M. Wal; J. Fioramonti and L. Bueno (1995). Boosted systemic immune and local responsiveness after intestinal inflammation in orally Sensitized guinea Pigs,Gastroenterology 109: 53-62.

Franklin, S., T,; Sorenson, C. E. and Hammel, D. C. (1998). Influence of vitamin A supplementation in milk on growth, health, concentration of vitamins in plasma and immune parameters of Calves, J. Dairy. Sci. 81: 2623-2632.

Frei, J., C. Heuck; W. Riesen; I. T. Lang; P. G. Hill; M. N. EL-Nagtch and L. Poller. (1995). Production of basic diagnostic laboratory reagent, WHO, Reginal Publication, Eastern Mediterrahean Series.

Fudenberg, H. H.; Stites, D. P.; Cald Well, J. and Wells, J. V. (1976). Basic and clinical immunology, 2nd ed., Large Medical Publications, Middle East Eddition, Lebanon.

Garvey, J. S., N. E. Cremer and D. H. Sussdorf. (1977). Methods in immunology. (3rd ed.) Pp: 518, 356-359. W. A. Benjamin, Inc. Massachusetts.

GoldsBy, R. A.; KinDT, T., J and Osborne, B. A. (2000). Immunology,4thed., W. H. Freeman and company, New York.

Goldstein, I. J., R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa and N., Sharon. (1980). What Should be Called alectin?, Nature, 285: 66.

Hajto, T. hostanska, K., Freak Rordorf, C. and Gabius, H. (1990). Increased secretion of tumor necrosis factor alpha,

interleukin 1 and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta galactoside- specific lectin from clinically applied mistletoe extract, Cancer Res. 50: 3322-3326.

Donghue, P. N. and Hime, J. M (1979).Handbook of diseases of laboratory animals. William Heinemann Medical Books, Ltd. London.

Hoson, T. and Y. Masuda (1995). Concanavalin A inhibits auxin induced elongation and break down of β- D- glucans in segments of rice coleoptiles, J. Plant Cell physiol. 36(3): 517-523.

Hyde,R. M. (2000). Immunology., 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins Publishing Company, USA.

Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982). Immunochemistry in Practice, Black- Well Scientific Publication, London.

Kaeberle, M. L. and Roth, T. A. (1984). Effects of thia bendazole one dexamethasone induced suppression of lymphocyte and neutrophil function in Cattle, Immuno Pharmacol 8: 129-136.

Kagnoff, M. F. (1994). Intestinal immunity, In: J. A. Stein; J. J. Hutton; P. O. Kholer; R. A. Rourke; H. Y. Reynolds; M. A. Samuels; M. A. Sande; J. S. Trier and N. J. Zvaifler, Internal Medicine, 4th ed., PP: 359- 361. Mosby- Year Book, Inc.

Kantle, N. U.; J. Zivng;M. Hakkinen; C. O. Elson and J. Mestecky (1999). Diffenential homing commitments of antigen- specific T cells after oral or parenteral immunization in humans. J. Immunol., 162: 5173-5177.

Kawagishi, H., Nomura, A., Mizuno, T., Kimura, A. and Chiba, S. (1990). Isolation and characterization of a lection from *Agaricus bisporus* fruiting bodies. Biochmical Biophysica Acta. 1034: 247-252.

Kwapinski, T. B. G. (1972). Methodology of immunochemical and immunological research. Wiley- Interscience, New York.

Kwewabra,s. (1975). Amino acid sequence of tuberculin active protein from *M. tuberculosis* J. Biol. Chem. 250: 2563-2568.

Ko, J. L., HSU, C. I., Lin, R. H. and Lin, J. Y. (1995). Immunomodulatary protein isolated from the edible mushroom Flammulina velutipes. European,J. Biochem. 228: 244-249.

Lazarus, d. D.; Trimble, LA.; Moldawer, LL. (1998). The metabolic effects of pokeweed mitogen in mice, metabolism Jan. 47(1): 75-82.

Lehinger a. L. (1984). Principles of biochemistry. 3rd ed., New York, Worth Publishers.

Licastro, F., Morini, M. C., Kretz, O., Dirheimer, G. Creppy. E. E. and Stirpe, F. (1993). Mitogenic activity and immuno logical properties of bolesatine, a lectin isolated from the mushroom Boletus satanas Lez. Inter. J. Biochem. 25:789-792.

