تأثير لكتينات بذور بعض النباتات المشطرة للخلايا اللمفاوية التائية في الحي

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

من قبل
لبنى عبد العظيم مجيد موسى

1426 هـ 2005 م

The Invivo T-cell Mitogenicity of Some Plant Seed Lectins

A Thesis

Submitted to the council of Science College University of Babylon in partial Fulfillment of the Requirements for the degree of Master of Science In Biology Microbiology

By

Lubna Abd Al-Addem Majed Mussa

2005

بسم الله الرحمن الرحيم

" وَلِلَّهِ غَيْبُ السَّمَوتِ وَالأِرْضِ وَإِلَيْهِ يُرْجَعُ الأَمْرُ كُلُّهُ

فَأعْبُدْهُ وَتوَكَّلْ عَلَيْهِ وَمَارَبُّكَ بِغَفِلٍ عَمَّا تَعْمَلُونَ "

صدق الله العلي العظيم

سورة هود (الآية 123)

الاهداء

عـائـلتـي وزوجـي... حبـا" واعتـزازا"

استـاذي المشرف... احترامـا" وتقديرا"

المرحوم محمد صالـح... وفـاءا" وعرفانـا"

لبنى

شكر وتقدير

الحمد لله الاول بلا اول كان قبله.. والاخر بلا اخر يكون بعده.. الذي قصرت عن رؤيته ابصار الناظرين.. وعجزت عن نعته اوهام الواصفين.. الحميد يسير الحمد.. الشكور قليل الشكر..

لايسعني وانا اقدم هذه الرسالة الا ان اتقدم بجزيل شكري وتقديري لاستاذي المشرف الاستاذ الدكتور ابراهيم محمد سعيد شناوة لاقتراحه موضوع البحث ولما بذله من اشراف علمي وارشادات قيمة ومتابعة مستمرة خلال مرحلة البحث والكتابة, جزاه الله عني كل الخير... واقدم بعض الوفاء والاعتراف بالفضل للمرحوم محمد صالح مهدي لما قدمه من مساعدة وفضل بطيب نفس رحمه الله واثابه الجنة...

شكري وتقديري الى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لتبنيهم موضوع البحث... واخص بالشكرمنهم الدكتور فارس ناجي عبود معاون عميد الكلية , وفقه الله لما فيه الخير...

وافر الشكر والتقدير الى السيد احمد محمد عباس /مدرس مساعد في كلية طب الاسنان الذي كان نعم الاخ والزميل بمساندته لي في طباعة الرسالة...

ولايفوتني ان اتقدم بالشكر الجزيل الى زملائي وزميلاتي طلبة الدراسات العليا ولاسيما طلبة مختبر الاحياء المجهرية المتقدم...

شكري وتقديري الى الدكتور محمد عبد كاظم/ استاذ مساعد في كلية الطب لمساعدته في توفير بعض المواد الكيمياوية ...

واعبر عن شكري وتقديري الى قسم علوم الكيمياء معيدين وطلبة دراسات وكل من مد يد العون لي في استخدام الاجهزة وتوفير المواد الكيمياوية...

تقديري وامتناني الى عيادة الياسري البيطرية لمساعدتهم في التنسيق مع المفاقس...

لبنى

لا
بد
ی

6

توصية الأستاذ المشرف

نشـهد أن إعـداد هـذه الرسـالة الموسـومة بــ (**تـأثير لكتينـات بـذور بعـض النباتـات المشطره للخلايا اللمفاوية التائية في الحي**) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة/ كلية العلـوم/ جامعـة بابـل، وهـي جـزء مـن متطلبـات نيـل درجـة الماجستـير فـي علـوم الحيـاة (أحيـاء مجهرية/علم المناعة).

التوقيع
المشرف: أ.د. إبراهيم محمد سعيد شناوه
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /2005

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى توصية الأستاذ المشرف أعلاه، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: أ. د. علي شعلان الأعرجي
المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /2005

ز

قرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، بأننا اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة لبنى عبد العظيم مجيد موسى في محتوياتها، وفيما له علاقة بها، ووجدنا أنها جديرة بالقبول بتقدير ( ) لنيل درجة ماجستير في علوم الحياة– أحياء مجهرية / علم المناعة.

رئيس اللجنة

التوقيع:
الاسم: أ.د. خيري عبد الله داوود
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية الطب البيطري/ جامعة القادسية
التاريخ: / /2005

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: أ.م.د. هادي رسول المسعودي
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية التربية/ جامعة كربلاء
التاريخ: / /2005

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: م.د. رباب عمران راضي
المرتبة العلمية: مدرس
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /2005

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع
المشرف: أ.د. إبراهيم محمد سعيد شناوه
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /2005

مصادقة عمادة كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه.

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

الخلاصة Summary

ان مشطرات الخلايا اللمفاوية متعددة وبشكل اساس اللكتينات ومتعدد السكريد الشحمي ، حيث توجد دراسات كثيرة ومثبتة على اللكتينات المشطرة مثل اللكتينات النباتية وبضمنها PHA و LPS ، ولكن في هذه الدراسة تمت عملية فصل اللكتينات من بذور نباتات الاسرة القرعية ووصفها, ودراسة الفعل المشطر لهذه اللكتينات على الخلايا اللمفاوية داخل الجسم الحي *In vivo* .

وقد جرى اختيار نموذج الطيور لافراخ الدجاج وتطويعه لاختبار قابلية اللكتينات التشطيرية على الخلايا اللمفية التائية. ودراسة الاثر المناعي المحور لبعض الادوية, ومشتق البروتين المنقى.

وقد اظهرت الدراسة بان للمحاليل اللكتينية المستخدمة اثرا مشطرا على الخلايا اللمفاوية وبشكل متزايد مع ازدياد التركيز المستخدم, وقد اكد ذلك التحليل الاحصائي ، اما المضاد الحيوي الريفادين ومشتق البروتين المنقى فقد اظهرا قابلية تثبيطية على انقسام الخلايا اللمفاوية المحفزة بالملزن النباتي لخيار الماء, وكان التثبيط المناعي معتمدا على الجرعة المستخدمة.

كانت نتائج الدراسة مشجعة وتظهر امكانية استخدام هذا النموذج لدراسات لاحقة, وتظهر النتائج ايضا بان موديل الاثباط المناعي يمكن الاستفادة منه في التحقق من حصول التحوير المناعي التجريبي في افراخ الدجاج باستخدام مثل هذه الادوية والمواد الكيمياوية مما قد تكون له مضامين تطبيقية علاجية لامراض المناعة الذاتية.

ت	المحتويات	الصفحة
	الخلاصة	ا
	قائمة المحتويات	ب
	قائمة الجداول	ج
	قائمة الأشكال	د
	مساعد الاختصارات	هـ
	مساعد اصطلاحي	
1	الفصل الأول – المقدمة	
1-1	نظرة تعريفية	1
2-1	مبرر الاختيار	1
3-1	أهداف الدراسة	2
2	الفصل الثاني – استعراض المراجع	
1-2	الخلايا المقتدرة مناعيا	3
2-2	الخلايا اللمفاوية التائية	7
3-2	منشطات الخلايا اللمفاوية التائية	14
4-2	تنشيط الخلايا التائية ودورة الخلية في الزجاج والحي	25
5-2	آليات تنشيط الخلايا التائية	27
6-2	المحورات المناعية وتنشيط الخلايا التائية	29
7-2	المضامين التطبيقية لتنشيط الخلايا التائية	30
8-2	نماذج دراسة التحوير المناعي في الحي	33
9-2	نموذج اختبار الجلد بالملزن الدموي النباتي ودراسة تنشيط الخلايا التائية	36
3	الفصل الثالث – المواد وطرائق العمل	
1-3	المحاليل المستعملة	39
2-3	الكواشف المستخدمة	41
3-3	الأصباغ المستعملة	42
4-3	المواد المحورة للمناعة	43
5-3	الأوساط الزرعية المستخدمة	44
6-3	تحضير متعدد السكريد الشحمي من البكتريا السالبة لصبغة كرام	44
7-3	بذور النباتات	48
8-3	فصل المحاليل اللكتينية من بذور النباتات	48
9-3	وصف اللكتينات	51
10-3	الانفاذ	57
11-3	تحديد الجرع	58
12-3	نظام الاختبار	62
13-3	حساب تفاعل الجلد	64
14-3	حساب معامل الانقسام	64
15-3	حساب الارومات اللمفية	65

4	الفصل الرابع – النتائج	
1-4	الوصف الجزيئي للكتينات	67
2-4	اختبار الجلد بالملزن الدموي النباتي (اللكتينات)	72
3-4	استخدام اختبار الجلد بالملزن الدموي النباتي كنموذج لدراسة التحوير المناعي	90
5	الفصل الخامس – المناقشة	
1-5	الوصف الجزيئي للكتينات	94
2-5	موديل اختبار الجلد بالملزن النباتي في الطير	98
3-5	معامل الانقسام	112
4-5	تكوين الاورمات اللمفية	119
	الاستنتاجات	
	التوصيات	
	المصادر	

قائمة الاشكال

ت	المحتويات	الصفحة
1-3	مخطط يبين طريقة فصل اللكتينات	50
2-3	منحنى المعايرة يوضح العلاقة بين التركيز القياسي للالبومين مقابل الكثافة الضوئية	54
4-3	منوال الدراسة	64
5-3	المنحنى القياسي الموضح للعلاقة بين التركيز القياسي لسكر الكلوكوز مقابل معامل الانكسار	67
1-4	ا- مرحلة almetaphase لطير محفز باللكتينات المدروسة	77
	ب- الاورمات اللمفية المتكونة باستخدام نفس التحفيز اعلاه	78

قائمة الجداول

رقم الجدول	اسم الجدول	رقم الصفحة
1-2	معظم نسائل الخلايا التائية المتواجدة في الدم والانسجة المحيطية.	11
2-2	صفات المستضدات المعتمدة وغير المعتمدة على التوثة.	18
3-2	المشطرات اللمفاوية.	20
4-2	عمل المنشطات المناعية على الخلايا المقتدرة مناعيا.	25
5-2	موديلات دراسة التحوير المناعي .	34
1-3	اسماء النباتات العربية واسمائها الشائعة والعلمية.	48
2-3	البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي لتركيز محلول الالبومين والتخافيف القياسية.	53
1-4	تلازن كريات الدم الحمرالمخففة للخراف مع محاليل اللكتينات النباتية.	65
2-4	تركيز البروتين الكلي في المحاليل اللكتينية لبذور النباتات المستعملة.	66
3-4	قيمة معامل الانكسار ودرجة الحرارة لكل تركيز من تراكيز سكر الكلوكوز.	66
4-4	قيمة معامل الانكسار ودرجة الحرارة لكل تركيز من تراكيز المحاليل اللكتينية لبذور النباتات المستعملة.	68
5-4	قيمة زاوية الانقلاب لكل محلول لكتيني.	69
6-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاوية	73

	ومعدل تكوين الاورومات اللمفية لتحديد الجرعة المثلى لنبات خيار الماء.	
7-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية عند الحقن بمتعدد السكريد الشحمي كسيطرة موجبة.	75
8-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية عند الحقن بالملزن الدموي النباتي كسيطرة موجبة.	77
9-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية بمحلول لكتين بذور نبات خيار الماء.	81
10-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية بمحلول لكتين بذور نبات البطيخ.	83
11-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية بمحلول لكتين بذور نبات الرقي.	85
12-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية بمحلول لكتين بذور نبات الحنظل.	87
13-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية للمحاليل اللكتينية لبذور النباتات الاربعة المستخدمة (خيار الماء , البطيخ , الرقي , الحنظل).	89
14-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورومات اللمفية عند الحقن بالمضاد الحيوي (الريفادين).	91

15-4	القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاويةومعدل تكوين الاورمات اللمفية عند الحقن بـ (التيوبركلين).	93
1-5	بعض اللكتينات النباتية والسكريات القابلة للارتباط بها.	96
2-5	بعض اللكتينات النباتية والسكريات المتخصصة بها.	96

قائمة المختصرا ت

المختصر	المصطلح
APC	Antigen presenting cell
BCR	B-cell receptor
C	Complement
CD	Cluster of differentiation
Con - A	Concanavalin - A
CTMC	Connective tissue mast cell
DAG	Diacylglycerol
DNA	Deoxyribonucleic acid
GALT	Gut associated lymphoid tissue
HGG	Human gama globulin
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
JFL	Jake fruit lectin
KDO	2-Keto 3-deoxyoctuoic acid
LPS	Lipopolysaccharides
MHC	Major histocompatibility complex
MI	Mitotic index
PBS	Phosphate buffer solution
PHA	Phytohaemagglutination
PNL	Peanut lectin
PPD	Purified protein derivative
PTKS	Protein thirokinase
PW	Pokweed
RNA	Ribonucleic acid
TC	T- cytotoxic
TCR	T-cell receptor
Tdh	T-delayte hypersensitivity
Th	T-helper
TS	T-suppressor

1. المقدمة Introduction

1.1 :نظرة تعريفية :

اللكتينات جزيئات حيوية كبيرة واسعة الانتشار في النبات بمختلف اجزائه وتوجد في الانسجة الحيوانية وفي البكتريا واللافقريات وخلايا الفقريات . وبينت الدراسات التركيبية بان هذه الجزيئات بروتينية من نوع البروتينات المرتبطة بالكلوكوز وكروية الطبيعة ذات هياة مجسمة تحتوي على مواضع نشطة وعلى حقول، وهنالك رأي لبعض الباحثين مفاده ان هذه الجزيئات الكبيرة تشبه الضد .وتوصف هذه البروتينات بانها متعددة الوظيفة، وقد يشمل طيفها الوظيفي, ملازنة الكريات الحمر للفقريات، ملازنة الخلايا البيض، فصل الخلايا، اتحاد الحيمن و البيضة في عملية الاخصاب وتنميط الخلايا السرطانية. وقد تعتبر في اللافقريات جزيئات دفاعية مناعية. وبعض اللكتينات قد تستخدم كمشطرات خلوية (Arason, 1996 ; Shnawa, 2001 ; Shanwa *et. al.* , 2004) .

2.1 : مسوغ الاختيار :

هنالك لكتينات معروفة بكونها مشطرات خلوية مثل الملزن الدموي النباتي ومشطر الاعشاب والكونكافالين – اي. وهذا الفعل التشطيري قد يحدث في تقنيات الزجاج او في تقنيات الحي او بالاثنين معاً. البحث عن اللكتينات المشطرة مهم في الدراسات المناعية والوراثية والبيئية (Chresti *et. al.* , 2000 a,b ; Chresti *et. al.*,2001).

ان هذه الدراسة هي محاولة للتحري عن اللكتينات المشطرة في بذور الأسرة القرعية بأنواعها المأكولة والطبية والزينة .

3.1 :أهداف الدراسة :

ان الهدف الأساس هو فصل اللكتينات المشطرة من بذور بعض نباتات الأسرة القرعية ووصفها والتحري عنها في الأنواع المأكولة والطبية والزينة. ولتحقيق هذا الهدف فان مسار العمل يبدأ من الخطوات الآتية :

1- اختيار بذور نباتات بعض انواع الاسرة القرعية (الخيارية) المختلفة بانواعها المأكولة والمستعملة للزينة وذات الاهمية الطبيةوهي بذور القثاء والرقي والبطيخ والحنظل.

2- فصل اللكتينات من البذور المستخدمة واجراء فصل جزيئي لهذه اللكتينات حيث شمل تركيز البروتين الكلي،والارتباط بالكاربوهيدرات والتلازن الدموي المباشر لدم الخراف .

3- اختيار طير الدجاج حديث الفقس وتطويعه لدراسة الأثر المشطر للخلايا اللمفية التائية .

4- تحديد جرعة اللكتين الملائم لدراسة المشطر في نموذج الطير حديث الفقس.

5- تحديد الجرعة الامثل لمادة الكولجسين في النموذج المستخدم في الدراسة.

6- دراسة الاثر المشطر للخلايا اللمفية التائية عن طريق :

أ- اختبار الجلد في الجناح .

ب- معامل الانقسام .

ج - دراسة الاورمات اللمفية .

7- دراسة الاثر المحور للمناعة لكل من الريفادين والتيوبركلين .

2. استعراض المراجع Literature Review

1.2 : الخلايا المقتدرة مناعياً :

يتكون الجهاز المناعي من انواع متعددة من الخلايا، منها خلايا تقوم باحتجاز المستضدات الغريبة, وخلايا تحول المستضدات هذه الى اشكال يمكن تمييزها, وخلايا تقوم بتمييز المستضدات الغريبة وتكون مسؤولة عن تعريضها للخلايا المسؤولة عن الاستجابة المناعية (Tizard., 1997), وتعد الخلايا اللمفاوية الخلايا الاساسية في تكوين المناعة. تدخل هذه الخلايا في تكوين الخلايا المتخصصة وغير المتخصصة, حيث توجد هذه الخلايا باعداد كبيرة في اعضاء خاصة بالجسم تدعى الاعضاء اللمفاوية فضلا عن وجودها في اماكن اخرى، فبعض هذه الخلايا توجد في الانسجة والدم, بينما يوجد بعضها الاخر في الانسجة فقط . ويمكن ذكر الخلايا الاتية كخلايا مهمة في الاستجابة المناعية وهي: الخلايا اللمفاوية، خلايا البلازما، خلايا البلعم الكبير والخلايا البيض المتعددة اشكال النوى(Polymorph Nuciear Leucocyte) (خليفة ، 1990)

اذ توفر الخلايا اللمفاوية وخلايا البلعم الكبير والخلايا المتخصصة الاخرى حماية ضد الميكروبات الغازية المتواجدة في داخل الجسم, في مجرى الدم, وفي العقد اللمفاوية, والطحال, وتحت الانسجة الطلائية المبطنة للجهاز التنفسي والجهاز الهضمي والجهاز التناسلي والبولي .

كما ان الخلايا المقتدرة مناعياً تتألف من البلاعم الكبيرة، الخلايا اللمفاوية البائية والتائية بمختلف نسيلاتها المساعدة، القاتلة والكابحة والمتوسطة لفرط الحساسية المتأخرة، ولكل من هذه الخلايا انواع متعددة من المؤشرات السطحية(CD marker) ذات الوظائف المناعية المحددة (Roitt *et. al* . , 2001) .

أ. النشوء:

اثناء التطور الجنيني للحيوانات الفقرية ومنها اللبائن، تنشأ الخلايا الامية (الجذعية) غير المتميزة في كيس المح وبتطور الجنين تنتقل بمسارها النشوئي الى الكبد الجنيني ومنها الى نخاع العظم الجنيني حيث تكون بهذه الحالة سليفات الخلايا المناعية Precursors (Cooper, 1982 ; Cooper,2002) .

وتنشأ الخلية البلعمية الكبيرة اثناء التطور الجنيني من الخلية الجذعية ثم سليفات الخلايا النخاعية Meyloid precursors وتنضج في نقي العظم حيث تتكون الخلايا البدائية وحيدة النواة Promonocytes بعدها اما تتميز الى خلايا احادية النواة Monocytes حيث تبقى في مجرى الدم او خلايا نسيجية Histiocyte هاجعة في الانسجة (Tizared, 1986). وتنشأ الخلايا اللمفاوية الخاصة بالمناعة اساسا من الخلايا اللمفية الجذعية (Lymphoid stem cells) غير المميزة وتوجد هذه الخلايا في كيس المح، الكبد, الطحال، نقي العظم وبعض المناطق الميزنكيمية للاجنة واللبائن المولودة حديثاً، بعد الولادة وخلال حياة البلوغ فانها تتواجد فقط في نخاع العظم (Roitt *et. al*. ,2001) .

فمعظم الخلايا الرئيسة الخاصة بمناعة اللبائن مشتقة من مصدر واحد هو نقي العظم وتدور هذه الخلايا في الدم وتدخل في بعض الاحيان الى الانسجة, وقد تغادرها عند الحاجة، حيث ان وجود الخلايا الجذعية عند البلوغ يجعلها تحتفظ بقابليتها على التمييز الى كل انواع خلايا الدم ويمكن ملاحظتها من خلال تجارب نقل الخلايا والتحليل الكروموسومي في الفئران غيرالمشعة (Playfair & Chain , 2001) .

ب . التنوع الخلوي:

تتخصص الخلايا الجذعية المولدة للخلايا المناعية بعد البلوغ الى:الخلايا الحبيبية Granulocytes (Myeloid) ووحيدات النواة Mononuclear phagocytes

(Myleoid) والخلايا اللمفاوية Lymphocytes (Lymphoid), وتلعب وحيدات النواة والخلايا اللمفية دورا كبيرا في الحماية ضد الامراض الخمجية تقسم الخلايا وحيدة النواة على قسمين هما: وحيدة النواة في الدم Monocyte والبلعمية الكبيرة في الانسجة Histiocyte، فبعد ان تتميز الخلايا من نقي العظم الى وحيدات النواة الاولية يبقى قسم منها في الاوعية الدموية في مجرى الدم ويهاجر بعضها الى اعضاء مختلفة لتكون البلعمية الكبيرة (Roitt *et. al* .,2001).

وتشكل الخلايا البلعمية البالغة الجهاز الشبكي البطاني Reticuloendthelial- System وهي على نوعين تحتوي جسيمات حالة قاتلة للبكتيريا فهي اما ثابتة موجودة في العقد اللمفاوية والكبد والطحال ونخاع العظم وفي الجهاز العصبي المركزي او تكون جوالة تنتقل بحركة اميبية نحو الاجسام الغريبة مثل كريات الدم البيض المحببة وغير المحببة والحويصلية والبريتونية (الكبيسي،2001).

تعد وحيدات النواة في الدم مصدراً لجميع الخلايا البلعمية الكبيرة في الانسجة وهي اكبر كريات الدم البيض ولها نواة بيضوية او كلوية الشكل تحتوي على كمية من السايتوبلازم اكبر من الخلايا اللمفاوية، وتعد هذه الخلايا الشكل غيرالناضج للبلعم الكبير في الانسجة، اما البلعم الكبير في الانسجة فيصاحبه زيادة في حجم الخلية وفي اعداد العضيات السايتوبلازمية مثل المايتوكوندريا والجسيمات الحالة، وتمتلك وحيدات النواة والبلعم الكبير على اغشيتها السايتوبلازمية مستقبلات لاثنين من تحت الكلوبيولين الممنع هما تحت الصنف الاول والثالث (IgG1 & IgG3) كذلك لهما مستقبلات اخرى للمكون الثالث للمتمم(C3) (السعد والزبيدي ، 1990) .

ان العمل الرئيس للخلايا البلعمية احادية النواة هو بلعمة الجزيئات الغريبة والانسجة الميتة والتي على شفا ان تموت وتحطيمها, وكذلك تعامل المادة الغريبة بطريقة ما بحيث تؤدي الى حث الاستجابة المناعية. فضلا عن ذلك فان البلعميات الكبيرة يمكنها ان تنظم الاستجابة المناعية, وتعمل على انتاج سايتوكينات جهاز المتمم, وتفرز عوامل مؤثرة على عملية الالتهاب (Tizard, 1986), ولها القدرة على تصنيع الانترليوكينات مثل IL-2 وتقديم المستضد Antigen presentation.(Wu *et.al*.,1990)

تتواجد البلعمية الكبيرة في الانسجة الرابطة وحول قاعدة الاغشية للاوعية الدموية الصغيرة والمتمركزة في الرئة تدعى البلعم السنخي (Alveolar macrophages) اماالمتواجدة في الكبد فتدعى خلايا كبفر (Kuppfer cells), اوتكون مبطنة للجيوب الطحالية وتدعى (Sinusoidal) او البلعم التشجري (Dendritic macrophages) او في الجلد (Langerhanse cell) وتدعى .(Roitt &Rabson,2000) , اوتتواجد في الجهاز العصبي وتدعى حينها بالدبقية الصغيرة (Microglia) (Stites *et. al*.,1994).ولها دور مهم في الالتهابات والاصلاح والمناعة الخلوية والخلطية وعمليات الايض والامراض الخبيثة. (Tanaka *et. al*. ,1999 ; Zhang , 1997).

اما الخلايا الحبيبية فتصنف الى كريات الدم البيض العدلة (Netrophilic leucocytes) وكريات الدم البيض الحمضة (Acidophilic leucocytes) وكريات الدم البيض القعدة (Basophilic leucocytes) والخلايا البدينة (Mast cells),وهذه الاخيرة لها نوعين هما:الخلايا الصارية المخاطية (Mucosal Mast Cells (MMC المرتبطة بالاغشية المخاطية والخلايا البدينة الرابطة (Connective Tissue - (CTMC Mast Cells (Roitt *et al*.,2001). اما الخلايا العدلة التي تدعى بمتعددة اشكال النوى (Polymorph Nuclearnutrophil) فيمكن تصنيفها بحسب الحبيبات الداخلية الى قسمين رئيسيين, هما:

1.الحبيبات الاليفة للازور Azurophilic granule.

2.الحبيبات السالبة للبيروكسيديز Peroxidase-negative granule.

(Roitt & Rabson,2000).

اما الخلايا اللمفاوية فتصنف الى مجموعتين رئيستين هما:خلايا لمفاوية نوع (ت) وخلايا لمفاوية نوع (ب) ويرمز الحرف (ت)الى غدة التوثة وحرف (ب) الى جراب فابيرش الطيور او نقي العظم في الحيوانات الاخرى, وهي التي تكون مسؤولة عن انتاج الاضداد(Tizard,1997), فالخلايا اللمفاوية البائية تستطيع تخليق البروتين المسمى بالكلوبيولين المناعي حيث يظهر هذا الكلوبيولين المناعي على سطح الخلية فقط في الحالة الخاملة حيث يخدم كمستقبل لمستضدات خاصة ويكون مرتبطا بالاغشية، اما الخلية البائية الفعالة والتي تسمى بالخلية البلازمية فانها تفرز كمية كبيرة من بروتينات الكلوبيولين المناعي الى المحيط الخارجي وتدعى بالاضداد، لذلك فان الوظيفة الاساسية للخلايا البائية هي افراز الاضداد الى الدم والى سوائل الجسم الاخرى، وكذلك تقوم الخلية البائية بوظيفة اخرى هي تقديمها للمستضد والتي يمكن تمييزها عن الخلايا اللمفاوية التائية وكذلك تعمل الخلية البائية المنشطة على افراز المدورات اللمفية Lymphokines خاصة وعوامل اخرى مثل (IL-12) IL-10 , التي تساعد على نمو وتحفيز خلايا مناعية اخرى، لذلك نجد ان بعض الخلايا البائية النشطة بعضها يتميز الى خلايا بلازما منتجة للاضداد والبعض الاخر يكون خلايا ذاكرة خاملة (Parslow *et. al* ., 2001), لذلك يتكون الكلوبيولين المناعي من نوعين من متعدد الببتيدات تدعى السلسلة الثقيلة والسلسلة الخفيفة، على ان وجود هذا البروتين على سطح الخلية البائية الهاجعة يكون مرتبطا بالغشاء على شكل مستقبلات والتي تكون خاصة بالمستضدات حيث يبلغ عدد الكلوبيولينات المناعية المفرزة من هذه الخلايا الهاجعة من عشرات الى الاف الكولبيولينات المناعية، وبالعكس فان الخلية اللمفاوية البائية العاملة والتي تدعى الخلايا البلازمية يمكنها افراز اعداد كبيرة من بروتينات الكولبيولينات المناعية الى المحيط المجاور ويطلق عليها الاجسام المضادة و هي عبارة عن جزيئات كبيرة من بروتينات سكرية, وان ارتباط هذه البروتينات لا يخدم كمستقبلات سطحية للمواد الغريبة فقط لكنها ايضاً تفرز خارجاً لأجل ارتباطها بالهدف بعيداً عن الخلايا , وعند انقسام الخلية البائية النشطة والفعالة فان بعض الخلايا البنوية تصبح خلايا بائية هاجعة (خلايا ذاكرة) والباقي يتميز الى خلايا بلازما, وتكون الخلية البلازمية ذات شكل بيضوي وتحتوي كمية من السايتوبلازم يحيط بنواة دائرية لامركزية، حيث ان الكلوبيولين المناعي لا يتواجد على سطح الخلية البلازمية منذ البداية وانما ينتج في السايتوبلازم وبعدها يفرز خلويا من الخلية الى الفراغ خارج خلوي(Parslow *et al*.,2001). ترتبط الكلوبيولينات المناعية مع جزيئات اخرى على سطح الخلية اللمفاوية البائية مكونة معقد مستقبل المستضد على الخلية البائية (BCR) وتكون هذه الجزيئات مكونة من اواصر ثنائية الكبريت ومختلفة القطع وهي Igβ ($CD_{79}a$) & Igβ ($CD_{79}b$)
ترتبط هذه الاجزاء المختلفة مع قطع الاغشية العائدة لمستقبلات الكلوبيولين المناعي وتكون مشابهة للمكونات الجزيئية المنفصلة في معقد TCR /CD_3والتي تقوم بتنشيط الخلايا (Roitt *et. al*.,2001).
وسنشير في الفقرة الاتية الى وصف الخلايا اللمفاوية التائية وبشكل مفصل .

2 . 2 : الخلايا اللمفاوية التائية :

تكون الخلايا اللمفاوية التائية صغيرة الحجم دائرية الشكل متواجدة عادة في الدم المحيطي، الطحال، العقد اللمفاوية,الثايمس، اللوزتين وغيرها من الاعضاء والانسجة، وعند عمل مسحة دموية من الدم تلاحظ هذه الخلايا الدائرية الشكل ذو قطر اكبر بقليل من قطر كريات الدم الحمر، وتشكل حوالي 20 - 45 % من مجموع كريات الدم البيض في الانسان الطبيعي، هذه الخلايا تكون متحركة وتنتقل مع بقية كريات الدم الى مختلف انحاء الجسم وهذه خاصية مهمة للخلايا الخاصة بالدفاع ضد المسببات المرضية (خليفة، 1990).

ويظهر ان الخلايا اللمفية التائية عامة تمثل نسائل من الخلايا مختلفة المنشأ Heterogenous مقارنة بالخلايا البائية خصوصاً بمقارنة عدد الاعمال التي تجريها، فالخلايا التائية فضلا عن استجابتها للمستضد تصبح خلايا مؤثرة في العديد من الاستجابات المناعية الخلوية المختلفة، ومع ذلك فان كافة نسائل الخلايا التائية تمتلك صفات مشتركة وهو انها تنضج كلها في محيط التوثة في اثناء عملية تكوينها وبلوغها(Tizard, 1986) .

ولأهمية هذا النوع من الخلايا اللمفاوية فان ازالة غدة التوثة من الفأر حديث الولادة يمنع تكوين الخلايا التائية ، وكنتيجة لذلك لاتستطيع الحيوانات حديثة الولادة والمستأصلة غدة التوثة منها رفض الانسجة الغريبة لعدم وجود خلايا تتوسط في الاستجابة المناعيةالخلوية.(Tizard,1997).

تتميز الخلايا التائية بقابليتها على الارتباط مع كريات الدم الحمر للخراف على سطحها وتكوين شكلاً شبيهاً بالورد، يطلق عليه التكوين الوردي (T–Rosette) ويستعمل اختبار ربط كريات دم الخراف احياناً لفصل الخلايا اللمفاوية التائية عن غيرها من الخلايا في الدورة الدموية كما وجد ايضاً ان هذه الخلايا تمتلك على اسطحها مستقبلات شبيهة بجزيئات الضد تمتاز بنوعيتها للمستضدات (Parslow *et. al* ., 2001) . ويعتمد تكوين الخلايا التائية على عدة عناصر من اهمها الزنك الذي يكون اساسيا لآنقسام هذه الخلايا, وكذلك يكون مهما في عملية نضوجها وتنوعها، وايضاً في استجابتها للتشطير، والموت المبرمج للخلايا في الاعضاء اللمفية والعصبية، وفي استنساخ الجينات والوظائف الحياتية للاغشية، حيث تكون الخلايا اللمفاوية واحدة من انواع الخلايا التي تتأثر بعنصر الزنك الذي يكون اساسيا في تكوين الخلايا اللمفاوية التائية، وان نقصان مستوى الزنك في البلازما يؤدي الى عدة امراض و يضعف استجابة الخلايا اللمفاوية للملزن الدموي النباتي(PHA) Phytohaemagglutination(Baum *et. al.,2000;* Chandra,1997), كذلك توجد العديد من السكريات المتعددة التي تقوم بتحفيز الخلايا التائية وتخدم في عملية تنوعها(Zimmerman,1999 ; Burger,1998)

ويمكن تقسيم الخلايا اللمفية التائية الى مجموعتين رئيسيتين هما :

أ) الخلايا التائية المؤثرة Effector T- Cells وهذه المجموعة تقسم الى نوعين هما :

1. خلايا تائية سامة Cytotoxic T-lymphocyte والتي لها نوعين هما TC_1, TC_2.
2. خلايا تائية وسيطة لفرط الحساسية المتأخرة Delytehypersensetivity- T- lymphocyte(Tdh)

ب) الخلايا التائية المنظمة Regulatory T-cells وهذه المجموعة تقسم الى نوعين ايضاً هما :

1. خلايا تائية مساعدة Helper T- cells (Th) والتي لها نوعين هما TH_1 , TH_2
2. خلايا تائية كابحة (Ts) Suppressor T-cells .

ج) الخلايا التائية الذاكرةMemory T-cell.(Stites *et. al.*,1994)

ان الخلايا التائية، لا تمتلك كلوبيولينا مناعيا واضحا على سطحها ولكن بدلاً عنه يمكنها ان تتعرف على المواد الغريبة من خلال بروتينات سطحية تعرف بمستقبلات الخلايا التائية . وهذه المستقبلات تكون اصنافا مختلفة من البروتينات الغشائية على معظم الخلايا التائية مكونة بذلك زوج من البيتيدات الغشائية المتعددة والتي تكون على شكل سلاسل α & β المرتبطة مع بعضها بأواصر ثنائية الكبريت، وترتبط هذه المستقبلات ارتباطاً وثيقاً بالكلوبيولينات المناعية في النواحي التطورية وتشترك معها في عدد من الصفات التركيبية والوظيفية منها قابليتها على تحديد الجزيئيات الصغيرة من المستضدات، وبخلاف الكلوبيولينات المناعية فان مستقبلات الخلية التائية البروتينية لا تفرز وكنتيجة لذلك تفقد الخلايا التائية قابليتها عند اطلاقها للهدف ولمسافات طويلة, وبعكس الخلية البائية فان الخلية التائية يمكنها تمييز المواد الغريبة من خلال محتويات خاصة، حيث ان الخلية

اللمفاوية يمكنها تمييز البروتينات الغريبة فقط عندما يتم تقسيمها الى ببتيدات صغيرة وتقدم على اسطح خلايا المضيف الاخرى والتي تدعى بالخلايا المقدمة للمستضد (Antigen Presenting- Cells).