Lin, J. Y. and Chou, T. B., (1984). Isolation and Characterization of alection from edible mushroom, *Agricus bisporus*, J. Biochem. 96: 35-40.

Lindsey,N.j ; Harris, K.R, Norman , H.B ; Smith, j.L and Slapek,M. (1980) .The effect of cyclosporin A on the primary and secondary Immune responses in the Rabbit . Grune and Stratton, Inc.

Mac fadin, J. F. (2000).Biochemical tests for indentification of medical bacteria. 3rd ed., Awolters Company, London.

Mahdi, M. S. (2000). Role of urinary secretory immunoglobulin in pyaria patients. M.Sc. Thesis, Babylon University, Babylon.

Milssa, S., Weisun, H., Blake, P. and Lolis, E. (1998). Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor, EMBO J. 17(13): 3534-3541.

Moutschen, J. (1985). Introduction to genetic toxicology. John Wiley Sons, Chichester.

Muneer. M. A.; Farah, I. O.; Newman, J. A. and Goyal, S. M. (1988). Immunosuppression in animals,(Review), Birt. Vet. J. 144(3): 288-300.

Parslow, I. G.; Stites, D. P. and Terr, A. I. (2001). Basic and clinical immunology. Prentice- Hall International, Inc, London.

Parslow, T. G., Stites, D. P. and Terr, A. I. (1994). Basic and clinical immunology. Prentice- Hall International Inc., London.

Parslow, T. G., Stites, D. P.; Terr A. I. And Imboden, B. (2001). Medicalimmunology, 10th ed., Mc Graw- Hill Comp., Inc, USA.

Patrick, J. M., Germ, J. Wallerstedt, D. B., Monahan, P. B. and Blackman, M. R., (2003). Mistletoe and gemcitabine in patients with advanced cancer: A model for the phase 1 study of botanicals and botanical- Drug interaction in cancer therapy, Interactive cancer therapies, 2(4): 345-352.

Play Fair J HL and Chain BM (2001). Immunology at glanco. 7th ed., Black Well Science , Iran.

Pell, J. M. and Aston, R. (1995). Principles of immunomodulation J. Inf. Cen. 42: 123-133, Elsevier science Inc.

Rajka, E. and S. Korossy. (1976). Immunological aspects of allergy and allergic diseases. 8: 37-47, Plenum Press, Hungary.

Rama and Rao, A. V. S. S. (1987). Text book of biochemistry. 5th ed. PP: 171-177.

Ray, S. and B. P. Chatterjee. (1995). Saracin: alectin from saraca indica seed integument recognizes complex carbohydrates. Phytochem. 40(3): 643-649.

Roitt, I. And Rabason, A. (2000). Really Essential Medical Immunology, Black Well Science Ltd.

Roitt; I.; J. Brostoff and Male. (1998). Immunology, 5th ed., Mosby International Ltd.

Rosenfeld, G. C.; Losse-Mitchell, D. S. and Jones, J. B. (1998). Pharmacology, 3rd ed., Williams and Wilkins Company, Poxticity Press, Inc., USA.

Roth, J. A. and Flaming, K. P. (1990). Model systems to study immunomodulation in domestic food animals, Adv. Vet. Sci. Com. Med. 35: 21-41, Academic Press, Inc.

Roth, J. A. and Frank, D. E. (1989). Recombinant bovine interferon gamma as immunomodulator in dexamethasone treated and nontreated cattle, J. Interferon Res. 9: 143-151.

Roth, J. A.; Jarvinen, J. A.; Frank, D. E. and Fox, D. E. (1989). Alteration of neutrophil function associated with coccidiosis in Cattle: influence of decoquinate and dexamethasone, Am, J. Vet. Res., 50:1250-1253.

Roger, F. (1996). Antibiotics, antimicrobial therapy princilples of use . Medicine International , 24(7).

Rusch ,V. (1982) Report of a meeting on the Immunity of mucose membranes. Scand .j. immunol., 15 (6):531-545 .

Salaman, J. R. and Sampson. D., (1980). Clinical Immunosupprssion, Grune. and Stratton, New York.

Schneider, E.; Volecker, G. F. and Hsude, W. (1999). Age and sex dependence on phospholipid concentration human erythrocyte. I. Z. Med. Lab. Diagh. 31(2): 86-89.