حيث ان جميع انواع خلايا المضيف يمكنها تقديم المستضد تحت الظروف نفسها ولكن هنالك انواعا خاصة من الخلايا تكون مسؤولة عن هذه الوظيفة وتكون مهمة في السيطرة على فعالية الخلايا التائية، وهذه الخلايا تشمل: البلعمية الكبيرة، والخلايا اللمفاوية البائية، ومجموعة من الخلايا المشتقة من نخاع العظم تعرف بالخلايا المشجرة، وان عملية تقديم المستضد تعتمد على جزء بروتيني خاص يعرف بمعقد التوافق النسيجي (Major Histocompatibility Complex) المتواجدة على سطح الخلية المقدمة، حيث ترتبط الببتيدات الغريبة ببروتينات MHC بواسطة اواصر غير تساهمية . يمكن تمييز ارتباط الببتيدات مع بروتينات MHC من قبل مستقبلات الخلية التائية (TCR).

هنالك بروتينات سطحية اخرى على سطح الخلية التائية الناضجة والفعالة حيث ان سطح الخلية التائية يستطيع ان يرتبط مع متعدد بروتينات سطحية غشائية اخرى هي CD_3 وهي جزيئات عناقيد االتمايز (Cluster of differentiation) حيث ترتبط هذه البروتينات مع مستقبلات الخلية التائية عن طريق اواصر غير تساهمية وتخدم في عملية نقل الاشارة من المستقبلات الى السايتوبلازم، وهنالك بروتين اخر هو CD_2 الذي يظهر في المراحل الاولى لتطور الخلايا التائية في التوثة، حيث تظهر على سطح نسائل الخلايا التائية ولاتوجد على انواع اخرى من الخلايا، لذلك تكون علامة تميز جديدة لهذه الخلايا(Roitt *et. al.*,2001) .

ان الخلايا اللمفاوية التائية الناضجة تظهر بوضوح في الدم المحيطي والاعضاء اللمفية الثانوية وتكون جميعها تقريباً حاوية على بروتينات CD_3^+&CD_2^+ على سطحها. وهنالك صنيفات اخرى ولها وظائف مناعية مختلفة، واهم نوعين من هذه الصنيفات والتي يمكن تمييزها من خلال وجود بروتينات سطحية اضافية تعرف بـ CD_4 & CD_8 . ان الخلية اللمفاوية التائية العاملة تظهر واحدة من هذه البروتينات حيث ان الخلية التائية التي تكون حاوية على البروتين السطحي CD_4 هي الخلية المساعدة اماالتي تحمل البروتين السطحي CD_8 هي الخلية السامة. وتشكل الخلايا التائية الحاملة للبروتين CD_4^+ حوالي 70% من مجموع الخلايا اللمفية التائية في دم الانسان والانسجة اللمفاوية الثانوية و 25% من هذه الخلايا حاوية على البروتين CD_8^+ و 4% منها لا تحتوي على أي بروتين أي انها CD_4^- &CD_8^- حيث تكون مستقبلات هذه الخلايا اللمفاوية مكونة من ببتيدات متعددة هي α & β والمتبقي من الخلايا اللمفاوية والبالغ 1% تحوي النوعين من البروتينات أي انها CD_4^+&CD_8^+, كما موضح في الجدول (2 – 1) .

*جدول (2 – 1):معظم الصنيفات للخلايا التائية المتواجدة في الدم والانسجة المحيطية .

Surface phenotype	Predominant function	Proportion of Total T-lymphocyte	T-cell receptor type
$CD_4^+ CD_8^-$	Helper	70 %	α / β
$CD_4^- CD_8^+$	Cytotoxic	25 %	α / β , rarely α / δ
$CD_4^- CD_8^-$	Cytotoxic	4 %	α / δ
$CD_4^+ CD_8^+$	?	1 %	α / β

*الجدول ماخوذ من (Parslow *et.al.*,2001)

ان العلاقة بين CD_4 او CD_8 مع Th و Tc تكون قوية ولكنها ليست مطلقة فالقليل من الخلايا لـ CD_8 تكون ذات فعالية مساعدة والقليل من الخلايا CD_4 لها فعالية سمية .

ان الخلايا اللمفية التائية الخاصة بالذاكرة تبقى بالحالة الهاجعة ولاتظهر أي فعالية سامة او مساعدة وعند تنشيطها فانها تعاني العديد من دورات الانقسام حتى تنتج خلايا بنوية عديدة ، بعض هذه الخلايا البنوية تعاد الى الحالة الخاملة كخلايا ذاكرة وبعضها تصبح خلايا فعالة سامة او مساعدة . وتكون هذه الخلايا البنوية مشابهة للابوية أي انها تحمل نوع البروتين السطحي نفسه, أي ان الخلايا الحاملة CD_4 تنتج CD_4 فقط بينما الخلايا التائية الحاملة للـCD_8 تنتج خلايل بنوية تحمل CD_8 فقط . والخلايا المؤثرة اللمفاوية تميل ان تكون ذات سايتوبلازم كثير وكروماتين قليل مقارنة بالخلايا اللمفاوية الخاملة وتكون هذه الخلايا المؤثرة حاملة لعدة انواع من البروتينات السطحية مثل CD_{25} ، CD_{28} , CD_{29} , CD_{40} L ، ومستقبلات الـ (Transferrin) ومجموعة من بروتينات MHC المعروفة بالصنف الثاني غير الموجودة في الخلايا الخاملة وهي تظهر ايضاً كمية زائدة من العلامات السطحية مثل CD_2 التي لها القابلية على الارتباط مع كريات الدم الحمر للخراف (Parslow *et. al.*,2001) .

تقوم الخلايا اللمفاوية التائية بتنظيم نوعي لكافة الاستجابات المناعية سواء كانت خلطية او خلوية فضلا عن مسؤوليتها عن الاستجابة الخلوية ولقد تم اثبات تنظيمها للخلايا البائية لافراز اضداد نوعية لمجموعة كبيرة من المستضدات يطلق عليها المستضدات المعتمدة على الخلايا التائية فتتداخل مع الخلايا البائية وتساعدها على انقسامها وتمييزها وتكوين الاجسام المضادة بعد ان تتحول الخلية البائية الى خلايابلازمية. فهنالك عدة انواع من الخلايا التائية تختلف في وظائفها فالخلية التائية المساعدة (Th) تتداخل مع البلعمية الكبيرة وتساعدها على تحطيم الامراض داخل خلوية، وهذا هو النوع الاول Type-1 او (Th_1-Cells). اما الصنف الاخرى من هذا النوع من الخلايا البائية فتتحول الى خلايا ذاكرة وهذا النوع من الخلايا التائية تعرف بالنوع الثاني(Type – 2)او(Th_2 – Cells), كذلك تقوم الخلية اللمفاوية التائية المساعدة بأفراز لمفوكينات Lymphokins خاصة ولها اهمية كبيرة في السيطرة على فعالية الخلايا اللمفاوية البائية والبلعمية الكبيرة والخلايا التائية السامة .

اما الخلايا التائية السامة (Tc) فتكون مسؤولة عن مهاجمة خلايا المضيف التي تصبح مصابة بالفيروسات وغيرها من الامراض الداخل خلوية وذلك بأنتاج مواد وسيطة ذائبة وسايتوكينات Cytokines والتي تعمل على تنشيط البلعميات الكبيرة (Roitt *et. al.* ,2001)

اما الخلايا التائية الخاصة بفرط الحساسية المتأخرة (Tdh) فلها اهمية في الحماية المناعية ضد الكائنات الممرضة التي تدخل داخل الخلايا وفي حالات رفض زراعة الانسجة بينما تلعب الخلايا التائية الكابحة (Ts) دوراً مهماً في الحماية ضد المناعة الذاتية فهي تعيق الاستجابة المناعية وذلك من خلال ارتباطها المباشر مع المستضد دون تقديمه بواسطة الخلايا البلعمية الكبيرة (الكبيسي، 1997), حيث تقوم الخلايا الكابحة باعاقة الاستجابة المناعية بثلاث اشكال :

1. منع تنشيط الخلايا التائية المساعدة .
2. منع تعاون الخلايا التائية المساعدة مع الخلايا البائية .
3. منع تطور الخلايا البائية بصورة مباشرة .

وتقوم بتثبيط الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية بنفس الشكل . (السعد والزبيدي، 1990) .

تقوم الخلايا التائية البسيطة في الدم المحيطي بافراز (IL_2) وبشكل رئيسي عند تحفيزها بوجود محفزات مساعدة وملائمة فأن كلا (CD_4^+ & CD_8^+) للخلايا التائية تتميز

الى خلايا مؤثرة مساعدة ومن النوعين الاول والثاني (Th_2&Th_1) تفرز نوعا من السايتوكاين، التمييز اللاحق يكون بأن كلا من الخلايا CD_4^+ (Th_1 & Th_2) و Tc_1 & CD_8^+ (Tc_2) تبقى ثابتة ولا يمكنها استحثاث التميز الى النمط المضاد او التحول الى النمط الافرازي للسايتوكاين(Mosmann & Sad,1995).

وللخلايا اللمفاوية التائية عدة وظائف, منها :

1. تعمل على تنظيم كمية الاجسام المضادة حسب الحاجة وذلك بالتأثير على الخلايا البائية اللمفاوية.
2. تعمل على تنشيط الخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophages)وكريات الدم البيض متعددة اشكال النوى بجذبها نحو الميكروب وتنشيط قدرتها على التهامه حيث تطلق انزيمات اللايسوسومات على الميكروب لتحطيمه .
3. لها القدرة على مهاجمة الفيروسات والطفيليات والفطريات وانواع من البكتريا التي تعيش داخل خلايا المضيف Host Cells .
4. لها اهمية في تحطيم بعض انواع خلايا السرطان Cancer Cells، حيث ان الخلايا السرطانية تحمل على سطحها بروتينات مختلفة عن الخلايا الاعتيادية فهذا الاختلاف يعمل على تحفيز الاستجابة المناعية في خلايا تائية مناسبة من اجل تحطيمها.
5. تعمل على انتاج انواع من حركيات اللمف اللمفوكينات Lymphokines . (Roitt *et. al* ., 2001)

2 . 3 : منشطات الخلايا اللمفية التائية :

ان عملية تنشيط او تحفيز الخلايا اللمفية التائية تتم من خلال صنفين رئيسيين من المواد، وهذه المواد هي المستضدات والمحفزات غير النوعية او المايتوجينات .

2 . 3 . 1 : المستضدات Antigens

ان وظيفة الجهاز المناعي هو حماية الجسم ضد الاحياء المجهرية الغازية، و يجب تمييز هذه الميكروبات حال غزوها الجسم, اذ ان له القابلية على تمييز الاجسام الغريبة اذا قامت بتحفيز الاستجابة المناعية، وفي الحقيقة ان الجهاز المناعي يمكنه تمييز المكونات الخاصة بالكائنات الغريبة التي تدعى المستضدات (Tizard,1997).

ويطلق مصطلح المستضد على أي جزيئة يمكنها ان تستحث الخلية البائية اللمفاوية لانتاج الاجسام المضادة الخاصة، ويكون هذا المصطلح واسع الانتشار ويشير الى أي جزيئة يمكنها ان تميز بواسطة عناصر مهياة من قبل الجهاز المناعي وهي الخلايا اللمفاوية التائية او البائية او كلاهما (Roitt *et. al.* , 2001), فالمستضد هو جزيئة غريبة أي غير ذاتية Non–Self او تكون جزيئة مشابهة (مثل الخلايا، البكتريا، وغيرها) او يكون بشكل بروتين كبير او جزيئات ذاتية Self يمكنها ان تكون مستضدات , Playfair & Chain (2001).

فجزيئات الضد لا ترتبط مع كل العامل المعدي وذلك بسبب خصوصيتها حيث ان كل ضد يرتبط مع واحد من الجزيئات العديدة من المستضدات المتواجدة على سطح الكائنات الدقيقة، لذلك ربما هنالك الكثير من الاضداد المختلفة التي تعطى للممرض حيث ان كل ضد يرتبط مع محدده المستضدي مختلف على سطح الممرض، لذا يرتبط الضد مع جزء خاص من المستضد يدعى بالذرى المستضدية Epitopes حيث تحتوي المستضدات على الكثير من الذرى المستضدية المختلفة او المتعددة . حيث تكون الاضداد خاصة بالذرى المستضدية. لذلك تتواجد المستضدات على اسطح الخلايا المقدمة لها من خلال ارتباطها مع جزيئات خاصة تشفرها مجموعة من الجينات وهي بروتينات معقد التوافق النسيجي MHC حيث تستعمل الخلية

اللمفاوية التائية مستقبلاتها TCRs للتعرف على ببتيدات المستضدات المرتبطة مع جزيئاتMHCعلى اسطح الخلايا المقدمة للمستضد(Roitt *et. al.* , 2001).

وعلى وجه العموم فان المستضد يكون بشكل بروتين كبير يحوي الكثير من المحددات المستضدية القوية حتى يكون مستضدا جيدا اكثر من البروتين الصغير، واكثر المستضدات غرابة عندما يكون قليل الشبه مع الهياة الذاتية ويكون له تاثير قوي على الاستجابة المناعية، وتتجمع الذرى المستضدية بكثافة على اجزاء من السلسلة الببتيدية التي تكون من الاسطح الكروية (Roitt & Rabson , 2000) .

وفي الحقيقة هنالك نوعان من الذرى المستضدية منها مايميز من قبل الكلوبيولينات المناعية تدعى بالذرى المستضدية الخاصة بالخلايا اللمفاوية البائية التي تختلف عن تلك المشخصة من قبل مستقبلات الخلايا التائية TCRs التي تدعى بالذرى المستضدية الخاصة بالخلايا التائية . اوضحت الدراسات ان الضد يرتبط مع ببتيد متعدد وقصير وهذا يشير الى ان الذرى المستضديه تتكون من (3 – 6) من الاحماض الامينية وقد تكون الذرى المستضدية بشكل بروتين خطي من مجموعة احماض امينية او متعدد السكريات والتي ترتبط تساهمياً فيما بينها بالذرى وتكون غير متأثره بالمسخ بالحرارة او بالمعاملات الاخرى لذلك تدعى المستضدية الخطية (Linear or Sequential epitopes)، اما النوع الاخر من الذرى المستضدية المتواجدة في الخلايا البائية فهي تتكون عندما تتحرك متعددة الببتيدات او متعددة السكريات مكونة انطواءات وبشكل ثلاثي الابعاد تدعى بـ (Conformation epitopes) والتي تفقد خاصيتها بالحرارة (Parslow *et. al.*,2001) لذلك يدعى جزء الضد المرتبط مع الذرى المستضدية المتواجدة على سطح المستضد بجنيب الذرى Paratopes الذي يكون مختصا بواحد وليس اكثر من الذرى المستضدية (Roitt & Rabson , 2000) .

ويجب الاشارة الى ان هنالك العديد من الجزيئات الغريبة التي تعتبر غير مناعية وذلك لارتباطها بالاضداد من خلال الذرى المستضدية ولكنها لا تحفز الاستجابة المناعية، ولكن عند اتصال هذه الجزيئات مع مواد اخرى بواسطة اواصر تساهمية تصبح هذه الجزيئات مناعية وتكون لها القدرة على تحفيز الاستجابة المناعية من خلال اتصالها بالاضداد، والجزيئات التي تمتلك تلك الخاصية تدعى بالمستضد الناقص (الهابتينات) Haptens والبروتينات المتصلة بها تدعى بالحامل Carriers.(Parslow *et. al.*,2001). ويلاحظ ان هنالك نوعا خاصا من المستضدات لها تاثير مشطر قوي حيث تستحث كل الخلايا التائية وبكل نسائلها حيث تتشابه هذه المستضدات مع الخلايا التائية وبكل صنيفات من خلال عوائل TCR / Vβ غير المعتمدة على المستضد ، ان هذا النوع من المستضدات يدعى بالمستضد الفائق Super Antigens والذي لايقدم عن طريق الخلايا المقدمة للمستضد APC ولكن يتفاعل مع الخلايا التائية من خلال الارتباط المشترك Cross – link بين Vβ والصنف الثاني العائد لمعقد التوافق النسيجي MHC وجزيئات مستقبلات الخلايا اللمفاوية التائية APCs، ومثالها السموم الداخلية لبكتريا *Staphylococcus aureas* التي تؤدي الى الاصابه بالتسمم الغذائي (Roitt *et. al* ., 2001)، لذلك فأن المستضد الفائق لا يعتمد على مستقبلات MHC الخاصة ولكن وجود مستضدات MHC تكون لازمة للاستجابة المؤثرة، حيث ان المستضد الفائق لايرتبط مع التجويف الخاص بربط المستضد العائد للصنف الثاني من MHC وانما يتصل على سطحها الخارجي(Tizard,1997) . وهنالك نوعين من المستضدات وهي :

1. المستضدات المعتمدة على التوثة Thymus-dependent Antigens

وهذه المستضدات لا يمكنها احداث أي تحفيز عند ارتباطها بمستقبلات الخلايا اللمفاوية البائية, بينما تبقى على سطح هذه الخلايا وبشكل مستضد ناقص فتكون غير قادرة على ارسال اشارة الى الخلايا اللمفاوية البائية وتفشل في عملية تحفيز انتاج الاضداد، ومثلما يحتاج المستضد الناقص الى حامل لاجل تحفيز الاستجابة المناعية كذلك فان وجود الخلية اللمفاوية

التائية يكون ضروريا للخلايا البائية لاحداث استجابة مناعية وهذه صفة خاصة بالخلية التائية المساعدة (Th) .

2 . المستضدات غير المعتمدة على التوثة Thymus-Independent Antigens

وهذه المستضدات ترتبط مع الخلايا اللمفاوية البائية بدون الحاجة الى وجود معقد التوافق النسيجي الصنف الثاني (MHC Class II) وتدعى هذه المستضدات بالمستضدات غير المعتمدة على الخلية التائية T-Independent (TI) والتي تكون مقاومة للتحطيم وترتبط مع الخلية اللمفاوية البائية من خلال عدة اواصر وتقسم هذه المستضدات على مجموعتين هما : (TI – 1)& (TI – 2) معتمدة بذلك على تنشيطها الخلايا اللمفاوية البائية فالنوع الاول (TI – 1) غالباً ما يكون عبارة عن مكونات الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام مثل (LPS) والذي يقوم بتنشيط عالي لنسائل الخلايا البائية ومن خلال وجود تركيز قليل منها ولايحتاج الى اشارة تحفيزية اخرى، بينما النوع الثاني (TI – 2) فتتكون وبشكل سائد من جزيئات كبيرة لمتعدد السكريات مثل متعدد السكريات للجدار الخلوي البكتيري، وتقوم بتحفيز الخلايا البائية من خلال التفاعلات العرضية لجزيئات الكلوبيولين المناعي على اسطح الخلايا البائية وتؤدي بذلك الى تكوين اشارة مستمرة وهو يحتاج الى بعض نواتج الخلايا التائية المساعدة مثل السايتوكينات Cytokines حيث تؤدي الى احداث تنشيط مبكر للخلايا البائية (Roitt&Rabson,2000) .

ان صفات المستضدات المعتمدة وغير المعتمدة على التوثة ملخصة بالجدول الاتي.

*جدول (2 – 2): صفات المستضدات المعتمدة وغير المعتمدة على التوثة .

Characteristic	Dependent	Independent	
		TI_1	TI_2
Chemical nature	Protein	Polysaccharide Lipopolysaccha-ride(LPS)	Polymeric Polysaccharide
Immunoglobulin(Ig) class	AII	IgM only	IgM & IgG
Anamnestic response	Yes	No	No
Delaed type hypersensiti-vity	Yes	No	No
B-cell mitogen	No	Yes	No

*ماخوذة من(Hyde,2000).

2 . 3 . 2 : المشطرات Mitogens

تختلف هذه المواد عن المستضدات وذلك لقدرتها العالية على تحفيز نسبة كبيرة من الخلايا اللمفاوية لانواع متعددة من الحيوانات، تستخدم هذه المواد لتحفيز الخلايا في انابيب الاختبار *In vitro* وذلك لدراسة الفعاليات الحيوية التي تحصل بعد التحفيز، حيث ان اول محفز اكتشف هو الملزن الدموي النباتي Phytohaemagglutination(PHA) الذي تم عزله من نوع من الفاصولياء تسمى Red Kidney beans في عام 1955، وان معظم هذه المشطرات مشتقة اما من النباتات او من البكتريا ، وتدعى تلك التي نحصل عليها من النباتات باسم Phytomitogen او لكتينات Lectin وتتحول حوالي 80% من الخلايا اللمفاوية الى لمفوبلاست بعد تعرضها للمشطر بفترة زمنية تصل الى يومين او ثلاثة ايام، لكن النسبة الحقيقية للخلايا اللمفاوية المحفزة قد لا يتعدى 50% ويختلف هذا الرقم بطبيعة الحال اعتماداً على نوع المشطر المستعمل ونوع الخلايا اللمفاوية التائية والبائية، حيث ان القدرة التحفيزية للمشطرات ليست لها علاقة بقابليتها الاستضدادية، وهذه المواد تتمكن من تحفيز عدة مجاميع

منها Polyclonal بغض النظر عن طبيعتها الاستضدادية . لاترتبط المشطرات بالمستقبلات الخاصة بالمستضد الموجود على اسطح الخلايا اللمفاوية ولكنها ترتبط بالكاربوهيدرات في كل الخلايا اللمفاوية، ومع ذلك فليست كل المشطرات غير خاصة حيث لوحظ ان بعضها يحفز الخلايا التائية في حين بعضها الاخر يحفز الخلايا البائية (خليفة ، 1990) . والكثير من انواع المشطرات توفر ادوات تستخدم في ابحاث مختلفة في الاونة الاخيرة وذلك بارتباطها مع عملية تحفيز الخلايا اللمفاوية(Sharon&Lis,1972) .

فالخلايا التائية يمكن ان تحفز من قبل بعض المشطرات ، حيث ان معظم الخلايا التائية تحفز من قبل الملزن الدموي النباتي (PHA) كلكتين يعزل من الفاصوليا، او تحفز من قبل Concanavalin-A المستخلص من نوع بقولي يدعى (Jack beans)، وهذه الجزيئات تستطيع الارتباط مع سطح جزيئة الخلية التائية والتي تشمل معقد TCR و CD_2 مكونة عناقيد على سطح الخلية، وعلى كل حال يمكن لهذه المشطرات ان تنشط الخلايا التائية بغض النظر عن خصوصية مستضداتها (Roitt *et. al.*,2001), لذلك تقوم بعض اللكتينات النباتية المشطرة وبعض المكونات البكترية مثل متعدد السكريد الشحمي (LPS) Lipopolysacchride بتحفيز الخلايا على الانقسام مما يجعلها مهمة في دراسة الخلايا ولاسيما الخلايا اللمفاوية البائيةفي الزجاج والبائية والتائية في الحي, ومن هذه المشطرات:

اولاً : اللكتينات النباتية مثل :

1. Concanavalin-A: ويرمز له (Con – A) وهو لكتين رابط لسكر (α–D-Mannose,α-D-Glugose)وهو ملزن لكريات الدم الحمر، مصدره نوع من البقول يطلق عليها بقول جاك (Jack bean) واسمها العلمي *Concavalia ensiformis* وهذا اللكتين يحفز خلايا الانسان اللمفية على الانقسام خاصة الخلايا التائية, فعند تعرض الخلايا لهذا اللكتين تتنبه له وتفرز بعض العوامل مثل Lymphokines وInterferons وقد يغير اللكتين من حالتها الوظيفية فتتحول مثلاً الى خلايا سميه للخلايا Cytotoxic.(السعد والزبيدي,1990)
2. ملزن الدم النباتي Phytohaemagglutination: ويرمز له (PHA) وهو نوع من اللكتينات ينبه مجموعة اخرى من الخلايا اللمفية التائية والبائية في الانسان على الانقسام وهو ملزن لكريات الدم الحمراء مصدره نوع من البقول (Red kidney bean) واسمها العلمي *Phaseolus vulgaris* وهذا اللكتين متخصص بالسكر Acetyl D-Galagtosamine.(السعد والزبيدي,1990)
3. ما يتوجين الاعشاب PokWeed Mitogen : وهي مواد مستخلصة من جذور واوراق وسيقان وثمار العشب *Phytolacca americana* وهي ملزنة ضعيفة لكريات الدم الحمراء ولكنها محفزة شديدة لانقسام الخلايا اللمفاوية التائية والبائية في الانسان وهو منشط لكلا النوعين من الخلايا في الفئران، ان المادة الفعالة في هذه المستخلصات تكون بروتينية التركيب (السعد والزبيدي,1990) .

وهناك اعداد من اللكتينات النباتية التي قد تكون ملزنة للخلايا الحمراء تركيبها بروتين كلوكوزي ولها صفات اللكتينات الأخرى (Sharon *et. al* ., 1976) الا انها غير مشطرة Non – Mitogenic, وقد تكون مشطرة، وفي هذه الدراسة محاولة للكشف عن قابلية بعض اللكتينات النباتية المشطرة .

واتضح بان هنالك الكثير من العوامل الكيمياوية التي تتراوح بين الايونات المعدنية البسيطة الى الجزيئات الكبيرة مثل الاضداد واللكتينات يمكن لها ان تظهر قابلية تشطير (Nowell, 1960) وهذا عدد من المشطرات اللمفاوية.

1. Plant Extracts :
   Phaseolus Vulgaris (Phytohaemagglutination)

Canavalia ensiformis (Concanavalin A)
Phytolacca americana (Pokweed mitogen)
Lens Culinaris (Lentil)
Vicia faba (Favin)
Pisum Sativum (Pea)
Wistaria floribunda

2. Bacterial Products :
Lipopolysaccharied (Lipid A)
Staphylococcal enterotoxin B
Tuberculin , Purified Protein Derivative (PPD)
Streptolysin S

3. Antibody Reagents :
Anti-immunoglublin sera
Anti-lymphocyte sera
Carbohydrate – Specific antibodies
Anti-α_2 – macroglobulin .
Anti – β_2 – microglobulin .

4. Miscellaneous Chemicals :
Sodium metaperiodate .
Phorbol esters (TPA)
Ca^{++} - ionophore A – 23187
Metal ions (zinc , mercury , nickel)
Proteolyic enzymes (trypsin , papain)

مأخوذ من (Nowell , 1960) .

ثانياً : متعدد السكريد الشحمي Lipopolysacharied (LPS)

ان متعدد السكريد الشحمي (LPS) يعزل من البكتريا السالبة لصبغة كرام ويعمل كمشطر للخلايا البائية المشتقة من نخاع العظم وكذلك الخلايا اللمفاوية التائية في الحي(Anderson *et .al*., 1972)، ويتكون الـ(LPS) من مكونين منفصلين بالوظيفة هما متعدد السكريد O-polysaccharied والذي يعتبر مستضد كبير (Ludertz *et. al* 1971)., وهو يتصل من خلال سكر ثلاثي يدعى 2-keto 3-deoxyoctunoic acid (KDO) مع التركيب الدهني A المسؤول عن الوظيفة التشطيرية للـ(LPS) (Chiller *et al*., 1973 ; Killion & Mossison, 1998). ويمكن فصل السكريد المتعدد عن الدهن A من خلال معاملات كيماوية بسيطة (Galanos *et. al*.,1971 ;Luderitz *et.* al.,1971)حيث ان ازالة الدهن A لايغير من الصفات المستضدية للسكريد المتعدد(Skidmoer *et al*.,1975a) وبالعكس فان ازالة الدهن A من السكريد المتعدد يؤثر على قابليته التشطيرية لان الدهن A هو المسؤول عن القابلية السمية للجزء LPS(Chiller *et. al*., 1973), ولمتعدد السكريد الشحمي LPS عدة وظائف منها :

أ. ان LPS يستطيع ان يحفز عددا كبيرا من الخلايا اللمفاوية البائية بشكل غير معتمد على المستضد وينتج عنه نضج الكثير من الخلايا البائية مكونة خلايا منتجة للاضداد (Coutinho & Moller,1974) .

ب. ان LPS يمكن ان يقوم بتحفيز خلايا لمفاوية تائية مساعدة لتتحول الى استجابة مناعية معتمدة على المستضد (Watson *et. al.*,1973a) .

ت. ان LPS يعمل كمساعد Adjuvants ويزيد من الاستجابة المناعية للمستضدات الذائبة مثل البومين مصل البقر (Skidmore *et. al.*, 1975a) .

ث. يتداخل الـ LPS لاثارة التحمل ضد الكلوبيولين كاما البشري(HGG) (Louis *et. al.*, 1973)

بان المستضدات المختلفة مثل اللكتينات النباتية اذا استحثت كميات كبيرة من الخلايا اللمفاوية التائية من بين الخلايا التائية الهاجعة فان الاستجابة تتطلب خلايا مساعدة ولا تتطلب جزيئات معقد التوافق النسيجي(MHC) (Baum *et. al.*,2000 ; Licastro *et. al.*,1992) ، بينما يعد المستضد الفائق المفرز من بعض البكتريا والفيروسات مشطرا وحيدا وذلك لانه يستحث الخلايا اللمفاوية التائية اعتماداً على وجود سلسلة Vβ من مستقبلات الخلايا التائية (TCR) حيث ان هذا النوع من المستضدات يعمل على تنشيط الخلايا التائية وتكاثرها من خلال التفاعلات المشتركة بين Vβ & MHC (Bruno *et. al.*,1998; Dellabona *et. al.*, 1990)

ان الية تنشيط تشطير الخلايا اللمفاوية التائية تكون مباشرة او غير مباشرة, فالطريقة المباشرة تكون من خلال تاثير المواد المشطرة على مناطق خاصة في غشاء الخلايا اللمفاوية ويتبعها عملية خاصة لارسال اشارة ثانية لتنشيط الوظائف الخلوية وبالنهاية تؤدي الى تضاعف الدنا DNA والانقسام الخيطي . اما الطريقة غير المباشرة فتكون من خلال مساعدة خلايا البلعمية الكبيرة لتحفيز الخلايا اللمفاوية التائية على الانقسام لذلك تحتاج هذه الطريقة الى استجابة الخلايا البلعمية للمشطرات, هنالك عدة طرق للتعاون الحاصل بين الخلايا البلعمية الكبيرة والخلايا اللمفاوية وهي:

1- ارتباط المشطر مع سطح الخلية البلعمية الكبيرة لتستطيع هذه الخلايا من تحفيز الخلايا اللمفاوية (Powell & Leon,1970 ; McClain & Edelman,1976).انتاج الخلايا البلعمية الكبيرة لعوامل تساعد على تحفيز الخلايا اللمفاوية لارتباط المشطرات على سطحها حيث تقوم هذه العوامل باجراء تحوير للمشطر المتواجد على سطح الخلايا اللمفاوية (Powell & Leon,1970) .

2- تعمل الخلايا البلعمية على تحويل عوامل المصل غير المحفزة بواسطة تحويرات كيمياوية لتصبح محفزة للخلايا اللمفاوية(Novogrodeky &Katchalski, 1971).

3.2.2 :المحورات المناعية Immunomodulators

وتتضمن المحورات المناعية زمرة غير متجانسة من المواد مثل : المضادات الحيوية، المبيدات، الفيتامينات، ايونات الفلزات والمعادن الثقيلة، بعض المركبات الكيمياوية والحيوية والذيفانات العضوية فضلا عن بعض الاحياء المجهرية مثل الفيروسات والبكتريا والمركبات المشتقة من الاحياء المجهرية اولية النواة وحقيقة النواة (Shnawa & Kadum,2004).

ويقصد بالتحوير المناعي تضخيم او تثبيط الاستجابة المناعية، الخلوية او الخلطية او الاثنين معاً عن الحد السوي للاستجابة المناعية، والمواد التي يمكنها تحقيق هذا الهدف تعرف بالمحورات المناعية. وربما يكون التحوير المناعي مرغوباً فيه كالتحوير المعتمد على المستضد في استخدام برامج التلقيح ضد العوامل الممرضة وغير المعتمدة على المستضد كما في حالة استخدام بعض الادوية في خفض المناعة كما في حالات نقل الاعضاء غير المتطابقة تماما وفي امراض المناعة الذاتية، وفي احيان اخرى يكون التحوير المناعي غير مرغوب فيه وقد يؤدي الى الهلاك كما في حالة اعطاء الادوية الخافضة للمناعة للمرضى ضعيفي المناعة او الذين يعانون من خمجات مستفحلة او ذات صفة مزمنة كما اشار اليه كل من الباحثين (Blecka & Charely ,1990 ; Studnicka *et.*

(*al.*,2000 واشـار كل مـن Flaming & Roth(1990) الى عدد من العوامل التي تعتمد لتوضيح مفهوم التحوير المناعي منها:

1. دراسة الاسس الخلوية والجزيئية الخاصة بالكبح المناعي من اجل الاستخدام الامثل للمحورات المناعية .
2. معرفة طبيعة التأثيرات الفسلجية المختلفة للمثبطات المناعية المستخدمة بصفة محورات للاستجابة المناعية .
3. معرفة آلية فعل المواد المستخدمة بوصفها محوراً للاستجابة المناعية اذ ان بعضها يعمل بصفة محور مناعي او مقوي للاستجابة المناعية وقد لا يكون لبعض المواد أي تأثير واضح عليها .
4. استخدام موديل تجريبي لدراسة التحوير المناعي وبشكل واضح لان الهدف منه تغيير الوظائف المناعية الدفاعية نحو الافضل .
5. امكانية الاستفادة من عملية التحوير المناعي في المحافظة على النواحي الصحية .
6. دراسة الاختلافات المعنوية والنوعية لاستجابة الخلايا المناعية الى المحورات المختلفة .
7. معرفة الوقت المناسب وتركيز الجرعة المؤثرة اللازمة لحدوث التحوير المناعي .
8. تختلف فعالية المحورات المناعية باختلاف طريقة استخدامها، اذ ان بعضها يكون فعالاً بشكل جيد في الزجاج *in vito* ولكن لم يلاحظ له أي نشاط في الحيوان المختبري أي في الحي *in vivo* وهذا يحدث لعدة اسباب, منها :

a-عدم استخدام التركيز المؤثر المناسب من المادة المستخدمة بصفته محوراً مناعياً داخل الجسم .

b-التوزيع غير الملائم للمحور المناعي داخل جسم الحيوان .

c-سرعة التحلل الايضي للمركب المستخدم بصفته محوراً مناعياً داخل الجسم (Berntorp & Nilsson , 1996).

هذا وقد استخدمت المحورات المناعية الفعالة في تحفيز الوظائف المناعية الطبيعية وفي معالجة السرطان ومرضى العوز المناعي (Blecka , 1988) .

وهنـاك عـدد كبـير مـن المـواد التـي لـها القابلـية على تحـفيز الاسـتجابة المناعية الخلـطية والخلوية او تقويتها مثل المساعدات المناعيـة والذيفـانات الداخلية وغيرها Fudenberg *et al.*, 1978 & Stites *et. al.*, 1994) . بينما يشمل التثبيط المناعي عددا من السبل منها تحوير الاستجابة الالتهابية واستخدام الادوية الستيرويدية واللاستيرويدية المضادة للالتهامية والذهب والمضادات للهستامين، اذ تقوم هذه المواد بتثبيط الاستجابة المناعية بواحدة او اكثر من الاليات الاتية :

1.تثبيط وظائف الخلايا الالتهابية غير المتخصصة .
2.اختزال عدد العدلات او اختزال الخلايا اللمفية .
3.تثبيط انتاج البروستاكلاندينات (Stites *et .al* ., 1994) .

2 . 4 : تنشيط الخلايا التائية ودورة الخلية في الزجاج والحي :

تطرق (Sharon, 1976) الى ان المـنشطات المختلفة وبضـمنها اللكتينات المستخلصة من نباتـات مختلفـة ولاسيما البقوليـات او مـواد بعض الاحياء المجهرية واللافقريـات مثل متعدد السكريد الشحـمي (LPS) يمكن اختبار فعاليتهـا في الزجاج وفي الحي . ولأجل معرفة الية عمل هذه المنشطات المناعية يجب وصف الخلايا اللمفاوية التائية والبائية والخلايا البلعمية الكبيرة المحفزة اعتماداً على نوع هذه المنشطات، فبعضها يعمل وبشكل اختياري على الانواع الثلاثة من الخلايا المسؤولة عن الاستجـابة المنـاعيـة في الزجاج (*in vitro*) وفي الحي (*in vivo*) كما موضح في الجدول (2 – 4).

* جدول (2 – 4): عمل المنشطات المناعية على الخلايا المقتدرة مناعياً

	B-cells		T-cells		Macrophage	
	Invivo	*in vitro*	*invivo*	*invitro*	*invivo*	*invitro*
Mineral Salts	++			+		
Con-A			++(Sup^R)	++		
Lectins						
Pokweed		++		++		
Levamisole			++		++	++
Lps*	++	++	++			++
Dextransulphate	++	++		+		
Peptidoglycans	++	++	+	+	++	
LPF**			++	++		
C. Parvum			++			+
BCG					++	
PHA			++	++		
Freund's adjuvant	++				++	

*LPS:Lipopoly Sacchewied fom Gram negative bacteria .
**LPF: Lymphocytosis Promoting Factor.
Sup^R : Suppressive.

*مأخوذ من (Aubry *et. al.* , 1979).

يظـهر هذا الجدول بعض المنشـطات المناعية التي تنـشط تلقائياً نوعيـن من الخلايا مثل (Pokweed) او ثلاث خـلايا مثل(peptidoglycan) ولـكن بعضها يظهر خصوصية مثل: BCG. اما مـادة الـ Peptidoglycans فهـي مـادة مـؤثر في الفئـران ليـس فقـط داخـل الحـي وانما في الزجاج ايضاً(cell cultur) (Werner *et. al.*,1975), وكـما هو معروف فان مـادة (Con – A) تعتبرة منشطة ولها جرعات مختلفة، فالجرعة الواطئة لها تأثير محفز والجرعة العالية لهـا تاثير مثبط وكذلك الخـلايا اللمفـاوية الطحـالية فـان تنشيطها بواسـطة LPS و LPF يكـون عند الجرعات القليلة لأن التراكيز العالية تكون غير مؤثرة (Juy & Chedid, 1975).

ولاجل معرفة النسبة المئوية للخلايا التائية التي تم تنشيطها بواسطة مستضدات او مستضدات فائقة او بواسطة مشطرات لكتينية يجب قياس مؤشرات متواجدة على سطح الخلايا اللمفاوية التائية المنشطة حديثاً، ويعتبر CD_{69} اول المؤشرات المتواجدة على سطح الخـلايا التـائية المنشـطة والتـي تظهـر بعـد سـاعتين مـن عمليـة التحفيز ; Bruno *et. al.*,1998). لذلك يتم قياس CD_{69} بعد عملية التحفيز بأربع ساعات على الرغم (Testi *et. al.*, 1989 من ان ميكانيكية تحفيز او ابادة تكوين CD_{69} مختلفة بين التحفيز بالمستضـدات او المستضدات الفائقة او المشطرات, ولكن تحفيز الخلايا التائية بواسـطة الـ PHA يكـون اكثـر من تحفـيزهـا بواسـطة المسـتضد مثـل (Tetanus toxoid) (Bruno *et. al.*, 1998 ; Mody *et. al.*, 1995)وفي جميع الاحوال فـان بعـض هـذه المنشـطـات تحفز $CD+^4$ من الخلايـا التـائية اكثـر مـن $CD+^8$ مثـل المستضدات الفـائقـة (Streptococcal erythrogenic toxin A) (Bruno *et. al.*,1998 ; Abe *et. al.*, 1991), ولكـن هنـالك مستضدات مثل (Candida

(albicans تحفز $CD+^8$ من الخلايا التائية اكثر من $CD+^4$; Bruno *et. al.*,1998 (Maino *et. al.*, 1995), بينما المشطرات مثل Con – A لاتفضل تحفيز صنيفات الخلايا التائية(Bruno *et. al.*,1998 ; Biselli *et. al.*,1992)، اما PHA فهو يحفز اظهار CD_{69} على $CD+^4$ من الخلايا التائية اكثر بمرة ونصف من $CD+^8$ من الخلايا التائية(Bruno *et. al.*,1998; Kishimoto *et. al.*,1995).

وتبدأ دورة الخلية في الزجاج والحي عند الساعة الاولى للتحفيز حيث يرتفع مستوى الاكسدة الضوئية وجميع البروتينات وعليه ترتفع عملية تخليق الـ RNA في الخلايا اللمفاوية، ويظهر الكروماتين بكثافة قليلة مع وجود جينات ساكنة وتبدأ الخلية بأحداث الانقسام,وبعد 2 – 4 ساعات فان بروتينات خاصة بعملية تنظيم تكاثر الخلية تصبح واضحة في النوية، ويبدأ مظهر الخلية بالتغير بعملية تدعى تحول الاورمات(Blast transformation) حيث يزداد قطر الخلية الى(μm 30 – 15) ويكبر حجم النواة والسايتوبلازم ويصبح كروماتين النواة قليل وشاحب اللون . وخلال 8 – 12 ساعة تبدأ الخلية اللمفية بالانقسام وتحدث عملية الانقسام الـ DNA بحوالي 18 – 24 ساعة بعد عملية التحفيز، لذلك تنتج عدة خلايا فعالة كنتيجة لكل انقسام ناضج وكامل خلال ايام قليلة, ويمكن لهذه الخلايا ان تعبر عن الوظائف المناعية بشكل نموذجي بعد عدة ايام لاحقة من التحفيز (Parslow *et. al.*,2001).

2 . 5 : آليات تنشيط الخلايا التائية :

ان مصطلح تنشيط الخلايا اللمفاوية يتضمن سلسلة من الاحداث التي تحدث للخلايا الخاملة لتحثها على الانقسام وانتاج ذرية، ويصبح بعض هذه الخلايا فعالة، فالاستجابة الكاملة تتضمن عملية تحفيز الخلايا وانقسامها(التشطير) ومن ثم تمثيل الوظائف المناعية، وتصبح الخلايا اللمفاوية فعالة عند ارتباط روابط خاصة على مستقبلات الخلايا السطحية، وهذه الروابط تختلف في الخلية اللمفاوية التائية عن الخلايا البائية ولكن الاستجابة المناعية هي نفسها في الكثير من انواع الخلايا (Parslow *et. al.*,2001).

لذلك تتطلب عملية تحفيز الخلايا التائية الخاملة وجود اشارتين لاجل التحرك منG0 الطور G1في دورة انقسام الخلية(Cell Cycle)(Roitt & Rabson, 2000) , فالاشارة الاولى لتحفيز الخلايا التائية الخاملة هي عملية ارتباط مستقبلات الخلايا التائية TCR بالمستضد المرتبط مع معقد التوافق النسيجي الصنف الثاني(MHC ClassII)على سطح الخلية المقدمة للمستضد(APC). اما الاشارة الثانية المعززة للاشارة الاولى فتتم من خلال ارتباط بروتين CD_{28} على سطح الخلية التائية مع بروتين من اسرة B_7 على سطح الخلية المقدمة للمستضد والتي تكون اما خلايا بائية او بلعمية كبيرة اوغيرها لذلك تتعاون الإشارة الناتجة عن $CD_{28} – B_7$ مع الإشارة الأولى أو TCR للبدء بعملية التنشيط (Stites *et. al.*,1994) ، لذلك تكون عملية تنشيط الخلايا التائية الخاملة هي الاستجابة الأولية للجهاز المناعي ضد البروتينات الغريبة (المستضدات)، فعندما تحفز أسطح الخلايا التائية فان تيارا من الاشارات الداخلية تقوم برفع تركيز الكالسيوم داخل الخلايا وتدعى هذه الميكانيكية بالتحفيز المعتمد على الكالسيوم (Jufri,2004) .

تبدأ اولى الاحداث في عملية التنشيط بعد ارتباط الخلايا اللمفاوية التائية او البائية بروابط هي زيادة نشاط انزيم بروتين ثايروسين- كاينيز (PTKS) في السايتوبلازم، وهذا البروتين له قابلية تحفيزفسفرة بقايا الثايروسين في بروتينات اخرى. وان عملية الارتباط هذه تتم بين الكوبيولينات المناعية السطحية على الخلايا البائية او مستقبلات الخلايا التائية مع بروتين (PTKS في السايتوبلازم, وفي انواع اخرى فان المستقبلات تتجمع على أسطح الخلايا البائية او التائية لتكون المفتاح الاول لتحفيز عملية تنشيط بروتين (PTKS)، ان ارتباط المستقبلات بـ(PTKS) يعمل على تنشيط انواع اخرى من بروتينات (PTKS)من خلال عملية الفسفرة لذلك فان (PTKS) جديدة ومختلفة سوف تطوع للاستجابة وهذا التنشيط الجديد لـ)

(PTKS يظهر بانه مسؤول بشكل مباشر او غير مباشر على انقداح كل احداث تنشيط الخلايا اللمفاوية.وان اول تاثير لتيار(PTKS) هو تنشيط انزيمات السايتوسول وهي الفسفولايبيز(phospholipase C-1) والذي يعمل على تحليل اصناف خاصة من اللبيدات الفسفورية المسماة بـ (phosphatidylinositides) المتواجدة في الغشاء الخلوي، ونتائج التحليل هذه تتضمن جزئين عضويين صغيرين هما :
{Inositol1,4,5-triphosphate(IP3) وDiacylglycerol(DAG)}, والتي تعمل كاشارة ثانية فضلا عن التغيير في فسلجة الخلية، يبقى (DAG) في الغشاء الاصل حيث يرتبط وينشط انزيم(Protein kinase C) وهو من ضمن الانزيمات السايتوبلازمية والتي تفسفر بروتينات اخرى مكونة من بقايا السيرين والثريونين، اما (IP3) فيطرح في السايتوبلازم ويرتبط مع مستقبلات غشائية متخصصة لذلك سوف تثار اشارة سريعة لزيادة تركيز ايونات الكالسيوم الحرة داخل الخلية والذي يتدفق الى السايتوبلازم من مستودعات خزن عضوية حتى تصل الى التركيز الاقصى خلال دقيقة واحدة بعد استمرار تحفيز التنشيط، ومثل تيار الـ(PTKS) فان انزيم البروتين كاينز C ينشط ويحفز جريان الكالسيوم بسرعة لبدء احداث متتالية من التنشيط (Parslow *et. al*.,2001) .

لذلك فان عملية تنشيط الخلايا اللمفاوية التائية بواسطة المشطرات تحدث تفاعلات في تلك الخلايا اللمفاوية وهي تغطية اسطح الخلايا اللمفاوية بالمستقبلات السطحية او الكلوبيولينات المناعية، زيادة تركيز الكالسيوم داخل الخلية، تنشيط مسار الاشارات، فسفرة كل الانزيمات وتنشيطها، تخليق ال RNA والبروتينات، تضاعف الـDNA واخيراً انقسام الخلاياااللمفاوية (Sakazaki *et. al*., 2001) .

2 . 6 : المحورات المناعية وتنشيط الخلايا التائية :

المحورات المناعية مجموعة من المواد المتباينة في تراكيبها الكيمياوية ومختلفة في تاثيراتها الفسلجية، فالمضادات الحيوية، والمبيدات، والفيتامينات تعمل عمل محورات مناعية عند اعطائها قبل المستضد او بعده يعني انها قد تؤدي الى تضخيم الاستجابة المناعية للمستضد او تؤدي الى خفض الاستجابة المناعية المتخصصة بالمستضد بالقياس مع الحالة عند التنبيه بالمستضد لوحده (Shnawa &Kadum,2004), وهناك اشارة من ان بعض اللكتينات النباتية تعمل عمل محورات مناعية (Wang *et. al*., 1998), هذا وقد عزل Wang وجماعته (1998) اللكتينات من بعض العراهين (Mushrooms) ووجدوا انها قد تكون معدلة للجهاز المناعي ولها فعالية مضادة للسرطان ولها فعاليات سمية، ومن هذه الانواع :
Boletus satanas , Agaricus bisporus , Grifola frondosa , Ganoderma lucidum , Flammulina velutipes , Volvariella volvacea , Tricholoma mongolicum.
حيث ان من صفات هذه اللكتينات تشطير الخلايا و تحفيز الجهاز المناعي و تثبيط تكاثر الخلايا وفعل مضاد للخلايا السرطانية وتوسيع الاوعية الدموية او تخفيف الضغط .
فبعض المحورات المناعية تكون مسؤولة جزئياً عن تثبيط الكيماويات المحدثة للسرطان (Tanaka *et. al*,. 1999، وكما هو معروف فان اللكتينات تقوم بتنشيط عملية تشطير الخلايا اللمفاوية بعد ارتباطها بمستقبلات اللكتينات المختلفة على سطوح الخلايا التائية او البائية، لذلك تمثل فعالية التشطير المرحلة الاولى من الاستجابة المناعية وهي اولى مظاهر التنشيط بالمحورات المناعية .

2 . 7 : المضامين التطبيقية لتنشيط الخلايا التائية :

تضم الملوثات البيئية انواعاً مختلفة من المنتجات الصناعية وفضلاتها وكذلك المواد التي تستخدم في علاج الامراض التي تصيب الانسان والحيوانات الداجنة والمركبات الكيمياوية

المستخدمة في مقاومة الافات الزراعية والناقلة للمسببات المرضية. ان هذا الكم الكبير من المواد الملوثة التي تنتشر بتراكيز متباينة في الهواء والماء والتربة وفي الغذاء ايضاً امست تشكل عبئاً على حياة الانسان وصحته بعد ان انتشر استعمالها وبعد ان اقدمت البشرية على تحقيق طفراتها النوعية والسريعة في شتى نواحي التقدم الحضاري، ولوحظ تاثير هذا الملوثات البيئية علىالجهاز المناعي من خلال التفاعلات الداخلية الحادثة بينها وبين الانسجة اللمفية في الانسان والحيوان بشكل يؤدي الى تغيير توازن النظام المناعي (Lefferts, 2000)، وتعد المواد الكيمياوية المتواجدة في المياه ذات تاثير سمي مناعي (Immunotoxicology) اذ تقوم هذه المواد بتشطير الخلايا اللمفاوية، وتثبيط نمو الخلايا اللمفاوية الطحالية في الفئران ويمكن تقدير ذلك من خلال استخدام Con – A) (LPS & كمشطرات خاصة للخلايا اللمفاوية التائية والبائية ومن ثم تقدير السمية على المناعة الخلطية المتوسطة في المناعة، وكذلك يمكن تقدير مستوى الـ DNA من خلال طريقة الومضان بأستخدام (Ethidium bromide) فبعض هذه الكيمياويات تثبط تشطير كلا من الخلايا اللمفاوية التائية و البائية حيث ان تثبيط الخلايا اللمفاوية تعد من التطبيقات المهمة على تقدير السمية المناعية لتلوث مياه المحيط (Sakazaki *et. al*., 2001) .

في حالات عديدة تتحول عملية التشطير الى تطفير من خلال :

1.يكون انقسام الخلايا خطرا جداً ويؤدي الى احداث التطفير اكثر مما في الخلايا الساكنة، حيث تسمح عملية انقسام الخلايا من التقرب نحو المحور الرئيسي للتطفير، لان وقت اصلاح الـDNA في انقسام الخلايا يعد قصير لذلك تميل الخلايا للتكاثر وتزداد بذلك عملية التحطيم الداخلية والخارجية عند تكاثر الخلايا (*al*., 1980 ; Ames & Gold,1990) .Tong *et.*

a-خلال عملية انقسام الخلايا فان شريطا واحدا من الـDNA يكون خالي من ازواج القواعد او الهستونات وبذلك يكون هذا الشريط حساسا جداً للتحطيم من الـDNA المزدوج الشريط.

b-ان انقسام الخلايا يساعد على تكاثر الجين داخل الخلية (Ames & Gold,1990 ; Orr- Weaver, 1986) .

c-ان انقسام الخلايا يساعد على فقدان (5 – Methyl C) في الـDNA والذي يكون نتيجة ازالة التمييز وهذا يسبب ظهور مظاهرالتشطير (Aems & Gold,1990 ; LU *et. al*., 1988 & Wilson *et. al*., 1987).

2-ان حدوث عملية التشطير بسبب عوامل داخلية اوخارجية يمكنها ان تؤدي الى حدوث حالات التسرطن من خلال :

a-ان التسمم يؤدي الى احداث ضرر بالانسجة وينتج عن تبديل تلك الانسجة انقسام للخلايا (Aems & Gold,1990 ; Farber, 1990).

b-ان الاصابات المزمنة بالبكتريا والفيروسات وغيرها تؤدي الى قتل الخلايا مؤدية بذلك الى تكاثر الخلايا بشكل سريع وهذا يساعد على حدوث عملية التسرطن (Aems & Gold,1990 ; Petruska *et. al*.,1988) .

c-تعد الهورمونات عوامل خطرة للاصابة بالسرطان عند عدد كبير من البشر مثل سرطان الثدي (Aems & Gold,1990 ; Preston – Martin *et.al*., 1990) .

لذلك تعد العوامل المؤدية الى تكاثر الخلايا مهمة ومتعددة لاصابة الانسان بالسرطان حيث ان انقسام الخلايا المحفزة في كبد الفأر من قبل مشطرات خاصة(بدون قتل الخلايا) تعد مسرطنة ضعيفة مقارنة بانقسام الخلايا بواسطة السموم(قتل الخلايا او تبديلها), لذلك هنالك خلايا تنقسم اعتيادياً اكثر من غيرها وتسيطر عليها دفاعات طبيعية، مع ان هنالك خلايا تتكاثر طبيعياً مثل الخلايا الجذعية للامعاء الدقيقة التي لاتكون بالضرورة حساسة جداً للاورام (Aems & Gold,1990 ; Iverson, 1988) .

3-ان عملية تشطير الخلايا التائية المساعدة تمكنها من انتاج المدورات اللمفاوية Lymphokines التي هي عبارة عن مواد بروتينية، وتعمل هذه المدورات على العديد من الخلايا لاحداث فعاليات معينة ومهمة في المناعة بعد انتاجها من خلايا لمفاوية متغايرة في انابيب الاختبار وفي الجسم الحي.
4-انتاج اللمفوتوكسين Lymphotoxines من الخلايا اللمفاوية المتحسسة بالملزنات النباتية مثل (PHA) وتكون هذه المواد مسؤولة عن تهديم الخلايا المستهدفة وتحطيمها بصورة مباشرة، وتلعب دور مهم في تحطيم الخلايا السرطانية .
5-انتاج الانترفيرونات Interferones المفرزة من الخلايا اللمفاوية المتحسسة بالملزنات النباتية مثل (PHA) التي لها دور كبير في التخلص من الفيروسات وفي تنظيم الاستجابة المناعية وتنشيط الخلايا الطبيعية (Tizard, 1986).
6-زرع الخلايا اللمفية في المزارع النسيجية لاجل الدراسات الوراثية (Shnawa *et. al*., 2004) .
7-معرفة نوع المحورات المناعية ذات الوسع التشطيري بكونها منشطة أي محفزة للمناعة.
8-ان عملية التشطير تتم من خلال تاثير المشطرات المناعية على الخلايا اللمفاوية التائية والبائية ونسائلها والتي تقوم (أي هذه الخلايا) بتخليق اصناف مختلفة من الكلوبيولينات المناعية التي يسهل تنقيتها وتنشيطها للاستخدامات المناعية المتعددة كما في حالة الخلايا البائية .
9-معرفة الانواع المختلفة من المشطرات المناعية بكونها تعمل على نوع حيواني واحد او اكثر من خلال الاختبارات المتعددة في الزجاج وفي الحي وهذه تخدم في دراسة المناعة التطبيقية .
10-بعد اجراء سلسلة طويلة من الاختبارات المتعددة على المشطرات اللمفاوية وجد بانها لاتعمل فقط على الخلايا اللمفاوية وانما تعمل على انواع اخرى حيث تم اكتشاف مشطرات ومحورات مناعية تعمل على الخلايا الكبدية والخلايا الرئوية كذلك الخلايا العصبية وهذا الاكتشاف مهم في الكثير من التطبيقات المناعية (Aubry *et. al* , 1979).
11-دراسات الكيمياء النسيجية للكتينات تظهر بان لكتين فاكهة جاك (JFL) ولكتين الفول السوداني (PNL) يمكن استخدامها للتشخيص التفريقي للاورام السرطانية والحميدة والخدوش القوية المؤدية لبداية السرطان في التجويف الفمي، وعنق الرحم، الثدي، امراض الحمل بالجراثيم الغذائية وامراض الدرقية. ووجد بان(JFL) يمكنه ان يستخدم كمتحسس شعاعي للاورام لتمييز الخلايا الطلائية الرجعية من الخلايا الورمية السرطانية.
(Items from Regionl Cancer Center 2004.Lectins as diagnostic tools)

2 . 8 : موديلات دراسة التحوير المناعي في الحي

صمم المتخصصون المهتمون في موضوع التحوير المناعي عدداً من السبل العلمية الدقيقة للتحقق من حصول حالة التحوير المناعي في الحيوان التجريبي ووصفوا بذلك عدداً من موديلات دراسة التحوير المناعي، كما موضح في الجدول الاتي :

اسم الموديل	المصدر
موديل الاثباط المناعي	Roth *et .al*., 1989 ,1990

* جدول (2 – 5): موديلات دراسة التحوير المناعي

موديل التحفيز المناعي	Blecka & Charely , 1990
موديل المرض المعدي	Roth & Flaming , 1990
موديل الشد	Roth & Flaming , 1990
موديل حث التحمل المناعي	Berntorp& flaming , 1990
موديل التغذية	Muneer *et .al*.,1988a,b & Montero *et .al*.,1999
موديل تفاعل ضد الهرمون	Pell & Aston, 1995
موديل كثافة التطفل ووزن الجسم	Christe *et .al*., 2000

*مأخوذة من (AL – Gebori, 2003).
وسنأخذ موديل الاثباط وموديل التحفيز المناعي بشيء من التفصيل

2 . 8 . 1 : موديل الاثباط المناعي Immuno Suppression Model

تعمل هرمونات القشرية السكرية Glucecorticoids Hormons على تثبيط استجابة الاضداد الى المستضدات المتخصصة واختزال فعالية الخلايا اللمفية في الاستجابة الى العوامل المحفزة والمشطرة Mitogens ويرتبط اختزال هذه الفعالية بانخفاض تخليق الانترليوكين – 2 (Interleukin – 2) من قبل الخلايا اللمفاوية المعاملة بالهرمونات القشريةالسكرية (Blecka & Backer, 1986) .

ويتضمن الموديل التجريبي الخاص بمركب الـ Dexamethasone استخدام اربعة مجاميع من الحيوانات تشمل كل مجموعة خمسة الى ستة حيوانات, تمثل المجموعة الاولى مجموعة السيطرة(مجموعة الحيوانات غير المعاملة بالمركب) . بينما تمثل المجموعة الثانية الحيوانات التي تم تجريعها بهذا المركب باستخدام مركب الـ Dexamethasone بتركيز 0.04ملغم / كغم، وتم حقنه في العضلة وبشكل يومي ولمدة ثلاثة الى اربعة ايام متعاقبة.

اما حيوانات المجموعة الثالثة فقد تم تجريعها بمادة الانترفيرون-كاما البقري كمادة محورة للاستجابة المناعية وتمثل المجموعة الرابعة الحيوانات التي تم تجريعها بمركب الـDexamethasone والمادة المحورة للاستجابة المناعية .

اذ تم اعطاء الحيوانات مادة الانترفيرون البقري قبل اعطاء الجرعة الاولى او بعدها من مركب Dexamethasone ويساعد هذا الموديل على معرفة درجة تثبيط الوظائف المناعية المستحثة بوساطة مركب الـDexamethasone عند المقارنة مع مجموعة السيطرة حيث تعتمد درجة التثبيط المناعي على كمية الجرعة المستخدمة وطريقة التمنيع فضلا عن ملاحظة تغير الوظائف المناعية في الحيوانات الطبيعية غير المثبطة مناعياً والمستحثة بوساطة المحور المناعي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة (Roth *et. al*., 1989 ,1990) .

2 . 8 . 2 : موديل التحفيزالمناعي (Immunostimulation Model)

يعد عقار الليفاميزول Levamisole مركبا كيمياويا معروفا ذا تاثير محور للاستجابة المناعية، وينتمي هذا المركب الى مجموعة مركبات Phenylimidathiazole المضادة للديدان ذات التاثير المحور لوظيفة الخلايا البلعمية الكبيرة والخلايا التائية ويعتمد هذا التاثير على المجموعة المستخدمة ووقت التمنيع المرتبط بالحالة المزمنة او بالحالة النفسية فضلا عن ارتباطه بالمكونات المناعية للمضيف. ويعمل مركب الـ

Levamisole على تحفيز الوظائف المناعية في الخلايا الضعيفة ايضا اذ يعمل هذا المركب على تحفيز خلايا الذاكرة التائية في الخنازير بالاعتماد على الملاحظات الناتجة من تكرار المعاملة بهذا العقار والتي بينت انه لايؤثر على الاستجابة المناعية الاولية ولكنه يعمل على تحفيز الاستجابة المناعية الثانوية بزيادة مستويات عيار الكلوبيولين المناعي صنف(IgG) بدون اعطاء جرعة ثانية من اللقاح الى الخنازيرالمعاملة , Blecha & Charley) (1990 ، ولوحظ في دراسة اخرى ان الاسخدام المستمر لعقار Levamisole (بتركيز – 2 5 ملغم/كغم) يسبب تحفيز اللزائن الدموية النباتية لخلايا الدم المحيطية في الدجاج (Confer & Adldinger, 1981), بينما لوحظ ان استخدام الـ (Levamisole) (بتركيز 2.5 ملغم / كغم) يسبب زيادة الاستجابة الضدية للامراض الفايروسية من خلال الزيادة المعنوية الحاصلة في عيار الاضداد بعد ستة اسابيع من اعطاء هذا العقار في الدجاج (Sulochana *et. al*., 1984) .

2 . 9 : موديل اختبار الجلد بالملزن الدموي النباتي ودراسة تنشيط الخلايا التائية:

تتوسط الخلايا اللمفاوية التائية المناعة الخلوية وتوفر وقاية فعالة تجاه مستويات واسعة من الامراض التي تشمل الكائنات داخل الخلايا وكذلك تجاه الخلايا التي تعاني تغيرات ورمية . لذلك تتعرض الطيور في الحياة البرية الى مختلف عوامل الاصابة، وهنا تستدعي الحاجة لتدخل الجهاز المناعي، حيث تحدث تغيرات وتحويرات في الوظائف المناعية ,Smits) (2001 .

كما تقوم الطفيليات باختيار مباشر وقوي لاصناف المضائف التي تكون اكثر اجتماعية, حيث ان المضائف الاجتماعية تظهر لها القدرة في عملية التصدي للطفيليات عن طريق كفاءة الجهاز المناعي اكثر من الاصناف غير الاجتماعية (Christe *et. al*.,2000b ; Moller & Erritzoe, 1996)، وتكون كفاءة الجهاز المناعي واضحة وواقعة تحت السيطرة الوراثية والبيئية، فمثلاً نقصان الحالة التغذوية تؤثر بشكل سلبي على تطور الاعضاءالخاصة بالاستجابة المناعية (Christe *et. al*.,2000b ; Moller *et. al*., 1998) وتقلل مستوى وظائف الخلايا المتوسطة في المناعة (Christe *et. al*.,2000b ; Gershwin *et. al* ., 1985 ; Lochmiller *et. al* ; 1993) وباستخدام اختبارات التربية العرضية تدرس الاختلافات البيئية والوراثية للاستجابة المناعية والمظاهر الخاصة باصناف الطيور ذات المستعمرات الكبيرة مثل سنونو المنزل (*Delichon urbica*)، وهنالك اهتمام خاص حول الغزو الحاصل لاعشاش سنونو المنزل من قبل الطفيليات الماصة للدم مثل بق سنونو المنزل Oeciaeus) (hirundinis وذلك من خلال رش الاعشاش بمبيدات ضعيفة او بواسطة حقن هذه الطيور اصطناعياً بذلك الطفيلي حيث ان عملية التطفل هذه لها تاثير معنوي على طول الساق (الكاحل) وعلى استجابة الخلايا اللمفاوية التائية وتركيز الكلوبيولين المناعي وكذلك تركيز الخلايا الدموية البيضاء (Christe *et. al*., 2001).

لذلك يجب اولاً تحديد الاختلافات البيئية والاختلافات في المكونات الوراثية وتاثيرها على الاستجابة المناعية والسمات المظهرية للمجتمعات التي تحوي اصنافا متعددة من مستعمرات الطيور مثل سنونو المنزل. و يجب ثانياً يجب تدوين الاختلافات المظهرية ومعامل الاضافات الوراثية التي تؤدي الى اختلاف الصفات (Christe *et. al*.,2000b ; De Lope *et. al*., 1998 ; Moller *et. al* ., 1994)لذلك يمكن الفصل بين العوامل البيئية والوراثية .

لقد وجدت براهين على ان التاثير البيئي القوي يكون على كتلة جسم الافراخ الصغيرة وعلى حالة الجسم، طول الجناح، طول الساق (الكاحل)، وهنالك براهين تدل على مدى

الاختلافات المعنوية للاضافات الوراثية على طول الجناح، ووجد بان الاختلافات البيئية معنوية وليس هنالك اختلافات وراثية معنوية على مستويات الاستجابة المناعية مثل استجابة الخلايا اللمفاوية التائية للكتينات التلازن الدموي النباتي، وعلى الكلوبيولين المناعي، والاعداد المطلقة لكريات الدم البيض، لذلك تكون الاختلافات البيئية عادة اكبر من الاختلافات الوراثية المضافة، وتظهر القليل من السمات المظهرية الوراثية التي تكون نتيجة الاختلافات البيئية الكبيرة فضلا عن اختلافات قليلة للاضافات الوراثية .

ان اكبر اصناف الطيور الاجتماعية هي سنونو المنزل التي تكون مختارة من قبل الطفيليات وتمتلك استجابة محدودة للتطور الدقيق المباشر لهذا الاختيار وذلك بسبب التورث القليل، وكذلك لها استجابة محدودة للاستجابة المناعية الطويلة لهذا الاختيار بسبب النشوء التطوري الذي يكون مؤشرا لكفاءة الاضافات الوراثية الصغيرة القليلة (Christe *et. al.*,2001).

من هنا لابد من قياس واحد يشكل اهم مكونات الكفاءة المناعية ، حيث تقاس شدة استجابة الخلايا اللمفاوية التائية في الحي، وذلك بحقن الفراخ الصغيرة التي تكون بعمر 15 يوما بالملزن الدموي النباتي (PHA) الممزوج مع محلول دارئ الفوسفات الفسلجي PBS) (في وسط صفيحة الجناح (الجناح الخارجي الشبيه بالخفاش)، حيث ان للـ(PHA) تاثيرا مشطرا على الخلايا اللمفاوية التائية وهذا الحقن سوف يحفز على عملية ترشيح البلعمية الكبيرة وعلى كثافة الخلايا اللمفاوية المتكدسة في الاوعية الدموية (Christe *et. al.*, 2000a,b ; Stadecker *et .al.*, 1977 ; Mc Corkle *et .al.*,1980) ويتم في الجناح الثاني حقن الكمية نفسها من محلول دارئ الفوسفات الفسلجي (PBS) الذي يعتبره كسيطرة، وبعد مرور 24 ساعة يقاس تثخن صفيحة الجناح في المنطقة المحقونة، بواسطة مسطرة قياس مرقمة بحدود (0.01mm) . ان التغير في تثخن الجناح المحقون بـ(PHA) منقوص منه التغير بجناح السيطرة يستخدم كمقياس للكفاءة المناعية، حيث ان استجابة الـ(PHA) المحقونة تظهر كمؤشر على واحدة من مكونات الكفاءة المناعية ; (Christe *et. al.*,2000b Lochmiller *et. al.*, 1993)، كل القيم المحسوبة يتم قياسها لثلاث مكررات بعدها يتم اخذ المعدلات وتستخدم هذه القيم للقياس (Christe *et. al.*, 2001).