Sheeler, P. and Bianchi D. E. (1983). Cell biology. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc. New York. PP: 343-344.

Semba, R. d., (1999). Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoa infections.(Review). Nutr. Soc. J., 58(3): 719-727.

Sharon, N. (1976). Lectins as mitogens, In: mitogens in immunology. J. J. Oppenheim and D. L. Rosenstrich(eds.), Academic Press, New York PP: 31-41.

Sharon, N. (1993). Lectin –carbohydrate complexes of plants: anatomic view. Trends Bioche. Sci. 18: 221-226.

Shnawa, I. M. S. (2001). Separation and functional characterization of five plant seed lectins, Natl. J. Chem., 4: 595-606.

Shnawa, I. M. S.,al-Shok, M. A. and Al-Amedi, B. (1999). Cellular immunofunction in immunoscenesence. J. Baby. Univ.4:3 .

Shnawa, I. M. S. and Thwaini Q. N. (2000). Lapin mucosal humoral versus systemic humoral and cellular immune

responses post to intratesticular administration of heat killed *C. fetus.* J. Baby. Univ. (In Press).

Shnawa, I. M. S., Al-Zamily, O. M. and Al- Mashta, S. (2004). The Agglutinating and humoral immunomodulating activities of oryza sativa L., cucumis melo L and panicum miliaceum L. dry seed lectins. Med. J. of Babylon. 1(1).

Soberg, M. (1969). Invitro migration inhibition of peripheral blood leucocyte in delayed type hypersensitivity. Acta. Medica. Sccand.

Stass, H. F. and F. A. Ennis. (1999). IL-1 is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadminstered with protein immunogens, J. Immunol. 162: 6141-6147.

Stites D. P.; Terr A. I.; Parslow, J. G. and Imboden J. B. (2001). Basic and clinical immunology; Prentice – Hall International Inc., London.

Stites, D. P.; Stobo, J. D. and Wells, J. V. (1987). Basic and clinical immunology, 6th ed., Appleton and Lange publication, Middle East Edition, California.

Stites, D. P; Terr, A. I. And Parslow, T. G. (1994). Basic and clinical immunology. 8th ed., Prentice- Hall International, Inc., London.

Strober, W. and S. P. James.(1994). The mucosal immune system, In D. P. Stites ; A. I. Terr and T. G. Parslow. Basic and clinical immunology, PP: 541-555. Prentice Hall International Inc, London.

Stryer L., (2000). Biochemistry. 4th ed., New York, W. H. Free man and Company.

Studnicka, M.; Siwicki, A.; A. K., Morand, M.; Rymuzka, A.; Bownik, A. and Terech-Majewska, E. (2000). Modulation of non-Specific defence mechanism and specific immune responses after suppression induced by exnobiotics, J. Appl. Ichthol. 16(1): 1-7.

Sulochana, S., Pillai, R. M. and Nair, G. K. (1984). Immuno modulatiory effect of livamisole on the antibody response to new castle disease virus in chicken, Kerala J. Vet. Sci. 15: 145-149.

Summer, J. B. (1919). The globulins of the jack bean (Canavalia ensiformis), J. Bio-Chem. 37:137.

Suseelan, K. N. and R. Mitra. (2001). Purification and characterization of a lectin ahemagglutinin isolated from the leaves of chenopodium (Chenopodium amaranticolar), Ind. J. Biochem. Biophys. 38: 186-192.

Suseelan, K. N.; Bhatia C. R. and Mita. R. (1997 b). Purification and characterization of two major lectins from *Vigna mungo* (Black gram). J. Biosci. 2(4): 439-455.

Suseelan, K. N.; Bhatia C. R. and Mitra. R. (1997 a). Characteristics of two major lectins form *Mung bean* (Vigna radiata) Seeds, plant food human Nutr., 50: 211-222.

Talib, V. H. (1996). A Hand book of medical laboratory technology. 1st ed., WHO., India.

Tanaka, T., Sugiura, H., Inaba, R., Nishikawa, A. Murakami, A., Koshimizu, K. and Ohigoshi, Hajime. (1999). Immuno modulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymophocytes in female BALB/C mice, carcinogenesis. 20(8): 1471-1476.

Thomas J. K.; Goldsby, R. A. and Osborne. (2000). Immunology, 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York.

Tizard, I. (1997). Immunology, Saunders College Publishing, London.