المواد وطرق العمل Materials and Methods

1. 3 :المحاليل المستعملة : Solutions

1.1.3 : المحلول الملحي (الوظيفي)

Normal saline 0.85 %

حضر هذا المحلول بإذابة (0.85 غم) من مادة كلوريد الصوديوم , شركة BDH (الوزن الجزيئي 54.44) في كمية قليلة من الماء المقطر ومن ثم إكمال الحجم النهائي إلى (100 مل) من المحلول في جهاز المؤصدة بدرجة حرارة (121)° م وضغط (15) بار لمدة (15) دقيقة , استخدم هذا المحلول في تحضير المحلول الملحي الفورمالييني (Formal saline) وفي إجراء الإختبارات اللاحقة(Garvey *et. al.*, 1977) .

2.1.3 : المحلول الملحي الفورمالييني (0.5 %)

Formal normal saline

حضّر هذا المحلول بإضافة **(0.5 مل)** من الفورمالديهايد (H-CHO) شركة BDH (الوزن الجزيئي 30.03) إلى (99.5) مل من المحلول الملحي الوظيفي ليصبح التركيز النهائي للفورمالين في هذا المحلول (0.5 %) , حيث أستخدم المحلول لغرض منع نمو الأحياء المجهرية في المستخلصات النباتية المحضرة (Kwapinski, 1972) .

3.1.3 : محلول كبريتات الأمونيوم (40 %)

Ammonium sulfate solution

حضر هذا المحلول بإذابة (40 غم) من مادة كبريتات الأمونيوم { $(NH_4)_2SO_4$ } شركة BDH (الوزن الجزيئي 132.13) في كمية قليلة من الماء المقطر وإكمال الحجم النهائي إلى (100 مل) في قنينة حجمية . أستعمل هذا المحلول لغرض ترسيب البروتينات في المستخلصات النباتية المستعملة (Johnston & Thorpe, 1982) .

4.1.3 : محلول ألسيفر

Alsever's solution

حضر هذا المحلول بإذابة (20.50 غم) من الكلوكوز شركة BDH , و (8 غم) من مادة سترات الصديوم / شركة TAAB, و (0.55 غم) من مادة حامض الستريك , و (4.20 غم) من كلوريد الصوديوم / شركة BDH , في لتر واحد من الماء المقطر , وضع المحلول في جهاز المؤصدة حيث يكون الأس الهيدروجيني(6.1) استعمل هذا المحلول لمنع تجلط عينات دم الخراف وحفظها لمدة طويلة نسبياً **(** Garvey *et al., 1977* **).**

5.1.3 : محلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي

Phosphate buffer saline (P.B.S.) حضّر

هذا المحلول بإذابة (21.5 غم) من مادة فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم (Na_2HPO_4) شركة BDH – (الوزن الجزيئي 148), و (20.4 غم) من مادة فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) شركة BDH – (الوزن الجزيئي 116) , و (8.8 غم) من مادة كلوريد البوتاسيوم (KCl) شركة BDH (الوزن الجزيئي 54) , في كمية قليلة من الماء المقطر , و إكمل الحجم النهائي الى لتر بإضافة الماء المقطر. وعدّل الأس الهيدروجيني إلى (7.2) بواسطة حامض (HCl) بتركيز (0.1 %) تم تعقيم المحلول بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة (121)^0 م وضغط (15) بار ولمدة (15) دقيقة .أستخدم هذا المحلول في تحضير المستخلص النباتي والفحوصات اللاحقة للمحافظة على المحاليل بدرجة أسية متعادلة (Garvey *et. al.*, 1977) .

6.1.3 محلول الكولجسين

Cholechesin solution

حضر هذا المحلول من إذابة حبة واحدة تحتوي على (0.5 غم) من المادة الفعالة (الكولجسين) في (2.5) من المحلول الملحي الفسلجي , ثم نبذ المحلول بالمنبذ بسرعة (2000) دورة بالدقيقة ولمدة دقيقة ونصف , واحتفظ بالعالق بعد إزالة الراسب . إستعمل هذا المحلول لزيادة وضوحية رؤية الخلايا الدموية وكذلك لإيقاف تسلسل إنقسام الخلايا اللمفاوية عند أطوارها المتواجدة فيها (حسن,2002) .

7.1.3 : محلول الألبومين وتخافيفه القياسية

Standard albumin solutions

حضر هذا المحلول بإذابة (60 غم) من الألبومين البقري في كمية قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.6 عياري) وأكمل الحجم النهائي إلى(1لتر) باستعمال المحلول نفسه ليكون التركيز النهائي للألبومين (60 غم / لتر) , ومن هذا المحلول تم تحضير التخافيف القياسية(1:1 , 2:1 , 4:1 , 8:1 , 16:1 , 32:1 , 64:1 , 128:1) غم / لتر على التوالي والتي تمثل التراكيز (60 , 30 , 15 , 7.5 , 5.75 , 1.875 , 0.9875 , 0.46875) غم / لتر على التوالي , خفف باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.6 عياري) جرى إستعمال هذه المحاليل لغرض تحضير المنحني القياسي (Standard curve) لمعرفة تركيز البروتين الكلي للمستخلصات النباتية قيد الدراسة أو البحث (Bishop *et. al.*, 1985) .

2.3: الكواشف المستخدمة :

1.2.3 : محلول البايوريت

Biuret solution

حضر هذا المحلول بإذابة (3 غم) من مادة كبريتات النحاس ($CuSO_4.5H_2O$) شركة BDH – (الوزن الجزيئي 249.5) , في نصف لتر من الماء المقطر , وتم إضافة (9 غم) من مادة ترترات الصوديوم والبوتاسيوم ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) شركة BDH – (الوزن الجزيئي 166), وتم إضافة (5 غم) من مادة البوتاسيوم – شركة Evans , وبعد إذابة هذه المكونات الثلاثة أضيف (100 مل) من محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) شركة BDH – (0.6 عياري) , وتم إكمال الحجم النهائي إلى لتر بإضافة الماء المقطر . وقد أستعمل هذا المحلول لغرض قياس تركيز البروتين الكلي في المستخلصات النباتية المستعملة (Bishop *et. al.*, 1985) .

3.3 : الأصباغ المستعملة : Stains

1.3.3 : صبغة كمزا

Giemsa stain

حضر محلول الخزين بإذابة (2 غم) من مسحوق صبغة كمزا – شركة BDH في (100 مل) من كحول الميثانول المطلق في قنينة معتمة , ومزج جيداً بواسطة جهاز المحراك المغناطيسي Magnetic stirrer لمدة ساعتين على الأقل مع التسخين بدرجة حرارة (40)^0 م وترك لمدة يومين ليرشح بعدها بورق الترشيح , ثم حفظت في قنينة معتمة محكمة الغلق , وعند صبغ الشرائح الزجاجية خففت الصبغة آنياً بمزج (1 مل) من المحلول الخزين لصبغة كمزا مع سائل محلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي في أنبوبة اختبار .

2.3.3 : صبغة كرام

Gram stain

حضرت هذه الصبغة بإضافة صبغة البنفسج البلوري وصبغة اليود Iodine والكحول الأثيلي وصبغة السفرانين , واستخدمت هذه الصبغة لصبغ السلالة بعد تنميتها لملاحظة شكل الخلايا ولونها ولاستبعاد التلوث (Garvey *et al.*, 1977) .

4.3 : المواد المحورة للمناعة: Immunomodulant materials

1.4.3 : محلول المضاد الحيوي الريفادين

Rifadin antibiotic solution

حضر هذا المحلول بإذابة كبسولة واحدة ذات وزن (300 ملي غرام) من الريفادين – شركة S.D.I. Iraq – في كمية قليلة من المحلول الملحي الفسلجي , وإكمال الحجم النهائي للريفادين (100 ملغم / مل) , وهذا التركيز يمثل التركيز الخزين Stock concentration .

أستعمل هذا المحلول لمعرفة التأثير السلبي أو الإيجابي على الجهاز المناعي للفراخ عند مقارنته مع محاليل السيطرة المستخدمة , مثل متعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide) والملزن الدموي النباتي (Phytohaemagglutination) .

2.4.3 : مشتق البروتين المنقى (تيوبركلين)

Purified protein derivatives (P.P.D.)

استخدمت هذه المادة المجهزة من معهد المصول واللقاحات بتركيز (10 وحدة دولية) والذي اعتبر التركيز الخزين , حيث حضرت عدة تراكيز مختلفة منه . استخدم هذا المحلول لمعرفة إستجابة الجهاز المناعي للفراخ له , عند مقارنته مع محاليل السيطرة المستخدمة .

3.4.3 : المحلول الملزن الدموي النباتي

Phytohaemagglutination solution (P.H.A.)

جهزت مادة الملزن الدموي النباتي (PHA) من قبل المركز العراقي لأبحاث السرطان والوراثة الطبية بتركيز (10 %) ملي غرام, والذي حضرت عدة تراكيز منه وقد استخدمت هذه المادة باعتبارها قرينة سيطرة للأنواع اللكتينية المستخدمة .

5.3 : الأوساط الزراعية المستخدمة Culture media

1.5.3 : وسط نقيع القلب والدماغ

Brain heart infusion medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات شركة (LAB Medium) المنتجة له بأخذ (35 غم) من مادة الوسط وإذابتها في لتر واحد من الماء المقطر, خلط المزيج لمدة (10دقائق) مع التسخين الخفيف لإذابته , ثم وزع الوسط على الأنابيب وتم تعقيمه بجهاز المؤصدة بدرجة (121)^0 م وضغط (15 بار) ولمدة (15 دقيقة) .

2.5.3 : وسط القلب والدماغ الصلب

Brain heart agar medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات شركة(Himedia) المنتجة له باخذ 53 غرام من مادة الوسط واذابته في لتر واحد من الماء المقطر. مزج جيدا ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 بار ولمدة 15 دقيقة .

6.3 : تحضير متعدد السكريد الشحمي من البكتريا السالبة لصبغة كرام :

Preparation of lipopolysaccharide from gram negative bacteria

1.6.3 : تنمية البكتريا السالبة لصبغة كرام

استخدمت بكتريا *Vibrio metschnikovii* (المركز التشيكي للسلالات القياسية) من سلالة مجفتة ومحفوظة , وكالاتي :

1. حضرت كمية من وسط نقيع القلب والدماغ Brain-heart infusion المعقم وتم توزيعه على خمسة أنابيب إختبار معقمة .
2. سحب مقدار (1 مل) من إحدى الأنابيب وإضافتها إلى الأنبوبة الحاوية على السلالة المجفتة , ومزجت جيداً .
3. سحب مقدار (1 مل) من العالق المتكون , وأضيف إلى الأنبوبة الثانية الحاوية على الوسط المغذي للسائل .
4. عملت سلسلة تخافيف على الأنابيب المتبقية بسحب (1 مل) من محتوى الأنبوبة الثانية وأضيف إلى الأنبوبة الثالثة , ثم من الأنبوبة الثالثة إلى الرابعة , ثم تم سحب (1 مل) من الأنبوبة الرابعة و إهماله .
5. حضنت الأنبوبة الأولى الحاوية على النمو في الحاضنة بدرجة (37)^0 م , وحفظت باقي الأنابيب في درجة التجميد .
6. ان لم يظهر نمو بعد مرور يوم , تستخرج الأنابيب المحفوظة بالتجميد ووضعها في الحاضنة بدرجة (37)^0 م تباعاً حتى يظهر النمو .

2.6.3 : تحضير وزن جاف من البكتريا السالبة لصبغة كرام :

Preparation of dry weight of bacteria

حضر وزن جاف من البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي تم تنميتها حسب الفقرة 1.6.2 كالآتي :

1. حضرت كمية من وسط نقيع القلب والدماغ وقدرها (3 لتر) موزعة على ستة دوارق مخروطية Conical flasks سعة لتر واحد وبمقدار نصف لتر في كل دورق زجاجي وعقمت في جهاز المؤصدة Autoclave بدرجة(121)^{0}م وضغط (15 بار) ولمدة (15 دقيقة) .
2. لقحت الأوساط الزرعية المحضرة بواسطة البكتريا النامية على وسط القلب والدماغ الصلب بأخذ عدد متساوي من المستعمرات ووضعها في كل دورق .
3. وضعت الدوارق المخروطية في حاضنة هزازة بمعدل اهتزاز (100 هزة / دقيقة) ودرجة حرارة (37)^0 م , لمدة ليلة كاملة .
4. بعد استخراج الدوارق من الحاضنة , وزعت محتوياتها الحاوية على النمو البكتيري داخل عبوات خاصة سعة (250 مل) معقمة , ثم وضعت في جهاز المنبذ , ونبذ المحلول بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
5. سكب الراشح وجمع الراسب والذي هو عبارة عن بكتيريا مترسبة في عبوة نظيفة معقمة , ثم غسلت بالماء المقطر ونبذت بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
6. سكب الراشح وغسل الراسب من البكتريا بالكحول الأثيلي المطلق (99%) ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .

7. سكب الراشح وغسل الراسب من البكتريا بالاسيتون المطلق ومزج جيداً ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
8. سكب الراشح وغسلت البكتريا المترسبة بالإيثر المطلق ومزج جيداً ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة , ثم كررت هذه الخطوة مرة أخرى .
9. سكب الراشح وجمعت البكتريا المترسبة في أنبوبة اختبار وحضنت بالحاضنة بدرجة (37)^0 م من أجل تجفيفها لمدة ليلة واحدة (Kwapinski, 1972).

3.6.3 : إستخلاص متعدد السكريد الشحمي بطريقة وستفالز:

Extraction of lipoplysaccharide by Westphal's method

وصفت طريقة تحضير متعدد السكريد الشحمي من قبل وستفالز وجماعته عام 1952 (Westphal's *et. al.*, 1952 cited by Kwapinski, 1972) وهي كالآتي :

1. اخذ (1 غم) من الوزن الجاف للبكتريا ووضع في دورق زجاجي نظيف ومعقم , وعلّق بـ (10 مل) من الماء المقطر ومزج جيداً .
2. مزج العالق البكتيري مع (26.5 مل) من الفينول المحضر آنياً بتركيز (75 %) بأخذ (37.5 مل) من الفينول البلوري بعد أذابته بالحمام المائي بدرجة (60)^0 م , ثم أضيف إليه (12.5 مل) من الماء المقطر .
3. وضع المزيج في الثلاجة بدرجة (3 – 5)^0 م ولمدة نصف ساعة مع الرج المستمر بين الحين والآخر .
4. أخذ المزيج وسكبه في أنابيب الطرد المركزي ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (3000-4000) دورة بالدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
5. لوحظ تكون ثلاث طبقات هي : الطبقة المائية للأعلى ثم طبقة الفينول تليها طبقة الراسب على التوالي .
6. جمعت الطبقة المائية العليا من جميع الأنابيب في دورق زجاجي نظيف ومعقم , ثم أضيفت كمية من الماء المقطر إلى الباقي في الأنابيب بعد سحب الطبقة المائية , مزج جيداً ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (3000-4000) دورة بالدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
7. جمعت الطبقة المائية العليا من جميع الأنابيب ودمجها مع ما تم جمعه مسبقاً .
8. وضع الرائق الذي تم الحصول عليه في كيس الديلزة وعومل مع الماء العادي لمدة يومين , ثم مع الماء المقطر لمدة يوم واحد .
9. جمع السائل داخل كيس الديلزة والذي كان حاوياً على متعدد السكريد الشحمي (حجم السائل المجموع يساوي 40-50 % من حجم السائل الأصلي في بداية التجربة) .
10. اضيف الكحول الأثيلي المركز بحجم يساوي ستة أضعاف سائل الديلزة .
11. أخذت كمية من الكحول الأثيلي المطلق (99 %) في وعاء زجاجي نظيف وشبع بمادة أستيت الصوديوم Sodium acetate , ثم سكب فوق الخليط المكون من سائل الديلزة والكحول الأثيلي المطلق .

12. لوحظ تكون راسب أبيض أسفل الوعاء الزجاجي ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (2500) دورة بالدقيقة ولمدة (10) دقائق للحصول على أكبر كمية من الراسب والذي هو عبارة عن متعدد السكريد الشحمي غير النقي .
13. يوضع الراسب في الحاضنة بدرجة (37)^0 م لمدة ليلة واحدة للحصول على وزن جاف من متعدد السكريد الشحمي .

7.3 : بذور النباتات : Plant seeds

في هذا البحث تم إستعمال بذور جافة لنباتات محلية زرعت في القطر والتي تنتمي جميعها إلى العائلة القرعية , وفيما يأتي جدول بأسماء النباتات العربية وأسمائها الشائعة والعلمية بحسب تصنيف(ينايوس):

جدول(3-1): اسماء النباتات العربية واسمائها الشائعة والعلمية

الإسم القرعي للنبات	الإسم العلمي	الإسم الشائع	إسم العائلة
بطيخ	*Cucium melo*	Sweet melon Musk melon	Cueurbitaceae
رقي	*Citrullus vulgaris*	Water melon	Cueurbitaceae
حنظل	*Citrullus colocynthus*	Better apple	Cueurbitaceae
خيار الماء	*Cucumis sativus*	Cocumber Gherkin	Cueurbitaceae
خيار تعروزي	*Cucumis melovar*	Flexuons	Cueurbitaceae
قرع التزيين	*Cucurbita Sieeria*	Lagnaria Vulgaris	Cueurbitaceae
قرع خضري	*Cucurbita pepo*	Vegetable marrow	Cueurbitaceae
اليقطين	*Cucurbita grosses*	Gourd	Cueurbitaceae

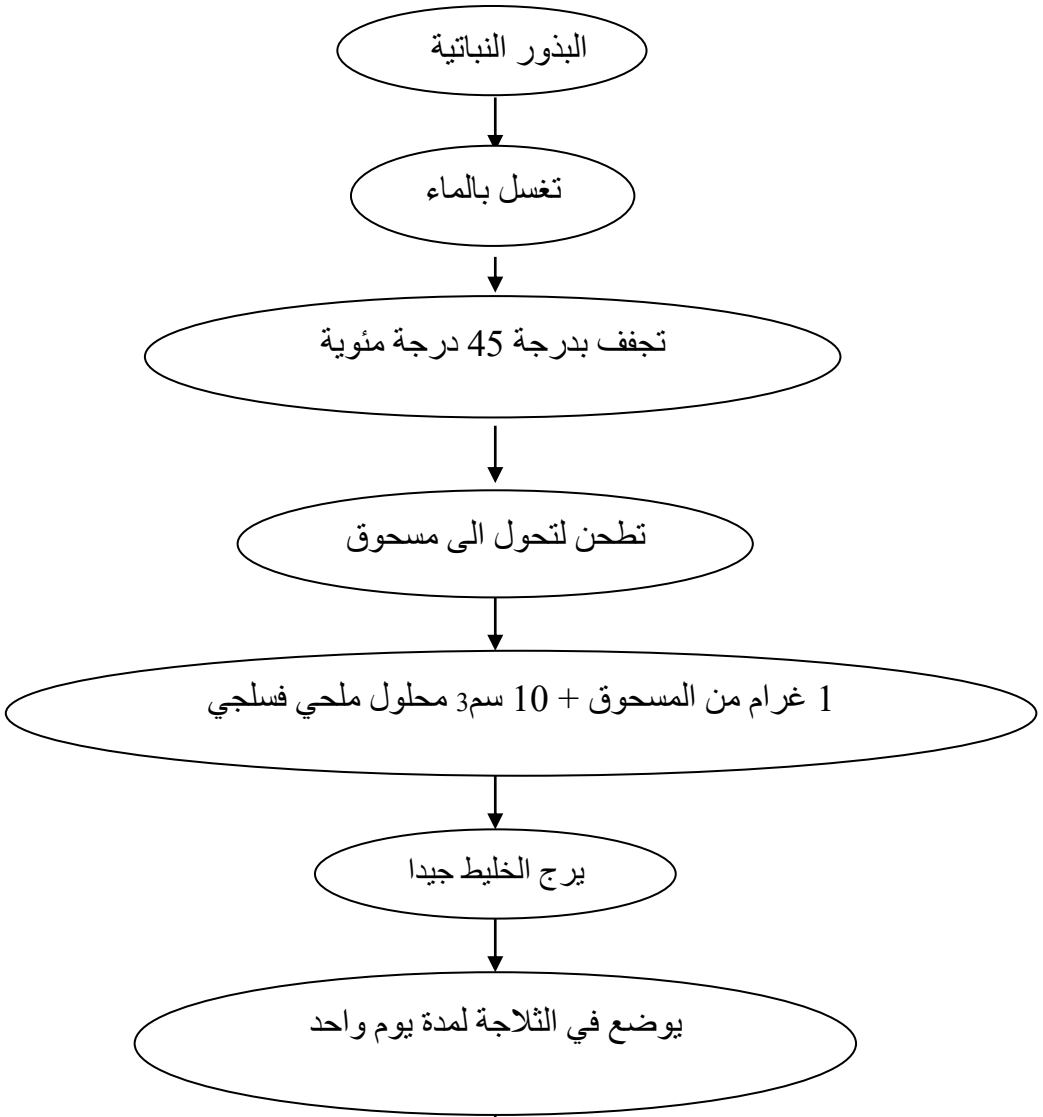
8.3 : فصل المحاليل اللكتينية من بذور النباتات :

Isolation of lectin solutions from plant seeds

أستعملت طريقة (Shnawa *et. al.*, 2004) في عملية فصل المحاليل اللكتينية , والتي يمكن إيجازها فيما يأتي :

1. قشرت البذور النباتية للتخلص من الغلاف الخارجي .
2. غسلت البذور بالماء جيداً ثم وضعت في طبق زجاجي على ورقة ترشيح نظيفة , ثم وضع الطبق في الفرن بدرجة حرارية لا تزيد عن (45) ^{0} م ولمدة ساعة واحدة .
3. طحنت البذور بعد التجفيف يدوياً باستعمال الهاون الخزفي (Morter) للحصول على قطع صغيرة ثم استخدمت المطحنة الكهربائية (Coffee miller) للحصول على مسحوق ناعم.
4. أخذ غرام واحد من المسحوق ووضع في أنبوبة اختبار وأضيف إليه(10 مل) من محلول دارئ الفوسفات الفسلجي .

5. رجت الأنبوبة جيدا باستخدام جهاز الرج الكهربائي (Vortex) ووضعت الأنبوبة في الثلاجة بدرجة (4)^0 م لمدة يوم واحد .
6. وضعت الأنبوبة في جهاز المنبذ ونبذ المحلول بسرعة (4000) دورة في الدقيقة لمدة (10) دقائق عندها اهمل الراسب واعتمد الراشح.
7. أخذ (5 مل) من الراشح ووضع في أنبوبة أخرى ثم أضيف إليه حجم مساو من محلول سلفات الأمونيوم بتركيز (40 %).
8. وضعت الأنبوبة في الثلاجة بدرجة (4)^0 م لمدة ساعة واحدة , ثم وضعت في جهاز المنبذ ونبذ المحلول بسرعة (7000) دورة في الدقيقة لمدة (45) دقيقة .
9. أهمل الراشح وأذيب الراسب في (0.5 مل) من المحلول الفورمالينى الفسلجي بتركيز (0.5 %) وحفظ بدرجة التجميد .



شكل(3-1): مخطط يبين طريقة فصل اللكتينات (شناوة وجماعته ، 2004).

9.3 : وصف اللكتينات: Lectins characterization

1.9.3 : تقدير تركيز البروتين الكلي في المستخلصات النباتية
Total protein estimation of plant extracts

استخدمت طريقة البايوريت لقياس تركيز البروتين الكلي (Bishop *et. al.*, 1985) , وتتضمن هذه الطريقة الخطوات الاتية :

1. وضع (4.8 مل) من محلول البايوريت في أنبوبة زجاجية خاصة بجهاز المطياف (Spectronic 21) .
2. أضيف إليه حجم (0.2 مل) من المستخلص النباتي المحضر مسبقاً , وهذه الأنبوبة تمثل أنبوبة الفحص .
3. أضيف (0.2 مل) من المحلول الفسلجي إلى أنبوبة أخرى تحتوي على (4.8 مل) من محلول البايوريت لغرض تصفير الجهاز (أنبوبة السيطرة) .
4. خلطت الأنابيب جيداً وتركت في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة بعيداً عن الضوء , ثم قرأت الكثافة الضوئية لأنبوبة الفحص بعد تصفير الجهاز عند طول موجي مقداره (540 نانوميتر) في جهاز المطياف الضوئي (Spectronic 21) .
5. استعملت المعادلة الرياضية التالية :

$$Y' = -0.67 + 168.9\ xi$$

لحساب البروتين الكلي , حيث أن :

Y^ = تركيز البروتين الكلي بوحدة ملغم / لتر .

X = الامتصاصية .

1.9.3 : دراسة المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين :

في تجربة لبناء المنحني القياسي لتقدير البروتين أستعمل بروتين قياسي هو الألبومين البقري بتركيز (60 غم / لتر) , وحضرت سلسلة تخافيف منه , وجرى تقدير الكثافة الضوئية لكل تخفيف في سلسلة التخافيف بطريقة تفاعل البايوريت ولخمس مكررات . وباستعمال تحليل الإنحدار الخطي البسيط أحتسبت القيمة المقدرة للتركيز وحددت معادلة الخط المستقيم البسيطة وكانت معادلة من الدرجة الأولى للعلاقة بين قيمة الكثافة المطيافية (X) والتركيز (Y) .

ولقد أستعمل محلول البايوريت لتوفر مواده الأولية وعدم الحاجة فيها إلى أجهزة قياس معقدة,علماً أنه قرى بطول موجي (540 نانوميتر). جدول(1-2) شكل (2-2) , وهذا يتفق مع باحثين كثيرين (Bishop *et al.*, 1985) المعادلة المستعملة :

$$\mathbf{Y' = b\, x_i + a}$$

إذ أن :

(Y') تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحنى القياسي لتقدير كمية البروتين الكلي للمستخلصات النباتية قيد البحث .

(x) الكثافة النوعية .

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

(b) تمثل عامل الانحدار , ويحسب من المعادلة الأولية :

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

SXY تمثل مجموع مربعات الإنحراف لقيم X/Y .

SXX تمثل مجموع مربعات الإنحراف لقيم X (Dawed & Al-Yas, 1990) .

وتحسب **(a)** من المعادلة الآتية :

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

($\bar{y}$) الوسط الحسابي للتركيز .

($\bar{x}$) الوسط الحسابي للكثافة الضوئية .

ويحسب عامل الارتباط بوساطة المعادلة الآتية :

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

جدول (2-3) البيانات والمعالم الإحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي لتركيز محلول الألبومين والتخافيف القياسية :

X_1	Y_1	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	0.5	0.3225	0.001849	650.25
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

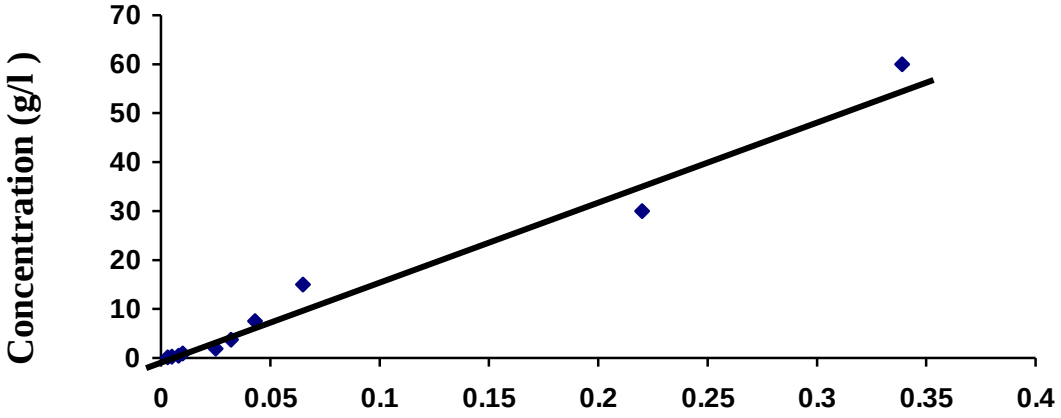
$$\mathbf{r} = \frac{\sum xy - \left(\sum x \frac{\sum y}{n}\right)}{\sum x^2 \left[-\frac{(\sum x)^2}{n}\right] \sum y^2 - \left[\frac{(\sum y)^2}{n}\right]} = \frac{\mathbf{19.427925}}{\mathbf{0.114971}}$$

b = 168.9
a = $bx^- + y^-$
a = 12.6675 + 11.9881 = 0.67
y = bx + a
y = 168.9 X_1 – 0.67 – Z_1

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

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

r = 0.988



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

- **Best Fitting Point**
- **Actual Point**

2.9.3 : تحديد الإستقطاب بالكاربوهيدرات:

لأجل معرفة زاوية الدوران النوعي الموجودة في المستخلص النباتي الذي تم تحضيره , يستخدم جهاز (Polarymetry) وكالآتي :

1. صفر الجهاز المستخدم بمادة المحلول الفورماليني الوظيفي الذي تم وضعه في أنبوبة الجهاز الخاصة للقياس .
2. حضر تركيز مخفف من كل مستخلص نباتي وذلك بإضافة (50) مايكرولتر منه إلى (10 مل) من مادة المحلول الفورماليني الوظيفي .
3. أضيفت جميع المستخلصات النباتية المحضرة في أنبوبة الجهاز الخاص بالقياس تباعاً , مع ملاحظة تجنب تكوين فقاعة هوائية داخل الأنبوبة .
4. قرئت زاوية الانقلاب والتي أعتمدت على تساوي الشدة الضوئية بين الإنقلابين المتكونين بين النصفين المظلم والمضئ , وسجلت النتيجة .
5. إستخدم القانون الاتي :

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

حيث أن :

(c) تركيز المستخلص النباتي غم / 100 مل .

$[\alpha]_D^T$ زاوية الدوران النوعي .

(a) مقدار الزاوية المقروءة .

(L) طول الأنبوبة الخاصة بالقياس (بالسنتمتر) .

من خلال تطبيق القانون أتضح بأنه يجب معرفة تركيز المستخلص النباتي , وقياسه الذي تم عن طريق إستخدام جهاز قياس معامل الإنكسار (Refrectometer) وكالآتـي :

1-حضر أولاً منحني قياس لسكر معروف مسبقاً مثل سكر الكلوكوز , لأن ما كان متوقعا أن هذه المستخلصات النباتية حاوية على هذا النوع من السكر .

2-حضرت سلسلة تخافيف لسكر الكلوكوز , كالآتـي :

أخذ (0.1 غم) من سكر الكلوكـوز وأذيـب في (10 مل) من المـاء المقطـر , وهذا هو التركيز الأول (1/100) . أمـا التـركيـز الثاني (2/100) والذي حضـر بإذابـة (0.2 غم) من الكلوكوز في (10 مل) من المـاء المقطر أمـا التركيـز الثالث فكـان (3/100) وحضـر بإذابـة (0.3 غـم) مـن الكلوكـوز فـي (10 مـل) المـاء المقطـر . والتركيـز الرابـع كـان (4/100) وحضـر بإذابـة (0.4 غم) من الكلوكـوز في (10 مـل) من المـاء المقطـر , وأخيراً التركيـز الخـامس (5/100) وحضّـر من إذابـة (0.5 غم) من الكلوكوز في (10 مل) من المـاء المقطـر .

3-قيس معامل الإنكسار (Refraction index) , لكل تركيزمن تراكيز المستخلصات الكلوكوزية المستخدمة.

4-رسـم منحني قياسي (Calibration curve) للتراكيز المختلفـة من سكر الكلوكوز , والذي كان يربط بين كل من التركيز ومعامل الإنكسار .

5-حضرت المستخلصات النباتية المخففة بإضافة (50 مايكرولتر) من كل مستخلص نباتي إلى (10 مل) من المحلول الملحي الفورماليـني .

6-صفّـر الجهـاز باستخدام المحلول الفورمـاليني الفسلجي لوحده , والذي عد محلول سيطرة .

7-أضـيفت عدة قطـرات مـن كـل مستخلص نبـاتي إلـى المكـان المخصـص للقيـاس فـي الجهاز وقرأت النتيجة عندما أصبح خط الوسط الفاصـل بين النصـفين المظلم والمضـئ بين المحاور بالضبط .

8-وجد بأن النتائج المستحصلة تتوافق مع نتائج المحاليل المخففة لسكر الكلوكوز.

9-طبقت المعادلات السابقة لاستخراج زاوية الدوران النـوعي لكل مستخلص ومطابقة النتيجة بالجدول القياسي لأنواع السكريات المختلفة .

3.9.3 : فصـل كريات الدم الحمر من الخراف وتخفيفهـا :

Isolation & dilution of sheep's R.B.Cs.

1. أخذت كميـة من دم الخـراف المذبوحـة آنيـاً , حيث جمـع الدم فـي عبـوات نظيفـة حاويـة علـى مـادة مـانع تخثـر الـدم (Alsever's solution) المعقم بواسطة جهـاز المؤصدة (121)^0 م وضغط (15) بار ولمدة (10) دقائق , بحيث يكون حجم الدم المضاف مساوٍ إلى حجم مادة مانع التخثر أي بنسـبة 1:1 .
2. أخذ (3 مل) من الدم المحفـوظ ووضع في أنبوبة زجاجيـة نظيفـة ومعقمـة ونبذ بالمنبذ بسرعة (2500) دورة في الدقيقة ولمدة خمس دقائق .
3. أزيلت طبقـة الرائـق وأبقيت كريـات الـدم الحمـراء المترسـبة, بعدهـا أضـيف(5 مـل) مـن المحلـول الملحـي الفسـلجي , يمـزج المحلـول جيـداً وبلطـف حتـى يتجـانس المحلول , باستخدام ماصة باسـتور (Pasture pipette) نظيفـة .

4. نبذ المحلول بالمنبذ بسرعة (2500) دورة بالدقيقة لمدة خمس دقائق , وكررت العملية مرة أخرى .
5. غسل الدم بالطريقة نفسها لثلاث مرات , وفي كل مرة يهمل الراشح ويبقى الراسب من كريات الدم الحمراء .
6. أخذ (0.25 مل) من خلايا الدم الحمراء المضغوطة وأضيف إليها (20 مل) من المحلول الملحي الفسلجي الوظيفي . ويحفظ بالثلاجة لحين الإستعمال .

4.9.3 : تلازن كريات الدم الحمر المخففة بواسطة اللكتين :
Phytohaemagglutination of R.B.Cs by lectins

أستخدم طبق المعايرة لهذا الغرض كالآتي :
1. وضع في كل حفرة من طبق المعايرة (50 مايكرولتر) من المحلول الملحي الفسلجي الوظيفي .
2. أضيف إلى الحفرة الأولى (50 مايكرولتر) من المستخلص اللكتيني المحضر مسبقاً , وخلط جيداً باستخدام الماصة الدقيقة (Micropipette) .
3. نقل (50 مايكرولتر) من الحفرة الأولى إلى الحفرة الثانية وخلط جيداً .
4. كررت الخطوة السابقة لحين الوصول إلى آخر حفرة , حيث أخذ (50 مايكرولتر) منها إهمل الباقي , وبذلك كان المستخلص اللكتيني قد خفف لعدة مرات بحيث يبقى حجم السائل في كل حفرة ثابتاً .
5. اضيف (50 مايكرولتر) من محلول الدم المخفف إلى كل حفرة , ورج الطبق بلطف .
6. حضن الطبق بالحاضنة بدرجة (37)^{0}م لمدة (45) دقيقة .
7. أستخرج الطبق من الحاضنة وتم تدويره بلطف وسجل مقدار التلازن بمفهوم العيار (Shnawa *et. al.*, 2004) .

10.3 : الإنفاذ Dialysis :

خفف المستخلص النباتي إلى النصف بأخذ (3 مل) منه ثم أضيف إليه حجم مساوٍ من المحلول الملحي الفسلجي ومزج جيداً. ثم وضع المحلول في (كيس الديلزة) المخصص وعومل بالماء العادي لمدة يومين ثم بالماء المقطر لمدة يوم واحد , وبعد إنتهاء المدة المحددة فرغت محتويات كيس الديلزة وجمع المحلول في أنبوبة نظيفة , ثم قدر تركيز البروتين الكلي بطريقة بايوريت كما وصف في الفقرة (1.2.2) على طول موجي (540) نانوميتر (Garvey *et. al.*, 1977) .

11.3 : تحديد الجرع Doses determination :

1.11.3 : تحضير جرع اللكتينات : Preparation of lectin doses

حضرت الجرع اللكتينيه كما ذكر في الفقره (8.2) قيس التركيز الكلي للبروتين في كل مستخلص وكان كالآتي :

1. مستخلص نبات البطيخ **:** التركيز الأول كان (5.575 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي: (2.787 ملغم / مل) و(1.394 ملغم / مل) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

2. مستخلص نبات خيار الماء **:** التركيز الأول كان (3.648 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي (1.8245 ملغم / مل) و(0.913 ملغم / مل) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

3. مستخلص نبات الرقي **:** التركيز الأول كان (1.673 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي (0.8365 ملغم / مل) و 0.41825 ملغم / لتر) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

4. مستخلص نبات خيار الماء **:** التركيز الأول كان (0.115 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي (0.5575 ملغم / لتر) و (0.27875 ملغم / لتر) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

كل من هذه التراكيز أعلاه محسوبة بحجم (0.1 مل) أعطيت هذه الجرع بمعدل خمسة مكررات لكل تركيز من تراكيز اللكتين المذكورة أعلاه وحقنت تحت جلد جناح الطير في وسط صفيحة الجناح كما في الشكل (3 - 3) .

شكل (3-3): حقن المحاليل اللكتينية في وسط صفيحة جناح الطير

2.11.3 : تحضير جرع المضـاد الحيوي (الريفادين) :

Rifadin doses preparation

كـان التركيز الخـزين(Stock concentration) للريفـادين -S.D.I. Iraq- والذي حضر مسبقاً هو (100 ملغم / مل) , وبذلك حضرت خمس جرع كالآتي :

1. التركيز الأول (50 ملغم / مل) : وحضّر بأخذ (0.5 مل) من المحلول الخـزين .
2. التركيـز الثـاني (40 ملغـم / مـل) : وحضّـر بأخـذ (0.4 مـل) مـن المحلـول الخزين .
3. التركيـز الثالـث (30 ملغـم / مـل) : وحضّـر بأخـذ (0.3 مـل) مـن المحلـول الخزين .
4. التركيـز الرابـع (20 ملغـم / مـل) : وحضّـر بأخـذ (0.2 مـل) مـن المحلـول الخزين .
5. التركيـز الخـامس (10 ملغـم / مـل) : وحضّـر بأخـذ (0.1 مـل) مـن المحلـول الخزين.

اعطيت هذه الجرع بواقع خمسة مكررات من كل تركيز عن طريق الحقن بالعضلة الفخذية قبل إعطاء جرعة اللكتين تحت الجلد بساعتين .

3.11.3 : تحضير جرع البروتين المنقـى (التيوبركلين) :

Preparation of purified protein derivatives doses (Tuberculin)

كـان الـتركيز الخزيـن (Stock concentration) للمشـتق البروتينـي المنقـى هـو (10Un) ولذلك حضرت ثلاثـة تراكيـز منـه وهـي : (3 Un.) و (2 Un.) و (1 Un.) على التوالـي , وذلـك بحقـن الحيوانـات بـ (0.3 مـل) و (0.2 مـل) و (0.1 مل) من التركيز الخزيـن علـى التوالي وبواقع خمسـة مكررات لكل تركيز , جرّعت الحيوانـات عن طريق الحقـن بالعضلة الفخذيـة قبل إعطـاء جرعة اللكتيـن تحت الجلد بسـاعتين .

4.11.3: تحضيـر جرع متعدد السكريد الشـحمي :

Preparation of lipopolysaccharide doses preparation

حضر متعدد السكريد الشحمي بتركيز (10 ملغم / مل) الذي أعتبر التركيز الخزين (Stock concentration) , وحضرت ثلاثة تراكيز منه , عد التركيز الخزين هو التركيز الأول وخفف بعد ذلك ليحضر التركيزان الثاني والثالث وهما (5 ملغم / مل) و (2.5 ملغم / مل) على التوالي ,كل من هذه التراكيز اعلاه محسوبة بحجم (0.1 مل) اعطيت هذه الجرع تحت جلد الجناح بواقع خمسة مكررات لكل تركيز(Westphal's *et. al.*,1952cited by Kwapiniski, 1972)).

5.11.3: تحضير جرع الملزن الدموي النباتي :

Preparation of phytohaemogglutination doses

عد التركيز الخزين (**Stock concentration**) هو التركيز الأول وكان (10 ملغم / مل) وحضّر بعد ذلك التركيزان الثاني والثالث وهما (5 ملغم / لتر) و (2.5 ملغم / لتر) على التوالي , كل من هذه التراكيز اعلاه محسوبة بحجم (0.1 مل) اعطيت هذه الجرع تحت جلد الجناح بواقع خمسة مكررات لكل تركيز.

6.11.3 : تحضير جرع محلول الكولجسين :

Cholechecin doses preparation

حضر التركيز الخزين من محلول الكولجسين بإذابة(0.5 غم) منه في (2.5 مل) من المحلول الملحي الفسلجي , وحضّرت منه ثلاثة تراكيز هي : (150 مايكروغرام) و (100 مايكروغرام) و (50 مايكروغرام) على التوالي .

تم الحقن بواقع خمسة مكررات لكل تركيز حيث أعطي الحقن عن طريق عضلة الفخذ قبل عملية سحب الدم بساعة ونصف .

12.3 : نظام الإختبار : Experimental system

استعملت أفراخ دجاج اللحم (Broiler chicken) بحسب تصنيف التأريخ الطبيعي , وبعمر أسبوع واحدا لجميع الحيوانات التي استخدمت في البحث. كان المعدل الطبيعي للوزن بحدود (45-65) ملغم , كانت عملية الحصول على الوجبات تتم بواقع (15) حيوان كل (4) ايام من منطقة الدبلة.

حضر المكان المخصص لوضع الحيوانات بشكل نظيف وصحي وحاوي على نظام تهوية جيدا مع مراعاة تهيئة العلف المركز الخاص بهذا النوع من فراخ دجاج اللحم ، وكان ماء الشرب المستخدم هو ماء الصنبور ، وضعت الحيوانات لمدة يومين حتى يتكيف الحيوان مع المكان الجديد المعد له . وكان عمر التجربة قصيرا(Short experiment) لا يتجاوز (24) ساعة بدءاً من عملية الحقن بالمستخلص النباتي المحضّر مسبقاً حتى عملية سحب الدم من القلب مباشرة (Direct heart puncture) كما في الشكل (3 - 4) .

شكل (3): سحب المباشر

4 - الدم من قلب الطير

13.3 : حسـاب تفاعل الجلـد: Skin reaction calculation

أخـذت (10) حيوانـات مختـارة وقيس ثخـن الجلـد تحت الجنـاح قبل عمليـة الحقـن وكان كالآتـي :

(1.281, 0.8, 1.2, 0.9, 1, 1.1, 1.7, 0.9, 1.2)أخذ معدل هذه القراءات العشر والتي كانت تساوي (1 ملم) , لذلك عد ثخن الجلد الطبيعي قبل الحقن هو(1 ملم) لجميع الحيوانات بما فيها حيوانات السيطرة .

بعد حقـن الحيوانات بالمستخلصات النباتية جرى في اليوم الثـاني قيـاس ثخـن الجلـد من جديـد وذلـك مـن خـلال معرفـة الفـرق بـين القـراءتين الأولـى والثانيـة , و أخـذ معـدل المكررات الخمسـة لكـل تركيـز واسـتخرج معـدل ثخن الجلـد بعد التفـاعـل . جرت هذه العملية باسـتعمال مسـطرة قيـاس خـاصة (Vernia) مقـاسـة بالملمتـر . Christe (*et. al.* ,2000)

14.3 : حسـاب معامل الإنقسـام: Mitotic index calculation

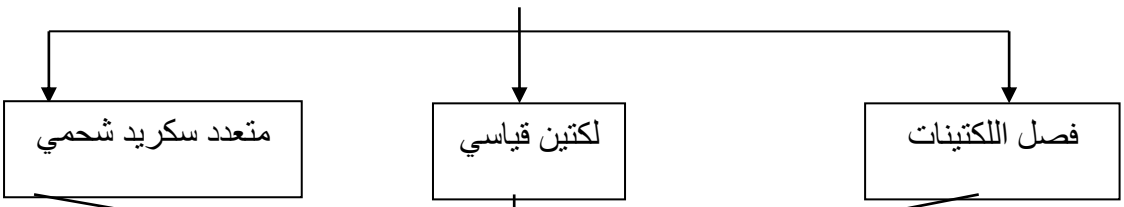
بعـد انتهـاء فتـرة إعطـاء الجرعـة المحـددة للحيـوان , حقـن الحيـوان بمـادة الكولجسـين عن طريـق العضـلة الفخذيـة , وبـعد مـرور سـاعة ونصـف سحـب الـدم مبـاشرة مـن قلـب الحيـوان (Direct heart puncture) بعـد تخـديره بمـادة الكلوروفورم (Chloroform) وعملت مسحات الشرائح الزجاجية بشكل مكررات لكل تركيز , وصبغت هذه الشرائح بصبغة كمـزا (Giemsa stain) لمدة دقيقة , ثم فحصت تحت المجهر المركب .

عنـد الفحـص أخـذت (10 حقـول) مـن كـل شـريحة زجاجيـة وفيهـا حسـب عـدد الخلايا اللمفاوية وعدد الخلايا المعدة للإنقسـام في كل حقل , ومن خـلال تقسيم الخلايـا المعـدة للإنقسـام في كل حقل على عدد الخلايا اللمفاوية في الحقول نفسها وجمع النـاتج وقسـم علـى (10) كمعـدل و استخـج معامل الإنقسـام (Mitotic index) لكل تركيـز(حسن, 2002).

15.3 : حسـاب الأورمـات اللمفيـة : Blastogenicity calculation

بعد أن حسب عدد الخلايـا اللمفاويـة فـي كل حقل جـرى حسـاب عدد الأورمـات اللمفيـة فـي هذه الحقـول نفسـها, ومـن خـلال تقسـيم عدد الأورمـات اللمفيـة علـى عدد الخلايـا اللمفاوية في كل حقل وأخذ مجموع الناتـج من (10 حقول) وقسّم الناتـج علـى (10) واستخرج معـدل الأورمات اللمفيـة(Blastogenicity) لكـل تركيـز (Christe *et. al.*, 2000).

منـوال الدراســة



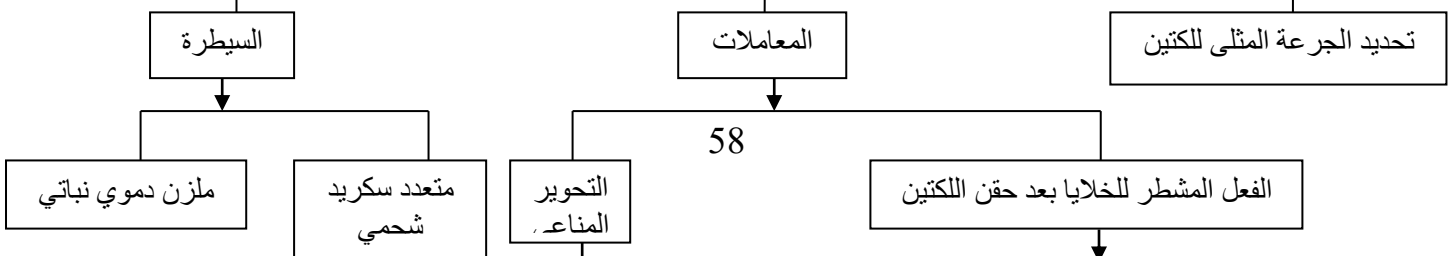
نظـام الإختبـار

أختبـار جلد الطير بالملزن الدموي النباتي , كان هذا النظام معدا أصلاً لتحديد الكفاءة المناعية للطير والتحري عن مدى التلوث البيئـي

التهيئــة والتأهيـل

معـايرة وتطـوير النظــام

1. تقويم إمكانية استخدام إختبار الجلد للدجـاج .
2. تقويم إمكانية إستخدام مادة مضادة لخيوط المغزل .
3. إضـافة مفهوم معامل الإنقســام .
4. إضافة مفهوم التحري عن الأورمات اللمفيـة .
5. كل معاملة (لكتين) جرت بثلاثة تراكيز , وكل تركيز خمسة مكررات . ومعامل الإنقسام لمكررين .
6. تطوير نظـام الإختبـار لدراسـة التحوير المناعـي .



المواد وطرق العمل Materials and Methods

1. 3 :المحاليـل المستعملة : Solutions

1.1.3 : المحلول الملحي (الفسلجي)

Normal saline 0.85 %

حضر هذا المحلـول بإذابـة (0.85غم) من مـادة كلوريـد الصوديوم , شـركة BDH (الوزن الجزيئي 54.44) في كمية قليلة من الماء المقطر ومن ثم إكمال الحجم النهائي إلى (100 مل) من المحلول بالماء المقطر ثم عقم في جهاز المؤصدة بدرجة حرارة (121)º م وضـغط (15) بار لمدة (15) دقيقـة , استخـدم هـذا المحلـول فـي تحضـير المحلـول الملحـي الفورمـاليني (Formal saline) وفي إجراء الإختبارات اللاحقة(Garvey *et. al.*, 1977) .

2.1.3 : المحلول الملحي الفورمالينـي (0.5 %)

Formal normal saline

حضّر هذا المحلول بإضـافة **(0.5 مل)** من الفورمالديهايد (H-CHO) شـركة BDH (الوزن الجزيئي 30.03) إلى (99.5) مل من المحلول الملحي الفسلجي ليصبح التركيـز النهـائي للفورمالين في هذا المحلول (0.5 %) , حيث أستخدم المحلول لغرض منـع نمو الأحيـاء المجهريـة في المسـتخلصات النباتية المحضـرة (Kwapinski, 1972) .

3.1.3 : محلول كبريتات الأمونيوم (40 %)

Ammonium sulfate solution

حضر هذا المحلول بـإذابة (40 غم) من مادة كبرياتت الأمونيوم { $(NH_4)_2SO_4$ } شـركة BDH (الوزن الجزيئي 132.13) في كمية قليلة من المـاء المقطـر وإكمـال الحجـم النهـائـي إلـى (100 مـل) فـــي قنيـــنة حجميـــة . أسـتعمل هـذا المحلـول لغـرض ترسـيب البروتينـات فـــي المستخلصات النباتية المستعملة (Johnston & Thorpe, 1982) .

4.1.3 : محلـول ألسـيفر

Alsever's solution

حضر هذا المحلول بإذابـة (20.50 غم) من الكـلوكوز شركـة BDH , و (8غم) من مـادة سترات الصديوم / شركة TAAB, و (0.55 غم) من مادة حامض الستريك , و (4.20 غم) من كلوريـد الصـوديوم / شـركة BDH , فـي لتـر واحـد مـن المـاء المقطـر , عقـم المحلـول فـي جهـاز المؤصـدة حيث يكـون الأس الهيـدروجيني(6.1) اسـتعمل هـذا المحلـول لمنـع تجلـط عينـات دم الاغنام وحفظها لمـدة طويلة نسبياً **(Garvey *et al., 1977*) .**

5.1.3 : محلـول دارئ الفوسفات الفسيولوجي

Phosphate buffer saline (P.B.S). .

حضّـر هذا المحلـول بإذابـة (21.5 غم) من مـادة فوسـفات الهيدروجين ثنائيـة الصوديـوم (Na_2HPO_4) شـركة BDH – (الـوزن الجزيئـي 148), و (20.4 غـم) مـن مـادة فوسـفات البوتاسيوم ثنائيـة الهيدروجين (KH_2PO_4) شركة BDH – (الوزن الجزيئـي 116) , و (8.8

غم) من مادة كلوريد البوتاسيوم (KCl) شركة BDH (الوزن الجزيئي 54) , في كمية قليلة من الماء المقطر , و إكمل الحجم النهائي الى لتر بإضافة الماء المقطر. وعدّل الأس الهيدروجيني إلى (7.2) بواسطة حامض (HCl) بتركيز (0.1 %) تم تعقيم المحلول بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة (121)^0 م وضغط (15) بار ولمدة (15) دقيقة .أستخدم هذا المحلول في تحضير المستخلص النباتي والفحوصات اللاحقة للمحافظة على المحاليل بد رجة أسية متعادلة (Garvey *et. al.*, 1977) .

6.1.3 محلول الكولجسين

Cholechesin solution

حضر هذا المحلول من إذابة حبة واحدة تحتوي على (0.5 غم) من المادة الفعالة (الكولجسين) في (2.5مل) من المحلول الملحي الفسلجي , ثم نبذ المحلول بالمنبذ بسرعة (2000) دورة بالدقيقة ولمدة دقيقة ونصف , واحتفظ بالعالق بعد إزالة الراسب . إستعمل هذا المحلول لزيادة وضوحية رؤية الخلايا الدموية وكذلك لإيقاف انقسام الخلايا في الطور التغلضي لانه يمنع تكون خيوط المغزل (حسن,2002) .

7.1.3 : محلول الألبومين وتخافيفه القياسية

Standard albumin solutions

حضر هذا المحلول بإذابة (60 غم) من الألبومين البقري في كمية قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.6 عياري) وأكمل الحجم النهائي إلى(1لتر) باستعمال المحلول نفسه ليكون التركيز النهائي للألبومين (60 غم / لتر) , ومن هذا المحلول تم تحضير التخافيف القياسية(1:1 , 2:1 , 4:1 , 8|:1 , 16:1 , 32:1 , 64:1 , 128:1) غم / لتر على التوالي والتي تمثل التراكيز (60 , 30 , 15 , 7.5 , 3.75 , 1.875 , 0.9875 , 0.46875) غم / لتر على التوالي , خفف باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.6 عياري) جرى إستعمال هذه المحاليل لغرض تحضير المنحني القياسي (Standard curve) لمعرفة تركيز البروتين الكلي للمستخلصات النباتية قيد الدراسة أو البحث (Bishop *et. al.*, 1985) .

2.3: الكواشف المستخدمة :

1.2.3 : محلول البايوريت

Biuret solution

حضر هذا المحلول بإذابة (3 غم) من مادة كبريتات النحاس ($CuSO_4.5H_2O$) شركة BDH – (الوزن الجزيئي 249.5) , في نصف لتر من الماء المقطر , وتم إضافة (9 غم) من مادة ترترات الصوديوم والبوتاسيوم ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) شركة BDH – (الوزن الجزيئي 166), وتم إضافة (5 غم) من مادة يوديد البوتاسيوم – شركة Evans , وبعد إذابة هذه المكونات الثلاثة أضيف (100 مل) من محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) شركة BDH – (6 عياري) , وتم إكمال الحجم النهائي إلى لتر بإضافة الماء المقطر . وقد أستعمل هذا المحلول لغرض قياس تركيز البروتين الكلي في المستخلصات النباتية المستعملة (Bishop *et. al.*, 1985) .

3.3 : الأصبـاغ المسـتعملة : Stains

1.3.3 : صبغـة كمـزا

Giemsa stain

يمزج 3**غم من الصبغة مع100** مل من الكليسيرول ويضاف لها الكحول المثيلي مع التحريك المستمر والتسخين بدرجة 60-70درجة مئوية. يمزج 1 مل من محلول الصبغة الخزين مع 4 مل من محلول سورنسن (المحضر من 6.74 غرام فوسفات البوتاسيوم و7.08 غرام من فوسفات الصوديوم الحامضية في لتر من الماء المقطرويعدل الاس الهيدروجيني الـ 6.8).

2.3.3 : صبغـة كـرام

Gram stain

حضـرت هذه الصبغة بإضـافة صـبغة البنفسـج البلـوري وصـبغة اليـود Iodine والكحـول الأثيلي وصبغة السفرانين , واستخدمت هذه الصبغة لصبغ السلالة بعد تنميتها لملاحظة شكل الخلايا ولونها ولاستبعاد التلوث (Garvey *et al.*, 1977) **.**

4.3 : المواد المحـورة للمناعـة: Immunomodulant materials

1.4.3 : محلول المضاد الحيوي الريفادين

Rifadin antibiotic solution

حضـر هـذا المحلـول بإذابـة كبسـولة واحـدة ذات وزن (300 ملـي غـرام) مـن الريفاديـن – شـركة S.D.I. Iraq – فـي كميـة قلـيلة مـن المحـلول الملـحي الفسلجي , وإكمـال الحجم النهائي للريفاديـن (100 ملغم / مل) , وهذا التركيز يمثل التركيز الخزين Stock concentration **.**

أستعمل هـذا المحلول لمـعرفة التأثير السلبي أو الإيجابي على الجهـاز المنـاعي للفراخ عـند مقارنتـــه مـــع محاليـــل السيطـــرة المســـتخدمة , مثـــل متعـــدد السكريـــد الشحمـــي (Lipopolysaccharide) والملـزن الدمـوي النبـاتـي (Phytohaemagglutination) .

2.4.3 : مشـتق البروتيـن المنقـى (تيوبركلين)

Purified protein derivatives (P.P.D.)

استخدمت هذه المـادة المجهزة مـن معهد المصـول واللقاحـات بتركيـز (10 وحـدة دوليـة) والذي اعتبر التركيز الخزين , حيث حضرت عدة تراكيز مختلفة منه . استخدم هذا المحلول لمعرفة إستجابة الجهاز المناعي للفراخ له , عند مقارنته مع محاليل السيطرة المستخدمة .

3.4.3 : المحلـول الملـزن الدموي النباتـي

Phytohaemagglutination solution (P.H.A.)

جهـزت مادة الملزن الـدموي النبـاتي (PHA) مـن قبـل المركـز العراقـي لأبحـاث السـرطان والوراثة الطبية بتركيز (10 %) ملي غرام, والذي حضرت عدة تراكيز منـه وقد استخدمت هذه المادة باعتبارها قرينة سيطرة للأنواع اللكتينية المستخدمة .

5.3 : الأوساط الزرعية المستخدمة Culture media

1.5.3 : وسط نقيع القلب والدماغ

Brain heart infusion medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات شركة (LAB Medium) المنتجة له بأخذ (35 غم) من مادة الوسط وإذابتها في لتر واحد من الماء المقطر, خلط المزيج لمدة (10دقائق) مع التسخين الخفيف لإذابته , ثم وزع الوسط على الأنابيب وتم تعقيمه بجهاز المؤصدة بدرجة (121)^0 م وضغط (15 بار) ولمدة (15 دقيقة) .

2.5.3 : وسط القلب والدماغ الصلب

Brain heart agar medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات شركة(Himedia) المنتجة له باخذ (53 غرام) من مادة الوسط واذابته في لتر واحد من الماء المقطر. مزج جيدا ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة (121 درجة مئوية) وضغط (15 بار) ولمدة (15 دقيقة).

6.3 : تحضير متعدد السكريد الشحمي من البكتريا السالبة لصبغة كرام :

Preparation of lipopolysaccharide from gram negative bacteria

1.6.3 : تنمية البكتريا السالبة لصبغة كرام

استخدمت بكتريا *Vibrio metschnikovii* (المركز التشيكي للسلالات القياسية) من سلالة مجففة ومحفوظة , وكالاتي :

1. حضرت كمية من وسط نقيع القلب والدماغ Brain-heart infusion المعقم وتم توزيعه على خمسة أنابيب إختبار معقمة .
2. سحب مقدار (1 مل) من إحدى الأنابيب وإضافتها إلى الأنبوبة الحاوية على السلالة المجففة , ومزجت جيداً .
3. سحب مقدار (1 مل) من العالق المتكون , وأضيف إلى الأنبوبة الثانية الحاوية على الوسط المغذي للسائل .
4. عملت سلسلة تخافيف على الأنابيب المتبقية بسحب (1 مل) من محتوى الأنبوبة الثانية وأضيف إلى الأنبوبة الثالثة , ثم من الأنبوبة الثالثة إلى الرابعة , ثم تم سحب (1 مل) من الأنبوبة الرابعة و إهماله .
5. حضنت الأنبوبة الأولى الحاوية على النمو في الحاضنة بدرجة (37)^0 م , وحفظت باقي الأنابيب في درجة التجميد .
6. ان لم يظهر نمو بعد مرور يوم , تستخرج الأنابيب المحفوظة بالتجميد ووضعها في الحاضنة بدرجة (37)^0 م تباعاً حتى يظهر النمو .

2.6.3 : تحضير وزن جاف من البكتريا السالبة لصبغة كرام :

Preparation of dry weight of bacteria

حضر وزن جاف من البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي تم تنميتها حسب الفقرة 1.6.2 كالآتي :

1. حضرت كمية من وسط نقيع القلب والدماغ وقدرها (3 لتر) موزعة على ستة دوارق مخروطية Conical flasks سعة لتر واحد وبمقدار نصف لتر في كل دورق زجاجي وعقمت في جهاز المؤصدة بدرجة(121)^{0}م وضغط (15 بار) ولمدة (15 دقيقة) .
2. لقحت الأوساط الزرعية المحضرة بواسطة البكتريا النامية على وسط القلب والدماغ الصلب بأخذ عدد متساوي من المستعمرات ووضعها في كل دورق .
3. وضعت الدوارق المخروطية في حاضنة هزازة بمعدل اهتزاز (100 هزة / دقيقة) ودرجة حرارة (37)^0 م , لمدة 18 ساعة.
4. بعد استخراج الدوارق من الحاضنة , وزعت محتوياتها الحاوية على النمو البكتيري داخل عبوات خاصة سعة (250 مل) معقمة , ثم وضعت في جهاز المنبذ , ونبذ المحلول بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
5. سكب الراشح وجمع الراسب والذي هو عبارة عن بكتيريا مترسبة في عبوة نظيفة معقمة , ثم غسلت بالماء المقطر ونبذت بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
6. سكب الراشح وغسل الراسب من البكتريا بالكحول الأثيلي المطلق (99%) ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
7. سكب الراشح وغسل الراسب من البكتريا بالاسيتون المطلق ومزج جيداً ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
8. سكب الراشح وغسلت البكتريا المترسبة بالإيثر المطلق ومزج جيداً ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (7000) دورة في الدقيقة ولمدة (15) دقيقة , ثم كررت هذه الخطوة مرة أخرى .
9. سكب الراشح وجمعت البكتريا المترسبة في أنبوبة اختبار وحضنت بالحاضنة بدرجة (37)^0 م من أجل تجفيفها لمدة 18ساعة(Kwapinski, 1972).

3.6.3 : إستخلاص متعدد السكريد الشحمي بطريقة وستفالز:

Extraction of lipoplysaccharide by Westphal's method

وصفت طريقة تحضير متعدد السكريد الشحمي من قبل وستفالز وجماعته عام 1952 (Westphal's *et. al.*, 1952 cited by Kwapinski, 1972) وهي كالآتي :

1. اخذ (1 غم) من الوزن الجاف للبكتريا ووضع في دورق زجاجي نظيف ومعقم , وعلّق بـ (10 مل) من الماء المقطر ومزج جيداً .
2. مزج العالق البكتيري مع (26.5 مل) من الفينول المحضر آنياً بتركيز (75 %) بأخذ (37.5 مل) من الفينول البلوري بعد أذابته بالحمام المائي بدرجة (60)^0 م , ثم أضيف إليه (12.5 مل) من الماء المقطر .
3. وضع المزيج في الثلاجة بدرجة (3 – 5)^0 م ولمدة نصف ساعة مع الرج المستمر بين الحين والآخر .
4. أخذ المزيج وسكبه في أنابيب الطرد المركزي ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (3000-4000) دورة بالدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
5. لوحظ تكون ثلاث طبقات هي : الطبقة المائية للأعلى ثم طبقة الفينول تليها طبقة الراسب على التوالي .
6. جمعت الطبقة المائية العليا من جميع الأنابيب في دورق زجاجي نظيف ومعقم , ثم أضيفت كمية من الماء المقطر إلى الباقي في الأنابيب بعد سحب الطبقة المائية , مزج جيداً ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (3000-4000) دورة بالدقيقة ولمدة (15) دقيقة .
7. جمعت الطبقة المائية العليا من جميع الأنابيب ودمجها مع ما تم جمعه مسبقاً .
8. وضع الرائق الذي تم الحصول عليه في كيس الديلزة وعومل مع الماء العادي لمدة يومين , ثم مع الماء المقطر لمدة يوم واحد .

9. جمع السائل داخل كيس الديلزة والذي كان حاوياً على متعدد السكريد الشحمي (حجم السائل المجموع يساوي 40-50 % من حجم السائل الأصلي في بداية التجربة) .
10. اضيف الكحول الأثيلي المركز بحجم يساوي ستة أضعاف سائل الديلزة .
11. أخذت كمية من الكحول الأثيلي المطلق (99 %) في وعاء زجاجي نظيف وشبع بمادة أستيت الصوديوم Sodium acetate , ثم سكب فوق الخليط المكون من سائل الديلزة والكحول الأثيلي المطلق .
12. لوحظ تكون راسب أبيض أسفل الوعاء الزجاجي ثم نبذ بالمنبذ بسرعة (2500) دورة بالدقيقة ولمدة (10) دقائق للحصول على أكبر كمية من الراسب والذي هو عبارة عن متعدد السكريد الشحمي غير النقي .
13. يوضع الراسب في الحاضنة بدرجة (37)^0 م لمدة ليلة واحدة للحصول على وزن جاف من متعدد السكريد الشحمي .

7.3 : بذور النباتات : Plant seeds

في هذا البحث تم إستعمال بذور جافة لنباتات محلية زرعت في القطر والتي تنتمي جميعها إلى العائلة القرعية , وفيما يأتي جدول بأسماء النباتات العربية وأسمائها الشائعة والعلمية بحسب تصنيف(لينايوس):

جدول(3-1): اسماء النباتات العربية واسمائها الشائعة والعلمية

إسم العائلة	الإسم الشائع	الإسم العلمي	الإسم القرعي للنبات
Cueurbitaceae	Sweet melon Musk melon	*Cucium melo*	بطيخ
Cueurbitaceae	Water melon	*Citrullus vulgaris*	رقي
Cueurbitaceae	Better apple	*Citrullus colocynthus*	حنظل
Cueurbitaceae	Cocumber Gherkin	*Cucumis sativus*	خيار الماء
Cueurbitaceae	Flexuons	*Cucumis melovar*	خيار تعروزي
Cueurbitaceae	Lagnaria Vulgaris	*Cucurbita Sieeria*	قرع التزيين
Cueurbitaceae	Vegetable marrow	*Cucurbita pepo*	قرع خضري
Cueurbitaceae	Gourd	*Cucurbita grosses*	اليقطين

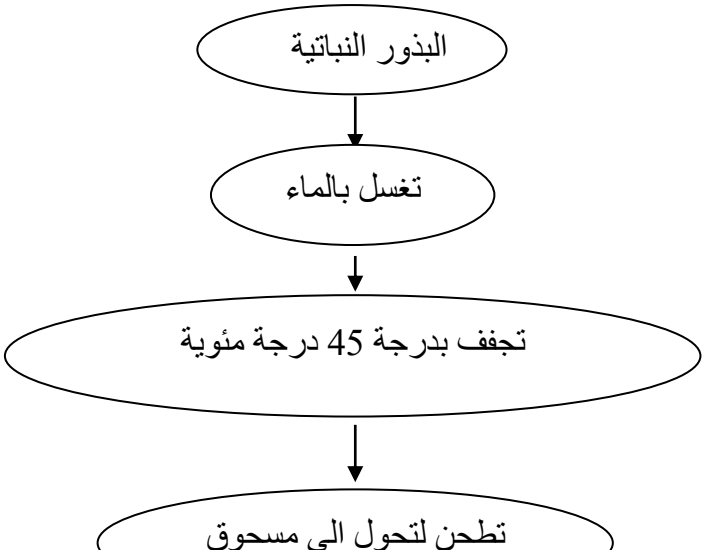
8.3 : فصل المحاليل اللكتينية من بذور النباتات :

Isolation of lectin solutions from plant seeds

أستعملت طريقة(Garvey *et. al.*, 1977) والمحورة من قبل (Shnawa *et. al.*, 2004) في عملية فصل المحاليل اللكتينية , والتي يمكن إيجازها فيما يأتي :

1. قشرت البذور النباتية للتخلص من الغلاف الخارجي .
2. غسلت البذور بالماء جيداً ثم وضعت في طبق زجاجي على ورقة ترشيح نظيفة , ثم وضع الطبق في الفرن بدرجة حرارية لا تزيد عن (45) ^{0} م ولمدة ساعة واحدة .
3. طحنت البذور بعد التجفيف يدوياً باستعمال الهاون الخزفي (Morter) للحصول على قطع صغيرة ثم استخدمت المطحنة الكهربائية (Coffee miller) للحصول على مسحوق ناعم.