Tylar.V.A. ; Brady , L . R . and Robbers , J . E. (1988) . Pharmacology.9th ed .,Lea-Febiger publishing company , phildelphia.

Wang, H. X., Liu, W. K., NG, T. B., Ooi, V. E. C. and chang, S. T. (1996 a). The Immunomodulatry and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mangolicum*, Immuno Pharm. 31: 205- 211.

Wang, H. X., Ng, T. B., Liu, W. K., Ooi, V. E. C. and Change, S. T. (1995). Isolation and Characterization of two distinct Lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*, Int. J. Peptide and Protein Res. 46: 508- 513.

Wang, H. X., Ooi, V. E. C., Ng, T. B., Liu, W. K. and Changgs. T. (1997). Action of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum* on macrophages, Splenocytes and Life- Span in Sarcoma- Bearing Mice, Anticancer Research.17: 419- 424..

Wang, H. X., Ooi, V. E. C., Ng, T. B., Liu, W. K. and Changgs T (1998) .lectins from Mushrooms . Mycol. Res.,102(8):897-906.

Weir, D. M. (1992). Immunology, 6th ed., Longman Singapore Publishers, Ltd., Singapore.

Zubler, R. H.(1998). Antigens T dependent and independent. In Delves , R. J. and Roitt (eds). Encyclopedia of immunology.

Summary

This study was aimed to separate plant seeds Lectins of *Cucumber sativus C.s* and *Citrullus colocynthus (Cc)* and study its immunomodulators effect to the immune responses of experimental animal model such as Rabbit.

Lectin had been separated and partially purified by dialysis and removing some unwanted material by saltining out using saturated ammonium sulphate (40 %) , with partial description including Biuret reaction for determination the protein concentrarion.

The concentration of protein of *Cucumber sativus* was recorded as 17.40 mg/ ml while protein concentration of *Citrullus colocynthus* was 11.5 mg /ml. By using the polarization phenomenon was used to determin, it had been determined the sort of sugar that combined with protein, it was appeared that the extracted contain sugar, that are similar in their behavior as in glucose. Through measurement the referaction index and inverted angle for both extractions were (1.335442, 2.744335 for *Cucumber sativus* and 1.335542, 2.744335 for *Citrullus colocynthus*). It had been used direct passive haemagglutination test for sheep erythrocytes were (128 for C.s and 2048 for C.c).

The study had been indicated Immunomodulators effect of Lectins on humoral and cellular immune responses, for Primary and Secondary phases. The immunomodulator included the determination of useful dosage to achieve the immunomodulater.

The Rabbit were treated with two concentrations (10 mg /ml, 5 mg /ml). The (10 mg/ ml) resulted in acute toxic effect and lethal for treated animals and therefore it was excluded from immunization programs. While (5 gm/ml) resulted was encourage result and therefore it had been

included in study the immunomodulator effects for both tested plants, for both cellular and humoral immune responses for primary and secondary phases.

It had been judged on humoral immunomodulator effect by study specific titer to purified Antigen derived. While the judge on cellular immunomodulator occur by leukocytes inhibition factor and skin test intermediate delay hyper sensitivity.

The results was appeared that lectin of *Cucumber sativus* had no significant effect on primary humoral immune responses and had stimulating effect on secondary humoral immune response.

While the *Citrullus colocynthus* (C.c) lectin had stimulating effect on primary and secondary humoral immune response.

The *Cucumber sativus* had stimulatory effect for primary and secondary cellular immune responses for effect both on leukocyte inhibition factor and skin intermidate delay hyper sensitivity. But when second dose was given factor from this lectin this lead effect and down the skin test to converted the inhibition to non significant effect and down the skin test.

The *Citrullus colocynthus* results had stimulatory effect on leukocytes inhibition factor in primary and secondary cellular immune responses. But when was given the second additional dose from this lectin resulted converted the inhibition factor to non significant side.

Lectin of *Citrullus colocynthus* appeared to be inhibiting effect for skin test in response for primary and secondary cellular immune responses.

A study on *Cucumber sativus* and *Citrullus colocynthus* Seeds Lectins As Immunomodulators in the Rabbit

A thesis

Submitted to the Council College of Science
University of Babylon
In Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science
In biology / Microbiology

By

Ali Malik Saad Al- Khafaji

Jan. 2005 Dhu - hijja 1425