4. أخذ غرام واحد من المسحوق ووضع في أنبوبة اختبار وأضيف إليه(10 مل) من محلول دارئ الفوسفات الفسلجي .
5. رجت الأنبوبة جيدا باستخدام جهاز الرج الكهربائي (Vortex) ووضعت الأنبوبة في الثلاجة بدرجة (4)^0 م لمدة يوم واحد .
6. وضعت الأنبوبة في جهاز المنبذ ونبذ المحلول بسرعة (4000) دورة في الدقيقة لمدة (10) دقائق عندها اهمل الراسب واعتمد الراشح.
7. أخذ (5 مل) من الراشح ووضع في أنبوبة أخرى ثم أضيف إليه حجم مساو من محلول سلفات الأمونيوم بتركيز (40 %).
8. وضعت الأنبوبة في الثلاجة بدرجة (4)^0 م لمدة ساعة واحدة , ثم وضعت في جهاز المنبذ ونبذ المحلول بسرعة (7000) دورة في الدقيقة لمدة (45) دقيقة .
9. أهمل الراشح وأذيب الراسب في (0.5 مل) من المحلول الفورمالينيي الفسلجي بتركيز (0.5 %) وحفظ بدرجة التجميد .



شكل(3-1): مخطط يبين طريقة فصل اللكتينات (شناوة وجماعته ، 2004).

9.3 : مميزات اللكتينـات: Lectins characterization

1.9.3 : تقدير تركيز البروتين الكلي في المستخلصات النباتيـة
Total protein estimation of plant extracts

استخدمت طريقة البايوريت لقياس تركيز البروتين الكلي (Bishop *et. al.,* 1985) , وتتضمن هذه الطريقة الخطوات الاتية :

1. وضع (4.8 مل) من محلول البايوريت في أنبوبة زجاجية خاصة بجهاز المطياف (Spectronic 21) .
2. أضيف إليه حجم (0.2 مل) من المستخلص النباتي المحضر مسبقاً , وهذه الأنبوبة تمثل أنبوبة الفحص .

3. أضيف (0.2 مل) من المحلول الفسلجي إلى أنبوبة أخرى تحتوي على (4.8 مل) من محلول البايوريت لغرض تصفير الجهاز (أنبوبة السيطرة) .
4. خلطت الأنابيب جيداً وتركت في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة بعيداً عن الضوء , ثم قرأت الكثافة الضوئية لأنبوبة الفحص بعد تصفير الجهاز عند طول موجي مقداره (540 نانوميتر) في جهاز المطياف الضوئي (Spectronic 21) .
5. استعملت المعادلة الرياضية التالية :

$$\mathbf{Y' = - 0.67 + 168.9\ xi}$$

لحساب البروتين الكلي , حيث أن :
Y^ = تركيز البروتين الكلي بوحدة ملغم / لتر .
X = الامتصاصية .

1.9.3 : دراسة المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين :

في تجربة لبناء المنحني القياسي لتقدير البروتين أستعمل بروتين قياسي هو الألبومين البقري بتركيز (60 غم / لتر) , وحضرت سلسلة تخافيف منه , وجرى تقدير الكثافة الضوئية لكل تخفيف في سلسلة التخافيف بطريقة تفاعل البايوريت ولخمس مكررات . وباستعمال تحليل الإنحدار الخطي البسيط أحتسبت القيمة المقدرة للتركيز وحددت معادلة الخط المستقيم البسيطة وكانت معادلة من الدرجة الأولى للعلاقة بين قيمة الكثافة المطيافية (X) والتركيز (Y) .

ولقد أستعمل محلول البايوريت لتوفر مواده الأولية وعدم الحاجة فيها إلى أجهزة قياس معقدة,علماً أنه قرى بطول موجي (540 نانوميتر). جدول(1-2) شكل (2-2) , وهذا يتفق مع باحثين كثيرين (Bishop *et al.*, 1985) المعادلة المستعملة :

$$\mathbf{Y' = b\ x_i + a}$$

إذ أن :
(Y ') تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحنى القياسي لتقدير كمية البروتين الكلي للمستخلصات النباتية قيد البحث .
(x) الكثافة النوعية .
(a) تمثل الفرق بين متوسط التركيز وبين حاصل ضرب معامل الانحدار (b) في متوسط قيم الامتصاص في قراءة المطياف الضوئي .
(b) تمثل عامل الانحدار , ويحسب من المعادلة الأولية :

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

SXY تمثل مجموع مربعات الإنحراف لقيم X/Y .
SXX تمثل مجموع مربعات الإنحراف لقيم X (Dawed & Al-Yas, 1990) .
وتحسب (**a**) من المعادلة الآتية :

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

(y) الوسط الحسابي للتركيز .
(x) الوسط الحسابي للكثافة الضوئية .
ويحسب عامل الارتباط بوساطة المعادلة الآتية :

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

- -

جـدول (3-2) البيانـات والمعـالم الإحصـائية الخاصـة بمعادلـة المنحنـي القياسـي لتركيـز محلـول الألبومين والتخافيف القياسية :

X_1	Y_1	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**	**650.25**
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**

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

b = 168.9

a = $bx^- - y^-$

a = 12.6675 + 11.9881 = 0.67

y^ = bx + a

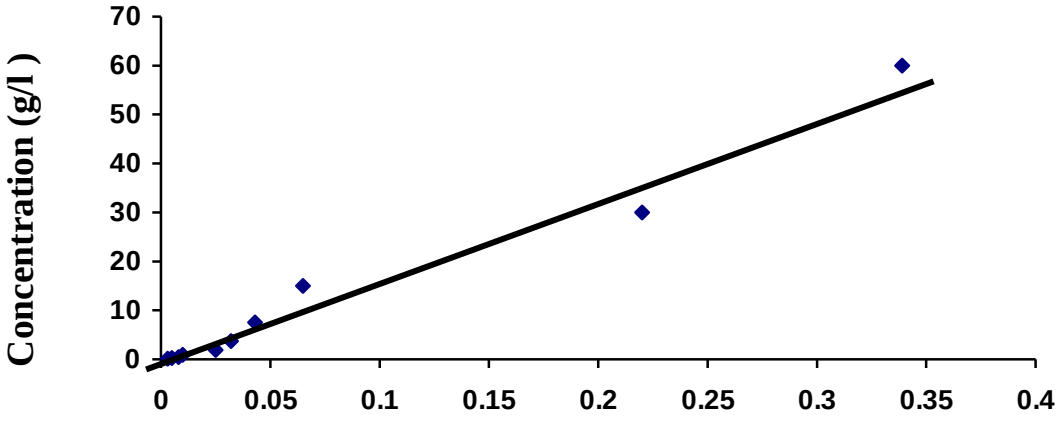
y^= 168.9 X_1 – 0.67 Xi

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

- -

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

r = 0.988



الشكل (3-2) :المنحني القياسي للعلاقة بين التركيز القياسي للألبومين مقابل الكثافة الضوئية

- **Best Fitting Point**
- **Actual Point**

2.9.3 : تحديد الإستقطاب بالكاربوهيدرات:

لأجل معرفة زاوية الدوران النوعي الموجودة في المستخلص النباتي الذي تم تحضيره , يستخدم جهاز (Polarymetry)(Clark & Seitzer , 1977) وكالآتي :

1. صفر الجهاز المستخدم بمادة المحلول الفورمالييني الوظيفي الذي تم وضعه في أنبوبة الجهاز الخاصة للقياس .
2. حضر تركيز مخفف من كل مستخلص نباتي وذلك بإضافة (50) مايكرولتر منه إلى (10 مل) من مادة المحلول الفورمالييني الوظيفي .
3. أضيفت جميع المستخلصات النباتية المحضرة في أنبوبة الجهاز الخاص بالقياس تباعاً , مع ملاحظة تجنب تكوين فقاعة هوائية داخل الأنبوبة .

4. قرئت زاوية الانقلاب والتي أعتمدت على تساوي الشدة الضوئية بين الإنقلابين المتكونين بين النصفين المظلم والمضئ , وسجلت النتيجة .
5. إستخدم القانون الاتي :

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

حيث أن :
(c) تركيز المستخلص النباتي غم / 100 مل .
$[\alpha]_D^T$ (a) زاوية الدوران النوعي .
(a) مقدار الزاوية المقروءة .
(L) طول الأنبوبة الخاصة بالقياس (بالسنتمتر) .

من خلال تطبيق القانون أتضح بأنه يجب معرفة تركيز المستخلص النباتي , وقياسه الذي تم عن طريق إستخدام جهاز قياس معامل الإنكسار (Refrectometer) وكالآتي :
1-حضر أولاً منحني قياس لسكر معروف مسبقاً مثل سكر الكلوكوز , لأن ما كان متوقعا أن هذه المستخلصات النباتية حاوية على هذا النوع من السكر .
2-حضرت سلسلة تخافيف لسكر الكلوكوز , كالآتي :
أخذ (0.1 غم) من سكر الكلوكوز وأذيب في (10 مل) من الماء المقطر , وهذا هو التركيز الأول (1/100) . أما التركيز الثاني (2/100) والذي حضر بإذابة (0.2 غم) من الكلوكوز في (10 مل) من الماء المقطر أما التركيز الثالث فكان (3/100) وحضر بإذابة (0.3 غم) من الكلوكوز في (10 مل) الماء المقطر . والتركيز الرابع كان (4/100) وحضر بإذابة (0.4 غم) من الكلوكوز في (10 مل) من الماء المقطر , وأخيراً التركيز الخامس (5/100) وحضّر من إذابة (0.5 غم) من الكلوكوز في (10 مل) من الماء المقطر .
3-قيس معامل الإنكسار (Refraction index) , لكل تركيزمن تراكيز المستخلصات الكلوكوزية المستخدمة.
4-رسم منحني قياسي (Calibration curve) للتراكيز المختلفة من سكر الكلوكوز , والذي كان يربط بين كل من التركيز ومعامل الإنكسار .
5-حضرت المستخلصات النباتية المخففة بإضافة (50 مايكرولتر) من كل مستخلص نباتي إلى (10 مل) من المحلول الملحي الفورماليني .
6-صفّر الجهاز باستخدام المحلول الفورماليني الفسلجي لوحده , والذي عد محلول سيطرة حيث ان للجهازقيمتان للمعايرة والتصفير هما(0و180).
7-أضيفت عدة قطرات من كل مستخلص نباتي إلى المكان المخصص للقياس في الجهاز وقرأت النتيجة عندما أصبح خط الوسط الفاصل بين النصفين المظلم والمضئ بين المحاور بالضبط .
8-وجد بأن النتائج المستحصلة تتوافق مع نتائج المحاليل المخففة لسكر الكلوكوز.
9-طبقت المعادلات السابقة لاستخراج زاوية الدوران النوعي لكل مستخلص ومطابقة النتيجة بالجدول القياسي لأنواع السكريات المختلفة .

3.9.3 : فصل كريات الدم الحمر من الاغنام وتخفيفها :

Isolation & dilution of sheep's R.B.Cs.

1. أخذت كمية من دم الاغنام المذبوحة آنياً , حيث جمع الدم في عبوات نظيفة حاوية على مادة مانع تخثر الدم (Alsever's solution) المعقم بواسطة جهاز المؤصدة (121)^0 م وضغط (15) بار ولمدة (10) دقائق , بحيث يكون حجم الدم المضاف مساوٍ إلى حجم مادة مانع التخثر أي بنسبة 1:1 .
2. أخذ (3 مل) من الدم المحفوظ ووضع في أنبوبة زجاجية نظيفة ومعقمة ونبذ بالمنبذ بسرعة (2500) دورة في الدقيقة ولمدة خمس دقائق .

3. أزيلت طبقة الرائق وأبقيت كريات الدم الحمراء المترسبة, بعدها أضيف(5 مل) من المحلول الملحي الفسلجي , يمزج المحلول جيداً وبلطف حتى يتجانس المحلول , باستخدام ماصة باستور (Pasture pipette) نظيفة .
4. نبذ المحلول بالمنبذ بسرعة (2500) دورة بالدقيقة لمدة خمس دقائق , وكررت العملية مرة أخرى .
5. غسل الدم بالطريقة نفسها لثلاث مرات , وفي كل مرة يهمل الراشح ويبقى الراسب من كريات الدم الحمراء .
6. أخذ (0.25 مل) من خلايا الدم الحمراء المترسبة وأضيف إليها (20 مل) من المحلول الملحي الفسلجي . ويحفظ بالثلاجة لحين الإستعمال .

4.9.3 : تلازن كريات الدم الحمر المخففة بواسطة اللكتين :

Phytohaemagglutination of R.B.Cs by lectins

أستخدم طبق المعايرة لهذا الغرض كالآتي :
1. وضع في كل حفرة من طبق المعايرة (50 مايكرولتر) من المحلول الملحي الفسلجي الوظيفي .
2. أضيف إلى الحفرة الأولى (50 مايكرولتر) من المستخلص اللكتيني المحضر مسبقاً , وخلط جيداً باستخدام الماصة الدقيقة (Micropipette) .
3. نقل (50 مايكرولتر) من الحفرة الأولى إلى الحفرة الثانية وخلط جيداً .
4. كررت الخطوة السابقة لحين الوصول إلى آخر حفرة , حيث أخذ (50 مايكرولتر) منها إهمل الباقي , وبذلك كان المستخلص اللكتيني قد خفف لعدة مرات بحيث يبقى حجم السائل في كل حفرة ثابتاً .
5. اضيف (50 مايكرولتر) من محلول الدم المخفف إلى كل حفرة , ورج الطبق بلطف .
6. حضن الطبق بالحاضنة بدرجة (37)^{0}م لمدة (45) دقيقة .
7. أستخرج الطبق من الحاضنة وتم تدويره بلطف وسجل مقدار التلازن بمفهوم العيار (Shnawa *et. al.*, 2004) .

10.3 : الإنفاذ Dialysis :

خفف المستخلص النباتي إلى النصف بأخذ (3 مل) منه ثم أضيف إليه حجم مساوٍ من المحلول الملحي الفسلجي ومزج جيداً. ثم وضع المحلول في (كيس الديلزة) المخصص وعومل بالماء العادي لمدة يومين ثم بالماء المقطر لمدة يوم واحد , وبعد إنتهاء المدة المحددة فرغت محتويات كيس الديلزة وجمع المحلول في أنبوبة نظيفة , ثم قدر تركيز البروتين الكلي بطريقة بايوريت كما وصف في الفقرة (1.2.2) على طول موجي (540) نانوميتر (Garvey *et. al.*, 1977) .

11.3 : تحديد الجرع Doses determination :

1.11.3 : تحضير جرع اللكتينات : Preparation of lectin doses

حضرت الجرع اللكتينيه كما ذكر في الفقره (8.2) قيس التركيز الكلي للبروتين في كل مستخلص وكان كالآتي :

1. مستخلص نبات البطيخ **:** التركيز الأول كان (5.575 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي: (2.787 ملغم / مل) و(1.394 ملغم / مل) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

2. مستخلص نبات خيار الماء **:** التركيز الأول كان (3.648 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي (1.8245 ملغم / مل) و(0.913 ملغم / مل) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

3. مستخلص نبات الرقي **:** التركيز الأول كان (1.673 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي (0.8365 ملغم / مل) و 0.41825 ملغم / لتر) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

4. مستخلص نبات خيار الماء **:** التركيز الأول كان (0.115 ملغم / مل) , ثم حضرت تراكيز مخففة منه وهي (0.5575 ملغم / لتر) و (0.27875 ملغم / لتر) وهما التركيزان الثاني والثالث على التوالي .

كل من هذه التراكيز أعلاه محسوبة بحجم (0.1 مل) أعطيت هذه الجرع بمعدل خمسة مكررات لكل تركيز من تراكيز اللكتين المذكورة أعلاه وحقنت تحت جلد جناح الطير في وسط صفيحة الجناح.

2.11.3 : تحضير جرع المضاد الحيوي (الريفادين) :

Rifadin doses preparation

استخدم التركيز الخزين(Stock concentration) للريفادين -S.D.I. Iraq- والذي حضر مسبقاً هو (100 ملغم / مل) , وبذلك حضرت خمس جرع كالآتي :

1. التركيز الأول (50 ملغم / مل) : وحضّر بأخذ (0.5 مل) من المحلول الخزين .
2. التركيز الثاني (40 ملغم / مل) : وحضّر بأخذ (0.4 مل) من المحلول الخزين .
3. التركيز الثالث (30 ملغم / مل) : وحضّر بأخذ (0.3 مل) من المحلول الخزين .
4. التركيز الرابع (20 ملغم / مل) : وحضّر بأخذ (0.2 مل) من المحلول الخزين .
5. التركيز الخامس (10 ملغم / مل) : وحضّر بأخذ (0.1 مل) من المحلول الخزين.

اعطيت هذه الجرع بواقع خمسة مكررات من كل تركيز عن طريق الحقن بالعضلة الفخذية قبل إعطاء جرعة اللكتين تحت الجلد بساعتين .

3.11.3 : تحضير جرع البروتين المنقى (التيوبركلين) :

Preparation of purified protein derivatives doses (Tuberculin)

كان التركيز الخزين (Stock concentration) للمشتق البروتيني المنقى هو (10Un) ولذلك حضرت ثلاثة تراكيز منه وهي : (.3 Un) و (.2 Un) و (.1 Un) على التوالي , وذلك بحقن الحيوانات بـ (0.3 مل) و (0.2 مل) و (0.1 مل) من التركيز الخزين على التوالي وبواقع خمسة مكررات لكل تركيز , حقنت الحيوانات عن طريق الحقن بالعضلة الفخذية قبل إعطاء جرعة اللكتين تحت الجلد بساعتين .

4.11.3: تحضير جرع متعدد السكريد الشحمي :

Preparation of lipopolysaccharide doses preparation

حضر متعدد السكريد الشحمي بتركيز (10 ملغم / مل) الذي أعتبر التركيزالخزين , وحضرت ثلاثة تراكيز منه , عد التركيز الخزين هو التركيز الأول وخفف بعد ذلك ليحضر التركيزان الثاني

والثالث وهما (5 ملغم / مل) و (2.5 ملغم / مل) على التوالي ,كل من هذه التراكيز اعلاه محسوبة بحجم (0.1 مل) اعطيت هذه الجرع تحت جلد الجناح بواقع خمسة مكررات لكل تركيز .

5.11.3: تحضير جرع الملزن الدموي النباتي :

Preparation of phytohaemogglutination doses

عد التركيز الخزين (**Stock concentration**) هو التركيز الأول وكان (10 ملغم / مل) وحضّر بعد ذلك التركيزان الثاني والثالث وهما (5 ملغم /مل) و (2.5 ملغم / مل) على التوالي , كل من هذه التراكيز اعلاه محسوبة بحجم (0.1 مل) اعطيت هذه الجرع تحت جلد الجناح بواقع خمسة مكررات لكل تركيز.

6.11.3 : تحضير جرع محلول الكولجسين :

Cholechecin doses preparation

حضر التركيز الخزين من محلول الكولجسين بإذابة(0.5 غم) منه في (2.5 مل) من المحلول الملحي الفسلجي , وحضرت منه ثلاثة تراكيز هي : (150 مايكروغرام/مل) و (100 مايكروغرام/مل) و (50 مايكروغرام/مل) على التوالي .

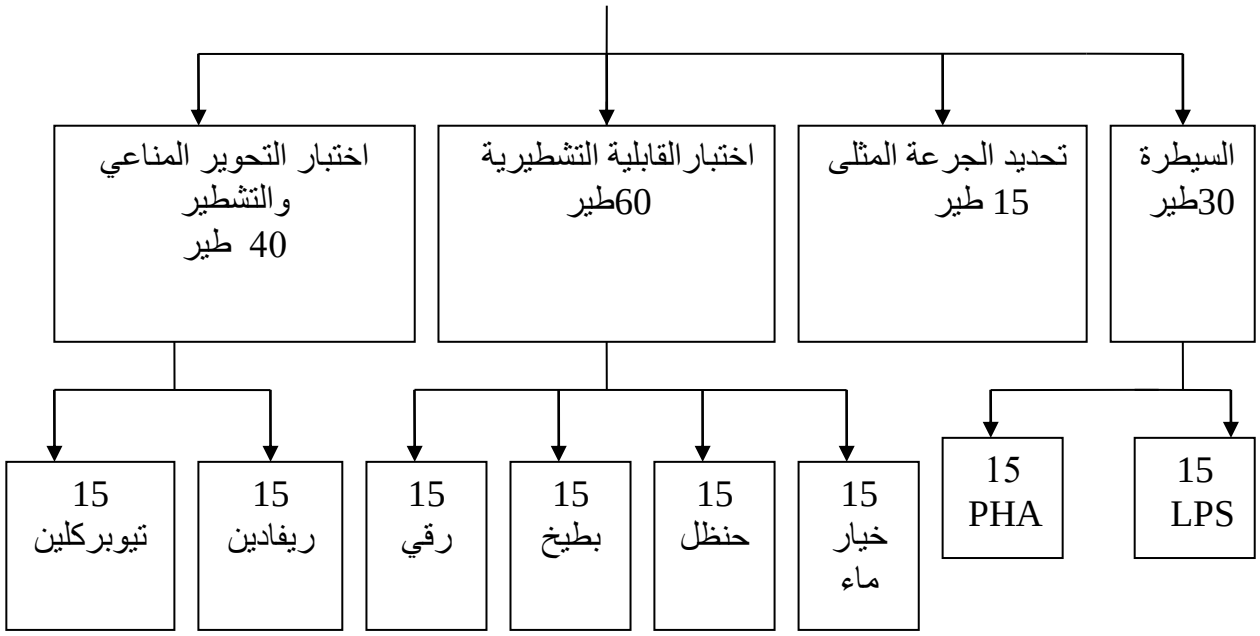
تم الحقن بواقع خمسة مكررات لكل تركيز حيث أعطي الحقن عن طريق عضلة الفخذ قبل عملية سحب الدم بساعة ونصف .

12.3 : نظام الإختبار : Experimental system

استعملت افراخ دجاج اللحم (Broiler chicken) بحسب تصنيف التأريخ الطبيعي , وبعمر أسبوع واحدا لجميع الافراخ التي استخدمت في البحث. كان المعدل الطبيعي للوزن بحدود (45-65) غم , كانت عملية الحصول على الوجبات تتم بواقع (15) طير كل (4) ايام من مفقس البركة.

حضر المكان المخصص لوضع الافراخ بشكل نظيف وصحي وحاوي على نظام تهوية جيدا مع مراعاة تهيئة العلف المركز الخاص بهذا النوع من افراخ دجاج اللحم ، وكان ماء الشرب المستخدم هو ماء الصنبور(Tap water)، وضعت الطيور لمدة يومين حتى يتكيف الطير مع المكان الجديد المعد له . وكان عمر التجربة قصيرا(Short experiment) لا يتجاوز (24) ساعة بدءاً من عملية الحقن بالمستخلص النباتي المحضّر مسبقاً حتى عملية سحب الدم من القلب مباشرة (Direct heart puncture) كما في الشكل (3 - 4) .

عدد الفراخ الكلي
145 طير حديث الفقس



مخطط توزيع افراخ التجربة

13.3 : حساب تفاعل الجلد: Skin reaction calculation

أخذت (10) افراخ مختارة وقيس ثخن الجلد تحت الجناح قبل عملية الحقن وكان كالآتي :

(1.281, 0.8, 1.2, 0.9, 1, 1.1, 1.7, 0.9, 1.2)أخذ معدل هذه القراءات العشر والتي كانت تساوي (1 ملم) , لذلك عد ثخن الجلد الطبيعي قبل الحقن هو(1 ملم) لجميع الحيوانات بما فيها حيوانات السيطرة .

بعد حقن الحيوانات بالمستخلصات النباتية جرى في اليوم الثاني قياس ثخن الجلد من جديد وذلك من خلال معرفة الفرق بين القراءتين الأولى والثانية , و أخذ معدل المكررات الخمسة لكل تركيز واستخرج معدل ثخن الجلد بعد التفاعل . جرت هذه العملية باستعمال مسطرة قياس خاصة (Vernia) مقاسة بالملمتر . (Christe *et. al.* ,2000 a)

14.3 : حساب معامل الإنقسام: Mitotic index calculation

بعد انتهاء مدة إعطاء الجرعة المحددة للطير , حقن الطير بمادة الكولجسين عن طريق العضلة الفخذية , وبعد مرور ساعة ونصف سحب الدم مباشرة من قلب الحيوان (Direct heart puncture) بعد تخديره بمادة الكلوروفورم (Chloroform) وعملت مسحات الشرائح الزجاجية بشكل مكررات لكل تركيز , وصبغت هذه الشرائح بصبغة كمزا (Giemsa stain) لمدة دقيقة , ثم فحصت تحت المجهر المركب .

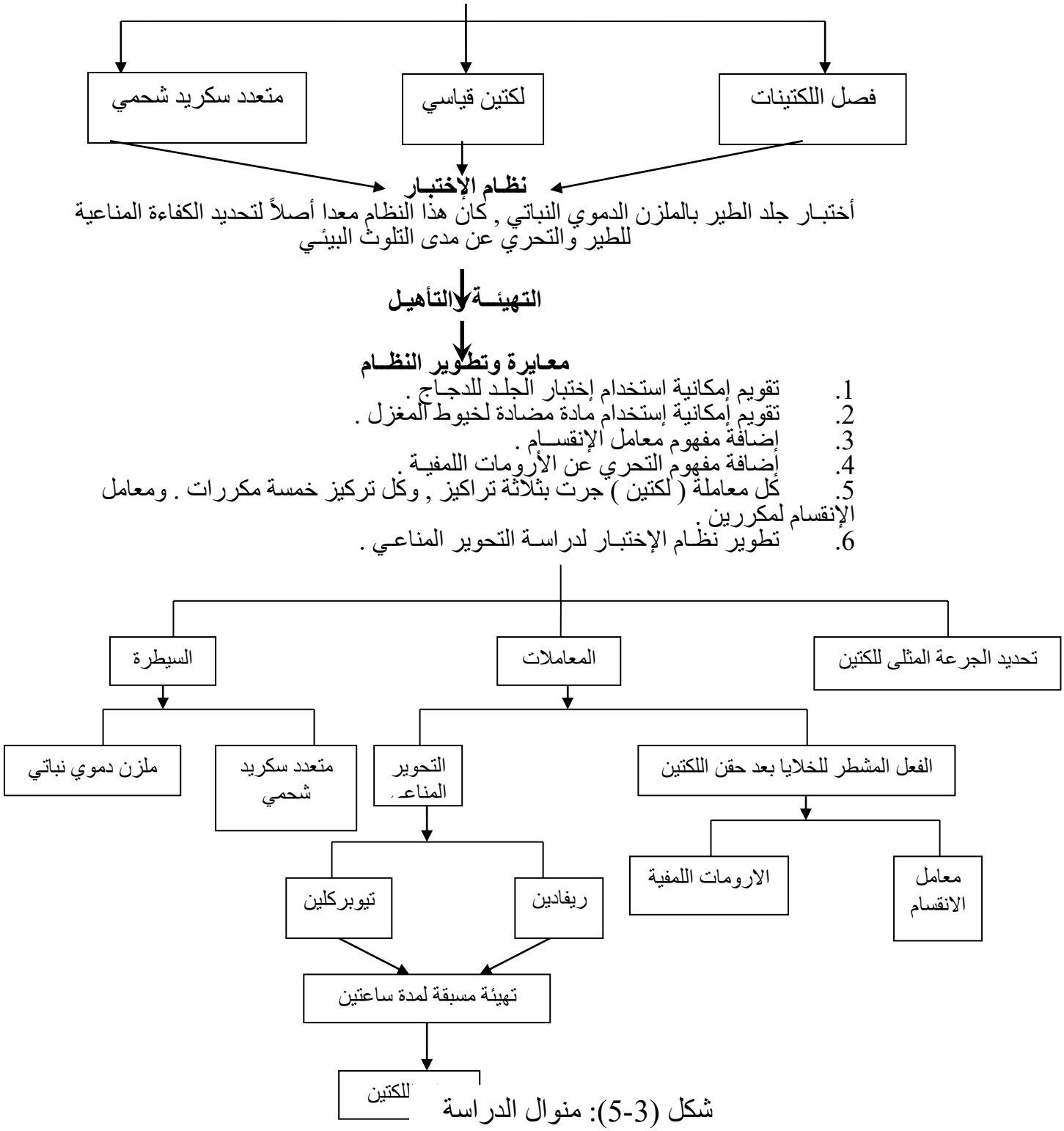
عند الفحص أخذت (10 مجالات مجهرية) من كل شريحة زجاجية وفيها حسب عدد الخلايا اللمفاوية وعدد الخلايا المعدة للإنقسام في كل مجال مجهري , ومن خلال تقسيم الخلايا المعدة للإنقسام في كل مجال مجهري على عدد الخلايا اللمفاوية في المجالت المجهرية نفسها وجمع الناتج وقسم على (10) كمعدل و استخرج معامل الإنقسام (Mitotic index) لكل تركيز(حسن, 2002).

15.3 : حساب الأورمات اللمفية : Blastogenicity calculation

بعد أن حسب عدد الخلايا اللمفاوية في كل مجال مجهري جرى حساب عدد الأورمات

اللمفية في هذه الحقول نفسها, ومن خلال تقسيم عدد الأورمات اللمفية على عدد الخلايا اللمفاوية في كل مجال مجهري وأخذ مجموع الناتج من (10 حقول) وقسّم الناتج على (10) واستخرج معدل الأورمات اللمفية(Lymphblasts) لكل تركيز (Christe *et. al.*, 2000a&b).

منوال الدراسة



شكل (3-5): منوال الدراسة

المناقشة Discussion

1.5: الوصف الجزئي للكتينات
Partial Characterization of Lectins

1.1.5 : تلازن كريات الدم المخففة للاغنام بواسطة اللكتين :

بالنظر الى ان كريات الدم الحمر للأنسان والحيوانات المختلفة بل وحتى داخل النواع الواحد تختلف في طبيعة السكر الطرفي المكون لأغشية هذه الكريات الحمر، واختلاف المواقع الفعالة الرابطة للسكر في جزيئات اللكتين بحسب تسلسل الاحماض الامينية (Amino acid sequence) المكونة لها في الوقت نفسه لذلك اثرت عوامل مختلفة في عملية التلازن الدموي، ومن هذه العوامل المختلفة هي: طريقة الفصل، نوع كريات الدم الحمر، نوع اللكتين المستعمل ، نسب المواد المتفاعلة ، وظروف التفاعل المختلفة ، ان جزيئات اللكتين بتلازنها مع كريات الدم الحمر تبدي تشابهاً كبيراً مع الكلوبيولينات المناعية (Immunoglobulin) وعلى العموم فان جزيئات اللكتين تكون ذات خصوصية واسعة نسبة الى خصوصية الكلوبيولينات المناعية (Ray &chatterjee,1995) .

لذلك درست قدرة اللكتينات على تلزين كريات الدم الحمر في العديد من البحوث ومنها بحث (Shanwa , 2001) الذي درس اللكتينات في النباتات اللوبياء *Dolichos biflorus*، الباقلاء *Vicia faba*، الفاصولياء *Phaseolus laurantus*، الماش *Phaseolus aureus*، الحمص *Cicer orientum*، حيث اخذت معلقات من كريات الدم الحمر بنسب تتراوح ما بين 2.5 % و 50 % اذ وجد ان احسن تخفيف هو2.5 % واخذت درجات حرارة مختلفة 4مْ ، 25مْ 37مْ ، وكانت درجة الحرارة المثلى هي 37مْ، جربت فترات حضن مختلفة ومتنوعة 10، 25، 35، 45 دقيقة، وكانت فترة الحضن الافضل هي 45 دقيقة، وايضاً استعملت محاليل ملحية فسلجية مختلفة بتراكيز0.5 % ، 0.6% ، 0.85% وكان التركيز الامثل هو 0.85% .

فالمحاليل الخاصة ببذور نبات الخيار التعروزي والشجر الرشدي والشجر الركابي وشجر الكوسة فلم تعط أي نتيجة عند ملازنتها مع كريات الدم الحمر للاغنام.وهذا دليل على عدم وجود مادة اللكتين في أي عينة من البذور النباتية التي تمت دراستها .

لقد لزن محلول اللكتين لبذور الرقي و البطيخ والحنظل كريات الدم الحمر للاغنام بعيارية (2048) وهذا يتفق مع ما اشار اليه (Chen & Billingsley, 1999) الى ان اللكتين المعزول من اناث البعوض له القدرة على تلزين كريات الدم للاغنام وبعيارية (2048) وقد اشار (Tateno & Goldestein, 2003) الى ان اللكتين المعزول من الفطر *Laetiporus sulphureus* له القابلية على تلزين كريات الدم الحمر للخراف وبشكل معتمد على الجرعة، اما محلول اللكتين لبذور نبات خيار الماء فقد لزن كريات الدم الحمر للخراف بعيارية اقل وهي (128) وكان عيار التلازن الدموي المباشر لكريات دم البشر هو بحدود ما مشار اليه اعلاه في نباتات الرز والبطيخ والدخن (Shanwa *et. al.*, 2004)، وهذه اول صفة من صفات اللكتينات (Sharon& Lis, 2004).

2.1.5: تقدير كمية البروتين الكلي في المحاليل اللكتينية لبذور النباتات :

استعملت طريقة البايوريت في تقدير كمية البروتين التي تعد الطريقة المعتمدة في العمل السريري المختبري، وتعتمد هذه الطريقة على التفاعل اللوني بين ذرة النحاس القاعدي والآصرة الببتيدية C- O- NH فتكون معقد ارجواني اللون بين ذرة النحاس

واربع ذرات نتروجينية ويكون عمق اللون معتمداً على شدة التفاعل اللوني الذي يعتمد بدوره على تركيز البيتيدات الموجودة في المادة المراد حساب تركيز البروتينات الموجودة فيها ومن ثم فان الكثافة الضوئية (Optical Density) لهذه المواد تعكس تركيز البروتينات بحسب قانون (بير ولامبرت) الذي ينص على انه يمتص من الضوء المار في محلول بقدر تركيز الجزئيات المذابة في ذلك المحلول (Baron & Finegold, 1990 ; Bishop *et. al.*, 1985).قدرت كمية البروتين في المستخلصات النباتية المستعملة وظهرت قراءات مختلفة تدل على وجود بروتين(بضمنه مادة اللكتين) استخدمت طريقة البايوريت في العديد من البحوث منها (Ray & Chaterjee, 1995 ; Suseelan & Mitra , 2001; Shnwa, 2001) واستعمل باحثون اخرون طريقة ثانية لتقدير البروتين وهي طريقة(لوري) (Suseelan *et. al.*, 1997 a ; Suseelan , *et. al.* , 1997b) ويتضح من هذه النتائج ان المادة المفصولة بكبريتات الامونيوم قادرة على التفاعل مع محلول بايوريت ويتغير لونها بمعنى ان المفصول هو بروتين , وهذا يتفق مع ما توصل اليه(الماشطة, 2003).

3.1.5 : قابلية اللكتينات على الارتباط بالكربوهيدرات :

ان قدرة جزيئات اللكتين للأرتباط بالسكريات المختلفة ينبع من وجود مواقع فعالة في جزيئات اللكتين على شكل حلقات مكونة من احماض امينية مختلفة التسلسل وبحسب نوع جزيئة اللكتين القادرة على ربط مجموعة او اكثر من المجاميع الفعالة المكونة للسكريات المختلفة ويقال لذلك اللكتين بأن له الفه تجاه السكر المعين. قد يملك نوع من اللكتين القدرة على الاتحاد مع اكثر من نوع من السكر وهذا يعني بأن هذا اللكتين متعدد التخصص . لقد وجد الباحثKolberg عام(1992) في بحث على نخالة الرز بأن اللكتين المعزول يرتبط مع سكر (N-acetylglucosamine) واشار (Ray choudhury *et. al.*, 1993; Goldstein & Hayes, 1978) – عند استعمالهم لبعض النباتات– الى السكر الذي ارتبط باللكتين وحسب النوع النباتي وكما في ادناه :

فمثلا كان نبات الحنطة يحوي نوع من اللكتين هو WGA (wheat germ) ويرتبط بالسكر N- acetylglucoseamine والسكر N- acetylneuramini acid , اما نبات الفول السوداني فيحوي لكتين من نوع(peanut) PNA ويرتبط بالسكر D- galactose (1-3)-D-N- acetylgalactosamine , وكان نبات الجولق الاوربي حاوي على لكتين من نوع(gorse)UEA-I والذي يرتبط بالسكرL- fucose, بينما نبات اللوبياء الهليونية يحوي لكتين من نوع DBA (hors gram) والذي يكون مرتبط بالسكر من نوعN-acetylgalactosamine, اما لكتين الخروع فيرتبط مع سكر الـ(castor bean) CA-I , بينما نبات بقول جاك الذي يحوي على لكتين (jack bean) Con- A فيرتبط بالسكرين D- glucose و D- mannose .

واستعمل Anisworth عام (1993) ضمن بحث بعض الانواع النباتية وسجل السكريات المتخصصة بها ، كما في ادناه:

فكان نبات الفول السوداني *Arachis hypogaea* يمتلك سكر متخصص به هو β-D-gal(13)-D-N-acetylgalactosamin,اما نبات بقول جاك *Canavalia ensiformis* فيحوي على سكر متخصص هوα-D-glucose, α-D-mannose , بينما كان نبات الارثرينا *Erythrina corallodendron* حاويا على سكر متخصص من نوعβ-D-gal(1-4)-N-acetyl-glucosamine , في حين ان نبات

الخـروع*Ricinus communis* يمتلـك سـكرا متخصصـا مـن نـوع β-D-galactose,بينما كان نبات الفرنبوش *Tetragonololous purpureas* له سـكر α-L-fucose متخصصا به ,اما
السكر N -acetyl- D- glucosamine N-acetyl neuraminic acid فكـان متخصصا بنبات الحنطة *Triticum vulgris* .

وجاء ضمن بحث لـ(Sollid *et. al.*, 1986) على نبات الحنطة بأن اللكتين الموجود فيهـا يـرتبط مـع سـكر(N-acetyl –D-glucosamine) . ولقـد اشـار Sheeler &Bianichعام (1983) الى طريقة المعاملة الانزيمية المتسلسلة للتعرف علـى طبيعـة السكر المرتبط بـاللكتين، ولكـن فـي هـذه الدراسـة حـددت زاويـة الـدوران النـوعي لكـل مستخلص لكتيني لأجل معرفة نوع السكر الموجود في ذلك النوع اللكتيني .

ونتائـج هذه الدراسـة تظهر بـان السكـر المرتبط بـاللكتين هو كلوكـوز (جدول4-4) . واثبـت فـي الفقـرة 2.1.1 بـأن المحلـول بـروتين ، يبـدو ضـمناً ان الجزيئـات الحيويـة المفصـولة هـي بـروتين كلوكـوزي ، وكـون ان نفس المحاليـل قـد لزنـت بشـكل مباشـر الكريات الحمر لذلك فان المفصول هو بروتين كلوكـوزي ملـزن للخلايـا الحمـراء وهـي صـفات تتـوائم مـع الوصـف الجزيئـي للكتينـات (Sharon & Lis, 2004 ; Arason 1996 ; Shnawa *et. al.*, 2004).

2-5:موديل اختبار الجلد بالملزن الدموي النباتي في الطير:

لقد قام كل من Christe *et. al.*, 2000a ; Christe *et. al.*, 2000b & Christe *et. al.*, 2001 باجراء اختبارات لدراسـة بعض الظواهر البيئية المؤدية الى حدوث تغيرات مناعية داخل جسم الكائن الحي, ولمعرفة مدى كفاءة الجهاز المناعي الواقعة تحت السيطرتين البيئية والوراثية, وقد درست هـذه التجارب باسـتخدام موديـلات مختلفة مثل طائر السنونو المنزلي(house martins) *Delichon urbica* وطائر العقعق (magpie) *Pica pica*وقد استخدمت طريقة قياس جـديدة كمؤشر على كفاءة الجهاز المناعي وهي: قياس معدل سمك جلد جناح الطائر المستخدم في التجربة (Skin test) وذلك باخذ معدل تثخنه قبل عملية الحقن وبعد عملية الحقن بمادة (PHA) في منتصف صفيحة الجناح ومن خلال معرفة الفرق بين القراءتين يتم معرفة مدى ارتفاع معدل الخلايا اللمفاوية كدلالة على استجابة الجهاز المناعي للمادة المحقونة كمحفز للجهاز, وفي تجارب اخرى اجريت من المجموعة نفسهاعلى طائر الخفاش الليلي bat (Myotis myotis) استخدمت الطريقة نفسها في القياس وذلك من خـلال حقـن مادة الملزن الدموي النباتي (PHA) في صفيحة القدم (Foot bad) و بالطريقة السابقة نفسها.

ولكن في هذه الدراسة اختير نوع اخر من الطيور وهو افراخ دجاج اللحم Broiler (chickin) بحسب تصنيف التاريخ الطبيعي والتي كانت بعمر اسبوع واحد وبمعدل وزن طبيعي بحدود (45-65غم), وقد استخدم نظام الاختبار هذا لاجراء عدد من الفحوصات التي طور فيها النظام المستخدم في السابق وذلك من خلال تقويم امكانية استخدام مادة مضادة لخيوط المغزل وهـي مـادة الكولجسين ثم ادخـال مفهوم معامل الانقسام (Mitotic index) الـذي استخدمه عدد من الباحثين مثل:(الخياط, 1999),(الربيعي,1999),(حسن, 2002) واخرين, وكذلك ادخال مفهوم التحري عن تكوين الاورمات اللمفية(Blastogenecity) الذي لم يستخدمه الباحثون المذكورون انفا عند اجراء اختباراتهم, كذلك طور نظام الاختبار لدراسة التحوير المناعي من خلال

استخدام المضاد الحيوي الريفادين واللقاح التيوبركلين, وكذلك استخدمت سيطرتان موجبتان في هذه الدراسة التي تضمنت المادتين PHA وLPS .
ان احد اهداف هذا البحث هو التأكيد والمقارنة بين عدد من فحوصات الوظائف المناعية في الطيور لانها باتت ذات استعمال متزايد في علم المناعة في البحوث المتضمنة لعلم السموم المناعية,علم بيئة الطيورالبرية .
(Dufva & Allander , 1995 ; Merino *et. al* ; 1999 ; Saino *et. al* ; 1997a & b).

ومن هذه الفحوص هي فحص اختبار الجلد, وتعد اختبارات الجلد مناعية وقد تكشف عن استجابة الجسم المناعية او مدى استعداده للمرض اي انه يعبر عن الكفاءة المناعية للجسم (Christe *et. al* ,. 2000 a , b ;Smits & Williams;1999) لذلك تقدر استجابة الخلايا اللمفاوية التائية من خلال قياس تفاعل الجلد الذي يزداد مع ازدياد معدل كتلة الجسم وان العلاقة بين استجابة الخلايا اللمفاوية التائية وحالةالجسم علاقة معنوية موجبة، وتعد هذه الطريقة مؤشر معول عليه لقياس الكفاءة المناعية (Lochmiller *et. al*.,1993) .

ان اختبار الجلد يؤشر على بداية تحفيز الاستجابة المناعية في الخلايا اللمفاوية التائية التي تتكاثر عبر الانقسام الخيطي، وهذا الاختبار يعطي نظرة ملحوظة عن القابلية الوظيفية لتلك الخلايا التائية وبالمقابل فان حجم المجاميع التجريبية يجب ان لايكون كبيرا أي يكون كافياً لكشف التأثيرات الضارة والمؤذية للجهاز المناعي كمواد مزيدة او منشطة للاستجابة المناعية (Smits & Williams; 1999) .

1-2-5 : اختبار الجلد للمحاليل اللكتينية المدروسة :

تعد اللكتينات جزيئات حيوية كبيرة وهي عبارة عن بروتينات كروية Globular proteins ملزنة للخلايا Cellular agglutinins وقادرة على الارتباط بالسكر، أي انها بروتينات سكرية وتكون اللكتينات غير انزيمية ترتبط مع الكاربوهيدرات وتكون ذات اصل غير مناعي, وينشأ عن ارتباط اللكتينات بالخلايا غالباً تأثيرات على الوظيفة الخلوية، مثل حث الخلايا اللمفية على النمو والانقسام وهذا هو التأثير المعروف بالحث المشطر Mitogenic stimulation .

ومن خلال ملاحظة الجدول (6-4) الذي استعمل فيه تراكيز مختلفة للمحلول اللكتيني الخاص لبذور خيار الماء لاجل تحديد الجرعة المثلى منه عند اعطائها للحيوان، يلاحظ بان هنالك ازديادا بنسبة تفاعل جلد الحيوان مع زيادة التركيز المعطى من المحلول اللكتيني وصولاً الى اعلى تركيز جرى تحضيره، فكانت النتيجة لهذا الاختبار هي (1.8 ، 0.7 ، 0.6 مليمتر) للتراكيز الاتية (3.648 ملغرام/مل ، ا ملغرام /مل ، 100 مايكروغرام /مل) حيث لوحظ بان التركيز (3.648 ملغرام / مل) اعطى نتيجة جيدة وهي (1.8 مليمتر) والتي لم تختلف عن مثيلاتها في السيطرة الموجبة المستخدمة وهي PHA و LpS حيث كانا بمقدار(2.0 ، 1.9 مليمتر) على التوالي وقد اشار التحليل الاحصائي لمعامل الارتباط بان هنالك علاقة خطية بسيطة وسالبة وكانت بمقدار (r= - 0.54)، بينما لم تسجل السيطرة السالبة والتي كانت عند المعاملة بمادة دارئ الفوسفات الفسلجي (PBS) أي تغير ملموس في سمك صفيحة الجناح. وقد عد هذا التركيز من المحلول اللكتيني لبذور خيار الماء سيطرة موجبة مع PHA و LPS عند المقارنة مع الانواع الاخرى للمحاليل اللكتينية المدروسة .

وفي الجدول (4-9) الذي استخدم فيه تراكيز مختلفة من المحلول اللكتيني لبذور خيار الماء لوحظ ظهور زيادة في معدل تثخن جلد الحيوان وبصورة تتناسب طردياً مع مقدار التراكيز المستخدمة عند حقن الحيوان بالمحلول اللكتيني المستخدم فكانت معدلات سمك

الجلد هي (1.8 ، 1.2 ، 0.9 مليمتر) للجرع (3.648 ، 1.825 ، 0.9125 ملغم / مل) على التوالي، وهذا ما يتناسب مع مقدار تثخن الجلد باستخدام السيطرة الموجبة للـ PHA و LPS والتي كانت (2.0 ، 1.9 مليمتر) للتراكيز (0.25 ملغرام / مل) لكل منها وهذا ما اكده التحليل الاحصائي باستخدام معامل الارتباط والذي كان بمقدار (r= 1) أي ان العلاقة خطية بسيطة ايجابية، في حين لم يلاحظ أي تغير ملحوظ عند السيطرة السالبة باستخدام مادة الـ (PBS) .

وفي الجدول (4-10)عند استخدام المحلول اللكتيني لبذور نبات البطيخ وبثلاث تراكيز يلاحظ ايضاً زيادة ملحوظة في سمك جلد الجناح عند ازدياد مقدار التركيز المستخدم فكانت العلاقة طردية بين كل من تثخن صفحة الجناح وزيادة تركيز المحلول المستخدم، فقد كان معدل سمك جلد جناح الطير هو (1.6 ، 1.2 ، 0.8 مليمتر) للتراكيز الاتية (5.575 ، 2.787 ، 1.394 ملغم / مل) على التوالي، واوضح التحليل الاحصائي المستخدم فيه معامل الارتباط بان العلاقة خطية بسيطة موجبة وبمقدار (r= 0.86) ، في حين لم تسجل أي نتيجة عند السيطرة السالبة باستخدام مادة الـPBS بان سمك صفيحة الجناح لم يتغير اطلاقاً .

اما الجدول (4 – 11) الذي استخدم فيه المحلول اللكتيني الخاص ببذور نبات الرقي وبثلاثة تراكيز مختلفة والتي كانت كالاتي (1.673 , 0.836 , 0.418)ملغرام/مل فقد لوحظ بان هنالك زيادة ملموسة في سمك جناح الطير مع ازدياد مقدار التركيز المستخدم فقد كانت معدلات سمك الجناح بواقع (1.2 , 1.0 , 0.8 مليمتر) للتراكيز اعلاه على التوالي، ويلاحظ بان هذه المعدلات بدأت تتباعد عما هو ملاحظ في السيطرة الموجبة للـPHA و LPS وخيار الماء أي ان لهذا المحلول اللكتيني تاثير واطئ على الخلايا اللمفاوية التائية. وقد اوضحت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام معامل الارتباط الذي كان بمقدار (r = 0.98) بان هنالك علاقة ايجابية خطية بسيطة بين كل من تفاعل سمك الجلد وبمقدار التركيز المستخدم وحسب التراكيز المدروسة .

وبالنسبة للجدول (4 – 12) عندما استخدم المحلول اللكتيني لبذور نبات الحنظل وبثلاث تراكيز مختلفة سجلت معدلات سمك جلد جناح الطير بعد مرور 24 ساعة وكانت تلك المعدلات كالاتي (1.2 , 1.0 , 0.7 مليمتر) للتراكيز المستخدمة التالية (1.115 , 0.557 , 0.2787ملغرام/مل) على التوالي وهي تبتعد ايضاً عن السيطرة الموجبة المستخدمة وهي PHA و LPS والمحلول اللكتيني لخيار الماء وبالتراكيز التالية (3.648, 0.25, 0.25 ملغرام/مل) وهذا المحلول كمثيله المحلول اللكتيني لبذور نبات الرقي ذو تاثير ضعيف ايضاً مقارنة بالانواع السابقة من المحاليل اللكتينية المدروسة وقد اوضح التحليل الاحصائي لمعامل الارتباط والذي كان = r) (0.95 بان هناك علاقة خطية بسيطة وموجبة بين كل من معدل سمك جناح الطير ومقدار التراكيز المستخدمة تحت الدراسة و بالوقت نفسه لم تسجل أي ينتجه في السيطرة السالبة عند استخدام مادة الـ PBS .

ان نتائج هذه الدراسة تشير الى ان معدل سمك جلد جناح الطير يعتمد على الجرعة أي ان العلاقة طردية بينهما، ويعد هذا الفحص اشارة الى مقدار الكفاءة المناعية (Christ *et .al*., 2000 a,b & Smits & Williams; 1999).

5 – 2 – 2 : اختبار الجلد للسيطرة الموجبة :

أ - LPS:

درس دور الـ Lipopolysaccharied كسموم داخلية في البكتريا السالبة لصبغة كرام بشكل جيد وعرف بان تاثير الـ LPS يكون كمحورا مع وجود البروتين الدهني المصلي (Cavaillion *et .al*., 1990; Munford. *et. al*., 1981) وهذه الحقيقة تؤدي الى شرح التاثير المحور له أي بعد ان يرتبط الدهن - اي (Lipid-A)في الـLPS مع البروتين LAP المتواجد بشكل طبيعي في الغشاء الخارجي. لقد وجد بان جرع الـLPS الاكثر من (3 mg) تكون قاتلة، لذلك فان ارتباط الـLPS مع البروتين وبشكل معقد LAP – LPS (50mg) يكونان جرعة مقدارها (18mg) من LPS والتي تكون غير قاتلة للفئران، ومن الممكن ان يعمل LAP كمستضد مناسب في الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية المدعمة من بعض الباحثين:
(Killion & Mossison ,1998 ; Hepper *et al*., 1979 ; Einstein *et .al*., 1984 & Killion & Mossison, 1986)

لذلك نقارن المستويات العالية لمعقد LAP – LPS مع LPS لان البروتين المرتبط مع الـLPS يسبب زيادة في الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية الذي ينتج فيما بعد المدورات اللمفية Lymphokines ويؤدي الى تنشيط البلعمية الكبيرة .
ويظهر بان البروتينات تثير استجابة الخلايا اللمفاوية التائية وتنشطها وتساعد في عملية الدفاع من خلال زيادة قابلية قتل الخلايا البلعمية عند طرح المدورات اللمفية (Gonzalez *et. al*.,1993) ووجدت دراسات واضحة تشير الى ارتباط البروتينات (بحدود 43KDa – 14) مع جرع الـLPS ولها تاثيرات كمحورات مناعية على الخلايا البلعمية للفئران .
لقد عدت مادة LPS سيطرة موجبة للمقارنة مع الانواع المختلفة للمحاليل اللكتينية لبذور نباتات العائلة القرعية المستخدمة، ويتضح من الجدول (4 – 7) بان هنالك علاقة عكسية بين التراكيز المستخدمة من LPS وبين معدل سمك جناح الطير بعد مرور 24 ساعة من عملية الحقن، اذ ازداد سمك الجلد بنقصان الجرعة المعطاة فكانت(1.1 , 1.7 , 1.9 مليمتر) للتراكيز التالية (1.0 , 0.5 , 0.25 ملغرام/مل) على التوالي، فقد سجلت اعلى نتيجة لتفاعل سمك الجلد عند الجرعة (0.25) ملغرام/مل التي كانت (1.9 مليمتر) وهي متناسبة مع السيطرة الموجبة الاخرى وهي PHA والتي كانت (2.0 مليمتر)، وقد اشار التحليل الاحصائي باستخدام معامل الارتباط بان العلاقة خطيه بسيطه سالبة وبمقدار (r = - 0.99). في التراكيز (1.0 , 0.5 ملغم/مل) كانت الجرعة من LPS ذات تاثير واطئ بالمقارنة مع التركيز (0.25 ملغم/مل) اذ كان له تاثير عال على الخلايا التائية وربما يكون ذلك بان المادة لها فعل سمي خلوي او سمي نسيجي عند تلك التراكيز كذلك كانت طبيعة الفعل معتمدة على مجموعة حيث اظهرت الجرعة من LPS عند التراكيز 0.25 (ملغم/مل) تاثيرا واضحا على معدل سمك الجلد وربما لو قللت الجرعة عن 0.25 (ملغم/مل)لكانت قد اعطيت نتائج بتكرارات اعلى مما في التركيز (0.25 ملغم/مل)
(Shiraishi, 1978; Russo & Levis ., 1992; Allen *et. al*.,1977 & Kappase *et. al*., 1990).
بينما لم تسجل السيطرة السالبة باستخدام مادة PBS أي زيادة او نقصان على معدل سمك الجلد .

ب – PHA:

اكتشف الملزن الدموي النباتي PHA لاول مرة من الباحث Nowell عام (1960) كلكتين مشتق من الفول *Phaseolus vulgaris* ويستطيع ان يستحث الخلايا

اللمفاوية الطبيعية على التحول الى الارومات. حيث كان PHA اللكتين الوحيد الذي له وظيفة تشطيرية سابقاً (Nowell, 1960) . حيث يحتوي هذا اللكتين على مواقع في تركيبة تمكن هذا المشطر من الارتباط بمناطق خاصة على سطح الخلية مثل الكلوبيولينات المناعية، الكلوبيولين الدقيق- β2, ذيول الكاربوهيدرات في السكريات الدهنية او السكريات البروتينية كذلك بعض انزيمات الغشاء مثل الادنيل او كوانيل سايكليز (Adenyl or quanyl cyclase) واشار كل من Meclain وجماعته عام (1974) و Novogradsky عام(1975) بان مادة PHA تستحدث تحفيز الخلايا اللمفاوية التائية المشتقة من التوثة وتقوم بتحفيزها على الانشطار اعتماداً على خصوصية مستقبلات الخلايا السطحية والتي ترسل اشارات من مشطرات مختلفة الى الخلايا اللمفاوية لتشترك بالمسارات النهائية الشائعة، حيث تستحث احداث السطح بعد ارتباط الجزيئات الكبيرة من المشطرات بالمستقبلات الخاصة المشابهة لها والتي تجتمع للبدء بتحفيز الخلايا اللمفاوية (Andersson *et. al*., 1972)

ومن خلال ملاحظة الجدول (4 – 8) الذي تم فيه استخدام مادة PHA كمشطر للخلايا اللمفاوية التائية بان معدل سمك جناح الطير ينخفض عند ازدياد تركيز المادة المستعملة حيث كانت هذه المعدلات هي (1.0 , 1.2 , 2.0 ملمتر) للتراكيز المستخدمة الاتية (1.0 , 0.5, 0.25 ملغم/مل) أي ان العلاقة عكسية بين كل من التركيز المستخدم ومعدل سمك الجلد وقد اوضح ذلك نتيجة التحليل الاحصائي باستخدام معامل الارتباط الذي كان بمقدار(r = - 0.8) بان العلاقة خطية بسيطة سالبة .

ان ملاحظة كون التركيز الاقل (0.25 ملغم/مل) ذو قوة تشطيرية اقوى من التركيزين (1.0 , 0.5 ملغم/مل) ربما يشير الى ان لهذين التركيزين فعل سمي خلوي او سمي نسيجي كونهما مشطرين ضعيفين وربما لو استخدم تركيز اقل من التركيز 0.25 (ملغم/مل) لامكننا ملاحظة نتائج ملحوظة على معدل سمك الجلد أي ان الفعل معتمد على التركيز (Shireishi, 1978; Russo & Levis, 1992; Allen *et. al*., 1977& Kappase *et. al* ., 1990) .

5 – 2 – 3 : اختبار الجلد والتحويرالمناعي:

أ – الريفادين :

يتكون التركيب الكيمياوي للريفادين من مجموعة معقدة من حلقات لاكتيمية كبيرة (Jacob , 1996). ومن خلال ارتباطه بالوحده الجزيئية للانزيم في الكائنات الحيه الحساسة له يستطيع هذا المضاد الحيوي من تثبيط انزيم DNA-dependent RNA (polymerase) وهذا يؤدي الى تثبيط تخليق الرنا RNA في البكتريا، وكذلك يعمل على توليد فرط الحساسية المتأخرة وكذلك يكون خافضا للمناعة الخلوية في الزجاج *In vitro* ويعمل على ابادة نمو البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام . (Jacob , 1996 & Reese *et. al*., 2000).

ان المضادات الحيوية تكون ذات استخدام واسع في معالجة الامراض المختلفة وضمن الحدود المقبولة لان اثارها الجانبية تظهر ضمن هذه الحدود وتنسجم مع فسيولوجية جسم المضيف (Reese *et. al*., 2000) وعند الاستخدام العشوائي او الاعتباطي لهذه المضادات تبدأ الحالات المرضية المتعددة بالظهور، وتشكل الاثار الجانبية المصاحبة لهذا الاستخدام السيئ بتشكيل خطورة على حياة المضيف ولاسيما عند الاستخدام المستمر لها وبدون استشارة طبية، وهذه الاثار الجانبية تكون متعددة: منها ما قد يؤثر على صحة الجنين في الحوامل وهذا الذي يؤدي الى احداث تشوه لدى الجنين Teratogenic (Manson, 1986)، او قد تؤدي الى اظهار اثار على

الاستجابة المناعية، بعد ان اشارت بعض الدراسات والبحوث الحديثة الى ان لهذه المضادات الحيوية قابلية على العمل كمحورات للاستجابة المناعية Immunomodulation، فقد تكون هذه المضادات الحيوية كابحة للاستجابة المناعية Immunosuppressive مثل العقار سايكلوفوسفامايد Cyclophosphamide الذي له القابلية على تحطيم الاعضاء اللمفاوية الاولية بشكل دائم او مؤقت وهذا يؤثر على قابلية الخلايا اللمفاوية البائية في انتاج الاضداد لذلك يعمل على تثبيط الاستجابة المناعية الخلطية الاولية والثانوية(Speirs *et. al.*, 1988), كذلك فان المضاد الحيوي الكلورتتراسايكلين Chlortetracycine له القابلية على تطوير الانسجة اللمفاوية المتصلة بالمعي (GALT) عند الحيوانات(Panigrahy *et. al.*, 1988 & Naji *et. al.*, 1984) او قد تكون للمضادات الحيوية القابلية على تنبيه او تقوية الاستجابة المناعية Immunomstimulator مثل مجموعة مضادات الارثرومايسين Erthromycin وخاصة التايلوسين تارتريت (Tylosin- Tartrate) والتي لها القدرة على رفع كفاءة الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية ; Muneer *et. al*. 1998) (Baba , *et. al.*, &1998 a,b , وقد تبين ان المضادات الحيوية التتراسايكلين Tetracyclinوالامبسلين Ampicillinوالكلورومايسين Chloromycinو ستربتومايسينStreptomycin تستطيع ان تعمل على اختزال نشاط المتمم الحال للدم وبنسبة 50% (CH50) اثناء فترة العلاج هذا ما اكده الباحث (Chakrabarty *et. al* ., 1981) .

وقد اتضح بان المضاد الحيوي الريفادين من ضمن المضادات الحيوية التي تكون كابحة للمناعة الخلوية في الزجاج *In vitro* حيث يعمل على تثبيط تحول الخلايا اللمفاوية الى ارومات لمفية ويعمل على تثبيط انتاج الاجسام المضادة من الخلايا اللمفاوية البائية داخل المزارع الخلوية ويستطيع ان يعمل على تثبيط افراز العامل المثبط لهجرة البلاعم الكبيرة من الخلايا اللمفية (Reese *et. al.*,2000)، وقد اوضح الباحث Shnawa (2001) ان بقايا المضادات الحيوية المحمولة بدم المريض غير السامة (غير المحمية) ذات تاثيرات وراثية سمية تتلخص باستجابة طفرية من نوع طفره المقاومة في المضيف، وبين ان بقايا هذه المضادات بحدود المستويات العلاجية يمكن ان تؤدي الى فعل انسمام مناعيImmuno toxic effect من الناحية الوراثية .

ومن خلال نتائج الدراسة فقد اوضح الجدول (4 – 14) بان هنالك علاقة عكسية بين تركيز المضاد الحيوي المستخدم وبين معدل سمك الجلد ضمن التراكيز المدروسة حيث كانت معدلات سمك الجلد هي :(1.9 , 2.0 , 2.1 , 2.4 , 2.5 مليمتر) للتراكيز الاتية(10 , 20 , 30 , 40 , 50 ملغرام/مل) على التوالي حيث اظهر التركيز(10 ملغرام/مل) تاثيراً كبيراً على تفاعل سمك الجلد يفوق ما هو مثبت في السيطرة الموجة المستخدمة أي ان لهذا المضاد الحيوي قابلية على تثبيط الاستجابة المناعية في الكائن الحي المحفز بالملزن النباتي لخيار الماء وهذا النوع من التثبيط يكون معتمدا على الجرعة المستخدمة Dose dependent وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره (Reese) وجماعته (2000)، كما وتظهر النتائج اعلاه بوجود علاقة خطية بسيطة سالبة بين تراكيز المضاد الحيوي للريفادين ومعدل سمك الجلد من خلال التحليل الاحصائي باستخدام معامل الارتباط الذي كانت قيمته (r = - 0.97).

ب- مستضدات مشتق البروتين المنقى او ذات الوسع المحور للاستجابة المناعية:

تعد البكتريا المخاطية كائنات وحيدة الخلية ومعقدة التركيب متكونة من العديد من المستضدات البروتينية والدهون والشحوم المتعددة. فالمستضدات1, 2 و 3 التي هي: متعدد سكريد ارابينومانان polysaccharied arabinomannan وارابينوكالكتان arabinogalagtanوالكلوكان glucanعلى التوالي, تكون مكونات شائعة في جميع البكتربا المخاطية. اما المستضدات 6, 7و 8 فهي عبارة عن بروتينات واسعة التوزيع, بينما المستضد 5 فهو بروتين سكري يمتلك ذرى مستضدية ظاهرة ووحيدة للـ M. tuberculosis (Grange, 1988).

تتواجد مستضدات(38 kd) في M.tuberculosis و M.bovis فقط, حيث تستحث تفاعلات اختبار الجلد الموجبة(Kadival *et. al*.,1987). ان الاستجابة المناعية الخلوية لمستضدات (38kd)ترتبط مع الامراض النشطة الشائعة, وتختلف عن الاستجابة المناعية لمستضدات البكتريا المخاطية الاخرى مثل (14kd)ومستضدات ESAT. ان تمنيع الفار بمستضدات ESAT-6تستحث مناعة دفاعية ضد الـTB, التي تتوسط بواسطة ESAT-6والببتيدات الخاصة -IFNالتي تفرز بواسطة اخلية التائية(Pathan *et. al*., 2001).

تعد المستضدات الفسفورية مكونات غير ببتيدية مع تراكيب فوسفو استرية phosphoester structureوهي مشتقات كاما لليوراسيل ثلاثي الفوسفات(UTP) ومنقوص الثايمين ثلاثي الفوسفات(dTTP), وهذه المكونات المستضدية تتواجد فقط في M.tuberculosisويتم تمييزها بواسطة الخلايا التائية من خلال (TCR) (Rojas *et. al*.,2002). اما مستضدات (30kd)المعزولةمن M.tuberculosis فهو يظهر حساسية وخصوصية لاختبار الجلد بحوالي (72.3% & 90.9) على التوالي(Selvaraj *et. al*.,2003), بينما مستضدات (38kd) يظهر (84.6%&73.8) على التوالي (Selvaraj *et. al*., 2003) .ان مستضدات (19kd)العائدة لـ M.tuberculosis تعيد تنشيط الخلايا اللمفاوية التائية والتي ترتفع في الـ TBالرئوي الحاد, ويحدث نقصانا في الاستجابة للعلاج(Hohn *et. al*.,2003).

ان عامل التحزمcord factor المرتبط بهيكل جدار الخلية (Fenton & Veremeulen, 1996) يعمل على تثبيط هجرة الخلايا اللمفاوية مسببا ورما حبيبيا مزمنا, ويخدم كونه مساعدا مناعيا(Brooks *et. al*., 2004) .

ان القليل من مستضدات البكتريا المخاطية اللابتيدية المعزولة من M.tuberculosis والتي بوزن جزيئي(500-600D) يمكنها ان تستحث تكاثر الخلايا التائية,وهذا يدعم النظرية القائلة بان بعض الخلايا التائية يمكنها ان تميز مستضدات لابتيدية, خلايا رجعية مقدمة, ومستضدات لابتيدية مقدمة (Mycolic acid & Lipoarabinomannan), التي تكون لازمة لنتشيط الخلايا التائية خلال الاصابة بالـ TB (Fenton&Veremeulen, 1996).

يتضح مما تقدم ان عامل التحزم هو احد مستضدات مشتق البروتين المنقى لبكتريا M.tuberculosis وله فعل مناعي مساعد, أي انه من الممكن ان يؤدي دورا محورا مناعيا سواء كان باتجاه التثبيط او التحفيز وهذه متفقة مع نتائج هذه الدراسة في موديل اختبار الجلد بالملزن الدموي النباتي في الطير (Christe *et. al*., 2000a ; Christe *et. al*., 2000b ; Christe *et. al*., 2001) وتعمل المحورات المناعية بشكل عام عن طريق تهديف المستضد antigen targeting وتنشيط شبكة السايتوكاين وزيادة المساحة السطحية للمستضد (Roitt *et. al*.,2001) .

وعند ملاحظة الجدول(15 - 4) يلاحظ بان هنالك علاقة عكسية بين كل من تركيز التيوبركلين المستخدم وبين معدل سمك الجلد وضمن حدود التراكيز المدروسة, فكانت معدلات سمك الجلد هي: (% 1.8 , 2.1 , 2.2 مليميتر) للتراكيز (3 , 2 , 1 وحدة دولية)على التوالي , وقد اظهر التركيز (1 وحدة دولية) تاثيرا واضحا على معدل سمك الجلد اي ان لهذا المحور المناعي قدرة على تثبيط الاستجابة المناعية لدى الكائن الحي المحفز بالملزن النباتي لخيار الماء وهذا النوع من التثبيط معتمد على الجرعة المستخدمة, وهذا يتفق مع ماذكره كل من (Thestrup – Pedersen, 1975 ; Barksdale & Kim, 1977) عن انخفاض استجابة الجلد بعد حقن PPD حتى عند الكميات القليلة, وقد اكد ذلك التحليل الاحصائي باستخدام معامل الارتباط الذي كان بقيمة r= - 0.96 حيث كانت العلاقة خطية بسيطة وسالبة بين تراكيز المحور المناعي (التيوبركلين) ومعدل سمك الجلد. وحسب ماذكره الباحثون اعلاه بان التيوبركلين له علاقة مع عامل او عوامل تثبيط المناعة التي تطرح عقب قيام التيوبركلين بتحفيز انقسام الخلايا اللمفاوية للحيوانات الممنعة بالـ BCG وهذه التاثيرات التثبيطية تاثيرها المباشر يكون على الخلايا اللمفاوية التائية والبائية.

3-5 : معامل الانقسام Mitotic index:

تنقسم الخلية الجسدية خيطياً الى خليتين بنويتين تحتوي كل منهما على العدد الكروموسومي نفسه للخلية الام وهذه الكمية تتم بخطوتين اولهما انقسام النواة الى نواتين وتسمى بالانقسام النووي وثانيهما انقسام السايتوبلازم وتدعى هذه العملية بالانقسام السايتوبلازمي، وبشكل عام تعد عملية الانقسام مركزاً لعمليتي النمو والتكاثر في الانظمة الحية ويمكن تسميتها ايضاً بدورة حياة الخلية التي تستغرق فترة زمنية تختلف باختلاف الكائن الحي والنسيج والظروف المحيطة . ويمكن حساب معامل الانقسام الخيطي كونه دليلاً يتم حسابه كنسبة بين عدد الخلايا التي تكون في اطوار انقسامية مختلفة الى العدد الكلي للخلايا (منقسمة وغير منقسمة) والتي غالباً ما تكون(1000) خلية(King *et. al*., 1982) (Shubber & Al- Allak, 1986) وقد استخدم هذا الاختبار لتقييم التاثيرات السمية الوراثية للكثير من المركبات الكيميائية، والعوامل الفيزيائية فضلاً عن العقاقير الطبية والمبيدات. وقد وجد Payne وجماعته (1974) ان معاملة الجرذان بعقار CP وبجرعة مقدارها (9.31 ملغم/كغم) من وزن الجسم يؤدي الى انخفاض معامل الانقسام الخيطي بعد (24 ساعة) مع المعاملة، وفي هذا المجال اشار Shubber و Salih (1988) ان عقاري Hycanthone و Praziaquntel المستخدمان في علاج مرض البلهارزيا يحدثان انخفاضاً في معامل انقسام خلايا نقي عظم الفئران. اما عقار الـ MTX فقد ادى هو الاخر الى انخفاض معامل انقسام الخلايا اللمفاوية خارج الجسم الحي – وان التثبيط يزداد بزيادة الجرعة – وفضلاً عن ذلك فقد لوحظ تأثير تضامني لهذا العقار من الكافين عند استخدامهما معاً عند حفظها بدرجة حرارة (42م°) لمدة ساعتين (Maskaleris *et. al*., 1988)، ومن الدراسات التي اجريت خارج الجسم الحي لمعرفة تأثير بعض المبيدات باستخدام الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للانسان ولوحظ تثبيط في معامل الانقسام وبدرجة معنوية (Sobti *et. al*., 1982) .

1-3-5 . معامل الانقسام للمحاليل اللكتينية المستخدمة :

من خلال نتائج الدراسة المبينة في الجداول (4-6) ، (4.-9) ، (4-10) ، (4-11) ، (4-12) يلاحظ بان معامل الانقسام الخيطي للخلايا اللمفاوية يزداد طردياً مع ازدياد

التركيز وضمن التراكيز المدروسة، حيث اظهر الجدول (4-6) بان التركيز (3.648 ملم / مل) كان هذا التركيز الأنسب من بين التراكيز المستخدمة لاجل تحديد الجرعة المثلى من المحلول اللكتيني حيث كان معامل الانقسام الخيطي لهذا التركيز (0.418%) وهو يقارب نتائج السيطرتين الموجبتين المستخدمتين PHA و LPS بتركيز (0.25ملغم/مل) حيث كان معدل الانقسام الخيطي لهما(% 0.571 , 0.51) على التوالي. وقد اظهر معامل الارتباط الذي كان بمقدار(0.76 -= r) بان هنالك علاقة خطيه بسيطة وسالبه بين كل من معامل الانقسام والتركيز المستخدم .

اما الجدول (4 – 9) الذي استخدم فيه المحلول اللكتيني لبذور خيار الماء فقد اظهر التركيز (3.648ملغم/مل) اعلى نتيجة لمعامل الانقسام والذي كان (0.418%) وهو قريب من السيطرتين الموجبتين PHA , LPS وبتركيز (0.25ملغم/مل). وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام معامل الارتباط الذي كان (r = 0.96) وجود علاقة خطية بسيطة موجبة بين كل من التركيز المستخدم ومعامل الانقسام الخيطي للخلايا اللمفاوية .

وكان للمحلول اللكتيني الخاص ببذور نبات البطيخ الموضح في الجدول (4-10) نتائج ايجابية على معدل الانقسام الذي يتناسب طردياً مع التراكيز المستخدمة حيث اظهر التركيز(5.573 ملغم/مل) اعلى نتيجة على معامل الانقسام الذي كان (0.374%) واوضحت الدراسة الاحصائية بان معامل الارتباط بين التراكيز المدروسة ومعامل الانقسام الخيطي بحدود (r = 0.98) أي ان العلاقة بينهما علاقة خطية بسيطة موجبة .

اما المحلول اللكتيني لبذور نبات الرقي فقد اظهر التراكيز (1.673ملغم/مل) اعلى نتيجة على معامل الانقسام في الخلايا اللمفاوية والذي كان (0.287%) أي ان العلاقة بين التركيز ومعامل الانقسام علاقة طردية حيث يزداد معامل انقسام الخيطي بزيادة التركيز المستخدم وهذا ما اكده معامل الارتباط للتحليل الاحصائي والذي كان بمقدار(r = 0.911) بان العلاقة خطية بسيطة موجبة كما هو موضح في الجدول (4 – 11).

بالنسبة للجدول (4 – 12) الذي استخدم فيه المحلول اللكتيني لبذور نبات الحنظل فقد اظهر التركيز (1.115 ملغم/مل) اعلى نتيجة على معامل الانقسام الخيطي للخلايا اللمفاوية وهذا ما هو مشار اليه في الجدول حيث كان معامل الانقسام بمقدار (0.278% وهو يتناسب مع ما اشار اليه معامل الارتباط بان العلاقة خطيه موجبة وبسيطة بمقدار (r = 0.989) بين كل من التركيز المستخدم ومعامل انقسام الخلايا اللمفاوية وبحدود التراكيز المدروسة.

ويتضح من دراسة الجداول بان للمحاليل اللكتينية الخاصة ببذور نباتي الرقي والحنظل قوة تشطيرية ضعيفة مقارنة بالمحاليل اللكتينية الخاصة ببذور نباتي خيار الماء والبطيخ وذلك من خلال مقارنة النتائج مع السيطرة الموجبة باستخدامPHA& LPS لذلك كان ترتيب النشاط المشطر لهذه اللكتينات على الخلايا اللمفاوية من الاعلى للادنى هو (خيار الماء , البطيخ , الرقي ، الحنظل).

ان المستخلصات اللكتينية لبذور النباتات المستخدمة خالية من التاثيرات السمية بالجرع المستخدمة، وهذا ما استنبط من نتائج معامل الانقسام الخيطي للخلايا اللمفاوية في صغار الفراخ، اذ لوحظ انه زيادة تركيز الجرعة من المحاليل اللكتينية تؤدي الى زيادة معامل الانقسام، وهذه النتيجة تتفق مع ما توصلت اليه الخياط (1999) من ان مستخلص نبات الكجرات يؤدي الى زيادة معامل الانقسام، وان الزيادة كانت مقترنة مع زيادة الجرعة، وفي السياق نفسه لاحظ الربيعي (1999) ان المستخلص الكحولي

والمائي للثوم يؤدي الى زيادة معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية، وربما يعزى سبب زيادة معامل الانقسام في الخلايا اللمفاوية الى ان مستخلصات اللكتينية من البذور النباتية لخيار الماء والبطيخ والرقي والحنظل تحتوي على مواد محفزه لعملية الانقسام، ويؤكد هذا الاستنتاج ما اشار اليه الباحث Hag وجماعته(1995) من ان مستخلص حبة البركة تحتوي على مواد محفزه Mitogen) (من خلال قدرتها على تحفيز الخلايا على الانقسام بدون اضافه أي مادة محفزة وهذا الفعل التشطيري يؤكد على تلك المحاليل هي محاليل لكتينية . وكون المادة المستعملة خلاصة نباتية فان الخلاصات النباتية درست على نماذج حيوانية متعددة ووجد بانها تؤي عمل معامل الانقسام (Saino *et. al*., 1997b ; Soler *et. al*., 1999 ; Gonzulez *et. al*., 1999 ;Hu & Zhu, 1990 ; AL- Hussainy ; 1996)

5 – 3 – 2 : معامل الانقسام للسيطرة الموجبة

أ) LPS

عدت مادة LPS المستخلصة من البكتريا السالبة لصبغة كرام كقرينة سيطرة موجبة للمحاليل اللكتينية المختلفة التي تمت دراستها لانها من بين اقدم اللكتينات المكتشفه التي لها تاثير مشطر على الخلايا اللمفاوية. لذلك تم دراسة هذه المادة بثلاثة تراكيز هي(1.0 , 0.5 ,0.25ملغم / مل) واظهرت هذه التراكيز معدلات متفاوته في معامل انقسام الخلايا اللمفاوية تناسبت مع التراكيز المستخدمة كانت هذه المعدلات (0.431 % , 0.46 ,0.51)على التوالي كما موضح في الجدول(4 – 7) ومن خلال ملاحظة هذه النتائج يمكن القول بان التركيز (0.25 ملغم/مل) اظهر فعلا تشطيريا عاليا بالمقارنة مع التراكيز الاخرى وهو يتناسب مع السيطرة الموجبة الاخرى التي تم استعملت مع التراكيز الاخرى وهو يتناسب مع السيطرة الموجبة الاخرى التي استعملت فيها مادة PHA حيث كانت طبيعة الفعل معتمدة على الجرعة ولو استخدمت تراكيز اقل من التركيز (0.25 ملغم/مل) لامكن ملاحظة نتائج بتكرارات اعلى مما في التركيز (0.25 ملغم/مل) . لان لهذه المادة فعلا سمي نسيجي Histotoxicity او سمي خلوي Cytotoxicity عند التركيز الاعلى من (0.25 ملغم/مل) واكد هذه النتائج التحليل الاحصائي لمعامل الارتباط الذي كان بقيمة (r =-0.94) أي ان هنالك علاقة خطية بسيطة وبالاتجاه السالب بين معامل الانقسام الخيطي وبين التراكيز المستخدمة. وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه كل من : (Shiraishi,1978; Ruso & Levis, 1992 ; Allen *et. al*., 1994 & Kappase *et. al*., 1990) ولم تعط السيطرة السالبة باستخدام مادة PBS أي نتيجة ملحوظة على معامل الانقسام الخيطي .

وهذه النتيجة تتفق مع ما توصلت اليه دراسة الخياط(1999) عن مستخلص نبات عرق السوس الذي ادى الى خفض معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم عند التراكيز العالية فقط كما اوضحت دراسة (الربيعي , 2000) بان المستخلص المائي للزعتر يؤدي الى خفض معامل الانقسام بالمقارنة مع السيطرة السالبة غير المعاملة بالمستخلص. وربما يرجع السبب في خفض معامل الانقسام الى ان لهذه المحاليل مركبات كيميائية ذات طبيعة سامة ولا سيما عند التراكيز العالية من خلال تاثيرها على بلمرة خيوط المغزل الامر الذي يؤدي الى خفض نسبة هذا المعامل او ربما تؤثر تلك المركبات بشكل مباشر او غير مباشر على البروتينات المحفزة لعملية الانقسام). Shiraishi, 1978)

ب – PHA

استناداً الى التوصيف القديم من الباحث (Nowell) عام 1960 بان مادة الملزن الدموي النباتي PHA باعتباره اللكتين الوحيد الذي له وظيفة تشطيرية، اعتبرت هذه المادة كقرينة سيطرة للانواع اللكتينية المستخدمة مع نظيره مادةLPS حيث استخدمت مادة PHA بثلاث تراكيز هي : (1.0 , 0.5 , 0.25 ملغم/مل) وقد اظهر التركيز الاقل (0.25 ملغم/مل) قابلية تشطيرية واضحة من خلال ملاحظة معامل الانقسام الخيطي للخلايا اللمفاوية التائية، فكانت هذه المعدلات (0.571 , 0.1425 % 0.278)على التوالي, لذلك كانت العلاقة بين التراكيز المستخدمة وبين معدلات معامل الانقسام علاقة عكسية وقد اثبت ذلك التحليل الاحصائي بان هناك علاقة خطية بسيطة وسالبة من خلال ملاحظة معامل الارتباط الذي كان بمقدار (r =- 0.92) وهذا يدل على ان التركيزين (0.5, 1.0 ملغم/مل) لهما قوة تشطيرية قليلة فقد يكون لها تاثير سمي خلوي او سمي نسيجي على الخلايا اللمفاوية لذلك كان التاثير معتمد على التركيز المستخدم كما مبين في الجدول(4 – 8) . ولو امكن استخدام تراكيز اقل من التركيز (0.25 ملغم/مل) لامكن الحصول على نتائج جيدة اعلى من النتائج المستحصل عليها باستخدام التركيز (0.25 ملغرام/مل).

(Shiraishi ,1978 ., Russo & Levis, Allen *et. al* ., 1994 & Kappase *et. al*., 1990) .

وهذه النتيجة تتفق مع ما توصلت اليه كل من دراسة الخياط (1999) والربيعي (2000) بان مستخلصات نبات عرق السوس والمستخلص المائي للزعتر تؤدي الى خفض معامل الانقسام الخيطي وبالتراكيز العالية، وهذا الامر ربما يعود الى ان لهذه المحاليل مركبات كيمياوية تؤثر بشكل مباشر او غير مباشر على البروتينات المحفزة عند التراكيز العالية (Shiraish, 1978).

5 – 3 – 3 : معامل الانقسام والتحوير المناعي

أ - الريفادين

اثبتت الدراسات والبحوث الحديثة ان للمضادات الحيوية قابلية على العمل كمحورات للاستجابة المناعية (Immunomodulation) استخدم المضاد الحيوي لخمسة تراكيز وهي (10,20,30,40,50 ملغم/مل) كما مبين في الجدول (4-14) ودرست قابليته على معامل الانقسام وسجلت المعدلات التالية (0.79 , 0.886, 0.52% 0.547 , 0.573) على التوالي، وقد لوحظ من خلال الجدول (4-14) بأن التركيز (10 ملغم / مل) كان هو التركيز الامثل اذ سجل اعلى معدل لمعامل الانقسام الخيطي على الخلايا اللمفاوية التائية والذي كان بمعدل (0.886%) وهو يفوق ماتم تسجيله في السيطرة الموجبة باستخدام (LPS , PHA) وقد اكد ذلك نتائج التحليل الاحصائي بأن العلاقة خطية بسيطة وسالبة حيث كان معامل الارتباط بمقدار (r=-0.93) أي ان هذا المضاد الحيوي يكون ضمن المضادات الحيوية الكابحة للمناعة الخلوية كما اشار الباحث (Roose *et. al*.,2000) بانه يعمل على تثبيط تحول الخلايا اللمفية الى اورمات لمفية في الطير المحفز بالملزن النباتي لخيار الماء وكذلك اكدت الباحثة (AL-Gebori) عام 2003 بأن المضاد الحيوي الريفادين له القابلية على تثبيط انتاج الضد من قبل الخلايا البائية في الكائن الحي وهذا النوع من التثبيط معتمد على الجرعة المستخدمة (Dose dependent).

ب- مشتق البروتين المنقى(التيوبركلين):

لقد استخدم التيوبركلين في هذه الدراسة باعتباره محورا للمناعة ومؤثرا على الخلايا التائية وقد استخدمت ثلاثة تراكيز منه هي(3 , 2 , 1 وحدة دولية) ووجد بان التركيز(1 وحدة دولية) قد اعطى نتائج واضحة على معامل الانقسام التي كانت (% 0.484 ,0.726 , 0.83) للتراكيز المذكورة اعلاه وعلى التوالي, وحسب ماذكره كل من (Thestrup – Pedersen, 1975 ; Barksdale & Kim, 1977) بان للتيوبركلين علاقة مع عامل او عوامل تثبيط المناعة التي تطرح عقب تحفيز انقسام الخلايا اللمفاوية التائية والبائية قد تبين من التحليل الاحصائي بان هنالك علاقة خطية بسيطة وسالبة بين تراكيز التيوبركلين المستخدمة في الدراسة ومع معامل الانقسام حيث كانت قيمة معامل الارتباط هي (r = - 0.98) كما مبين في الجدول (4 – 15), اي ان هنالك علاقة عكسية بين تراكيز التيوبركلين المحضرة وبين معامل الانقسام للكائن المحفز بالملزن النباتي لخيار الماء.

5 - 4 : تكوين الارومات اللمفية :

ان عملية تحويل الارومات (Blast transformation) تبدأ عند الساعة الاولى للتحفيز حيث يرتفع مستوى الاكسدة الضوئية وجميع البروتينات وعليه ترتفع عملية تخليق الرنا RNA في الخلايا اللمفاوية، ويظهر الكروماتين بكثافة قليلة مع وجود جينات ساكنة وتبدأ الخلية باحداث الانقسام، وبعد 2 - 4 ساعة فان بروتينات خاصة بعملية تنظيم تكاثر الخلية تصبح واضحة في النوية وهنا تبدأ مظاهر التحول للارومات بالظهور حيث يزداد قطر الخلية الى (μ_m 15 - 30) ويكبر حجم النواة والسايتوبلازم ويصبح كروماتين النواة قليلا وشاحب اللون، وخلال8-12 ساعة تبدأ الخلية اللمفية بالانقسام وتحدث عملية التضاعف للدنا DNA بحوالي 18-24 ساعة بعد عملية التحفيزداخل الحي، لذلك ستنتج خلايا فعالة متعددة كنتيجة لكل انقسام كامل خلال ايام قليلة ويمكن لهذه الخلاياان تعبر عن الوظائف المناعية بشكل نموذجي بعد عدة ايام لاحقة من التحفيز (Parslow *et. al.*,2001).

ويعد التحول الى الارومات اللمفية احد معايير الكفاءة المناعية في الصحة والمرض وفي هذه الدراسة فان اللكتينات المفصولة تعكس قابليتها على تشطير الخلايا (Christe *et. al.*,2001;Christe *et. al.*, 2000a& Christe *et. al.*, 2000b).

5-4-1: تكوين الارومات اللمفية للمحاليل اللكتينية المدروسة :

يلاحظ في الجدول (3-5) الذي استخدم فيه تراكيز مختلفة من المحاليل اللكتينية لبذور نبات خيار الماء لاجل تحديد الجرعة المثلى من المحلول المعطى لفراخ الطيور بان العلاقة بين معدل تكوين الارومات اللمفية والتراكيز المستخدمة علاقة طردية تزداد بازدياد التركيز المستخدم حيث كانت معدلات تكوين الارومات اللمفية (% zero, 0.02 , 0.096) للتراكيز التالية: (3.648 ملغم/مل ، 1ملغم/ مل 100 مايكروغرام/ مل). وقد اظهر التركيز (3.648ملغم /مل) قابلية تشطيرية واضحة مقارنة بالسيطرة الموجبة باستخدام مادتي PHA و LPS واكد هذه النتائج التحليل الاحصائي لمعامل الارتباط الذي كانت قيمته (r=-0.64) أي ان العلاقة خطية بسيطة وسالبة بين كل من معدل تكوين الارومات اللمفية ومقدار التركيز المستخدم .

اما الجداول (4-9) ، (4-10) ، (4-11) ، (4-12) التي استخدمت فيها محاليل لكتينية لبذور نباتات خيار الماء، البطيخ، الرقي، الحنظل على التوالي فقد اظهرت بان العلاقة بين عملية تكوين الارومات اللمفية والتراكيز المستخدمة علاقة طردية تتناسب مع مقدار الزيادة في التركيز المستخدم ولكن الاختلاف كان في القابلية التشطيرية ومن خلال

النتائج كان ترتيب هذه المحاليل اللكتينية حسب قوتها التشطيرية وتكوينها للارومات اللمفية من الاعلى الى الادنى هي :
(خيار الماء – البطيخ – الرقي – الحنظل).
وبين التحليل الاحصائي لمعامل الارتباط بان العلاقة بين التراكيز المستخدمة وبين عملية تكوين الاورومات اللمفية هي علاقة خطية بسيطة موجبة .
ويستدل من النتائج بان المحاليل اللكتينية المستخدمة ليس لها تأثيرات سمية على الخلايا اللمفاوية وبالتراكيز المستخدمة، اذ لوحظ زيادة عملية تكوين الاورومات اللمفية لزيادة الجرع المستخدمة وهذا يتفق مع ما اشار اليه كل من الخياط (1999) والربيعي (2000). وربما لو زيدت التراكيز المستخدمة لامكن التوصل الى التركيز السام للخلايا اللمفاوية من خلال تاثيره على تثبيط الانقسام الخيطي وتكوين الاورومات اللمفية .

2-4-5 : تكوين الاورومات اللمفية في السيطرة الموجبة

أ- LPS

بعد ان اعتبرت مادة LPS كسيطرة موجبة للانواع المختلفة من المحاليل اللكتينية المدروسة وسجلت معدلات تكوين الاورومات اللمفية بعد استخدام ثلاثة تراكيز من هذه المادة هي (1.0 ، 0.5 ، 0.25 ملغم/مل) وسجلت معدلات تكوين الاورومات اللمفية والتي كانت كالآتي: (0.025% ، 0.032 ، 0.05) على التوالي ويلاحظ بان العلاقة بين التراكيز المستخدمة وعملية تكوين الاورومات اللمفية هي علاقة عكسية ويؤكد ذلك التحليل الاحصائي بعد ان استخدم معامل الارتباط الذي كان بمقدار (r = -0.905) بان العلاقة خطية بسيطة وسالبة .

ومن خلال النتائج يتضح بان التركيز الاقل (0.25 ملغم/مل) اظهر قابلية تشطيرية عالية على عملية تكوين الاورومات اللمفية والتي كانت مقاربة لما تم تسجيله في السيطرة الموجبة الاخرى باستخدام مادة PHA، ربما يعود السبب بكون التركيزين الاعلى (1.5 ، 0.5 ملغم/مل) ذات قوة تشطيرية قليلة الى ان لهذه التراكيز قابلية سمية تؤثر على الخلايا اللمفاوية وتمنعها من الانقسام لذلك يجب تجريب التركيز الاقل من التركيز (0.25 ملغم/مل) اذ يعتقد بانها سوف تعطي نتائج اكثر ايجابية .

ب- PHA

تقوم مادة الملزن الدموي النباتي وغيرها من اللكتينات المشطرة على تحفيز الخلايا اللمفاوية على النضوج والانقسام والتحول الى خلايا ارومة بنموذج مشابه الى الخلايا المحفزة بواسطة المستضدات داخل الزجاج (Andersson & Melchers, 1973).

يلاحظ من خلال الجدول (4-8) بان هناك علاقة عكسية بين كل من التراكيز المستخدمة من مادة (PHA) وبين معدل تكوين الاورومات اللمفية وحسب التراكيز المدروسة فقد اظهر التركيز (0.25 ملغم/مل) قوة تشطيرية على معدل تكوين الاورومات اللمفية فقد كان بمعدل (0.037%) وهو مقارب لما عليه في السيطرة الموجبة الاخرى باستخدام مادة (LPS), وظهر من التحليل الاحصائي ان العلاقة خطية بسيطة وسالبة لان مقدار معامل الارتباط كان بمقدار (r=-0.93) بينما تسجل أي نتيجة في السيطرة السالبة باستخدام مادة (PBS). ان التركيزين (0.1 ، 0.5 ملغم/مل) ذات قوة تشطيرية اقل مما عليه في التركيز الاقل (0.25 ملغم/مل) ربما بسبب الفعل السمي الخلوي او النسيجي لهذه التراكيز صعوداً، لذلك يعتقد بان التراكيز الاقل من التركيز (0.25 ملغم/مل) ربما تعطي نتائج ملموسة اكثر. حيث اثبتت القابلية التشطيرية لهذه المادة من الباحث (Nowell) عام (1960) .

3-4-5 : تكوين الارومات اللمفية والتحوير المناعي :

أ- الريفادين

اظهر الجدول (4-14) باستخدام تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي الريفادين قابلية تثبيطية للمحور المناعي على الكائن المحفز بالملزن النباتي لخيار الماء وقد استخدم المحور بخمسة تراكيز هي(50 ، 40، 30 ، 20 ، 10 ملغم/مل) ودرست قابلية هذا المضاد على عملية تكوين الارومات اللمفية والتي كانت (0.016% ، 0.025 ، 0.039 ، 0.047 ، 0.05) حيث اظهر التركيز الاقل(10 ملغم/مل) قابلية واضحة على معدل تكوين الارومات اللمفية تقارب السيطرة الموجبة باستخدام مادتي (LPS , PHA) وكذلك المحلول اللكتيني لخيار الماء بتركيز (3.048 ملغم/مل)، فكانت هناك علاقة خطية بسيطة وسالبة بين كل من التراكيز المستخدمة ومعدل تكوين الارومات اللمفية من خلال قيمة معامل الارتباط والتي كانت (r=- 0.41) وهذه النتائج تتفق لما اشار اليهRoss وجماعته عام (2000) بان لهذا المضاد الحيوي قابلية كابحة للمناعة الخلوية، كما اشارت AL-Gebori عام (2003) الى وجود القابلية التثبيطية لهذا المضاد على انتاج الاضداد من الخلايا البائية في الكائن الحي وهذا النوع من التثبيط معتمد على الجرعة المستخدمة (Dose dependent) .

ب- مشتق البروتين المنقى (التيوبركلين):

كنظائره من المواد المستخدمة في الدراسة تمت دراسة معدل تكوين الارومات اللمفية للتيوبركلين وبثلاثة تراكيز هي(3 , 2 , 1 وحدة دولية) ومن خلال ملاحظة الجدول (5 – 13) كانت معدلات تكوين الارومات اللمفية كالاتي (0.06, 0.049, 0.03 %) وعلى التوالي, ووجد بان التركيز (وحدة دولية واحدة) قد اظهر قابلية واضحة على تكوين الارومات اللمفية اي ان لهذه المادة فعلا مثبطا على تحول الخلايا اللمفية للارومات وبشكل معتمد على الجرعة اي كلما ازداد التركيز كلما قلت القابلية على تكوين الارومات, وهذا يتفق مع ماذكره كل من (Thestrup – Pedersen, 1975 a; Barksdale & Kim, 1977) بان هنالك انخفاضا معنويا على استجابة الخلايا اللمفاوية لتكوين الارومات اللمفية في الكائن المحفز بالملزن النباتي لخيار الماء بعد الحقن بمشتق البروتين المنقى, ومن خلال التحليل الاحصائي وجد بان هنالك علاقة خطية بسيطة وسالبة بين التراكيز المحضرة من التيوبركلين وبين تكوين الارومات اللمفية حيث كان معامل الارتباط بقيمة (r = - 0.98) .

ss

الاستنتاجات Conclusion

1. اشارت الدراسة الى ان اللكتينات المفصولة بكبريتات الامونيوم لها القدرة على تلزين كريات الدم الحمراء للاغنام وبعيارية عالية وهذه اولى صفات اللكتينات.
2. من خلال تقدير كمية البروتين باستخدام طريقة بايوريت اتضح بان المحلول اللكتيني للبذور النباتية المستخدمة سجلت قراءات مختلفة تدل على وجود بروتين (بضمنه مادة اللكتين) وهذا دليل على ان المادة المفصولة قادرة على التفاعل مع محلول بايوريت أي انها بروتين.
3. اظهرت نتائج الدراسة بأن طبيعة السكر في جزيئة اللكتين هو كلكوز.
4. تبين بان هنالك علاقة طردية بين التراكيز المستخدمة للمحاليل اللكتينية المختلفة ومع عملية تشطيرالخلايا اللمفاوية وضمن التراكيز المدروسة مقارنة بالسيطرة المستعملة.
5. يتضح بان هنالك علاقة عكسية بين كل من المضاد الحيوي الريفادين وبين تشطير الخلايا اللمفاوية التائية, أي ان لهذه المواد فعلا تثبيطيا على انقسام الخلايا اللمفاوية وهو من النوع المعتمد على التركيز وضمن التراكيز المدروسة أي ان اللكتينات المستخدمة محفزة لانتاج المناعة الخلوية.
6. امكانية استخدام نموذج افراخ الدجاج في دراسة القابلية التشطيرية للكتينات ودراسة التحوير المناعي بهذا النموذج.

التوصيات

محاولة الحصول على محلول لكتيني ذي نقاوة عالية والكشف عن امكانية عمله كمشطر للخلايا اللمفاوية لمدى تركيزي اوسع من التراكيز المدروسة لتحديد الجرعة السامة الخلوية او النسيجية, وتحديد الجرعة المثلى لتشطير الخلايا اللمفاوية.

المصادر العربية

الخياط، بشرى محمد امين.(1999). دراسة القابلية التطفيرية والمضادة للتطفير لبعض النباتات الطبيـــة العراقيـــة. اطـــروحة دكتوراه، كلية التربية(ابن الهيثم)، جامعة بغداد.العراق.

الربيعي، عباس حسين مغير. (1999). دراسة تاثير مستخلصات الثوم في تثبيط الفعل التطفيري لفوسفيد الخارصين واشعة كاما. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بابل. العراق.

السعد، مها رؤوف وطارق الزبيدي. (1991). علم المناعة.ص: 128 – 130.

الكبيسي، خالد.(2001).علم المناعة والامصال.ص: 37 – 50. الطبعة الاولى، دار الصفاء للنشر والتوزيع، عمان.

الماشطة، سنان عبد اللطيف محمد.(2003). لكتينات بذور بعض النباتات باعتبارها ملزنات ومحورات مناعية. رسالة ماجستير، كليـــة العلـــوم، جامعة بابل. العراق.

حسن، مفيد قائد احمد.(2002). استخدام بعض المستخلصات النباتية لتثبيط الاثر السـمي الوراثـــي لبعض العقاقير المضادة للســـرطان في الفار. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بابل. العراق.

خليفة، احمد خليفة.(1990). اسس علم المناعة.ص: 17 – 115.

References

Abe, J. , J. Forrester, T. Nakahara, J. A. Lafferty, B. L. Kotzin, & D. Y. Leung. (1991). Selsctive stimulation of human T-cells with Streptococcale erythrogenic toxins A and B. J. Immunol. 146: 3747-3750.

Ainsworth, A. J. (1993). Carbohydrate and lectin interactions with Edwardsiella ictaturi and channed catfish, Ictalurus punctatus(Rafinesgue), anterior kidney leucocytes and haepatocytes. J. Fish Dis. , 16: 449-459.

AL-Huseini, W.A.H.(1995).The cytogenetic effects of some Rodenticides on the laboratory mouse.A thesis of M.S.C. IN al-Haetham .Bagdad Univercity. Bagdad.

AL-Gebori, S. A. K. (2003). Adrug and chemical induced experimental lapin immunomodulation. Msc thesis. Babylon University, Babylon.

Allen, J. ; C. Shaler & S. A. Latt. (1977). Asimplified technique for in vivo analysis of SCE using S-Brdu tablets. Cytogen-cell Genet. 18: 231-239.

AL-Mashta, S. A. M. (2003). Lectins of some plant seeds as agglutinins and immunomodulants. Msc thesis. Babylon University, Babylon.

Ames, B. N. & Gold, L. S. (1990). Chmecal Carcinoginesis: Too many rodent carcinogens. An Internet Lecture. Natl. Acad. Sci. USA: 1-12.

Andersson, J. & Melchers, F. (1973). Lectins as mitogens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70: 416.

Andersson, J. , Edelman, G. M. , Moller, G. , and Sjoberg, O. (1972). Activities & Structure of lymphocyte mitogens. Eur. J. Immunol. , 2: 233.

Arason, G. J. (1996). Lectins as defence molecules in vertebrates and in vertebrates. Fish & Shellfish Immunol. , 6: 277-289.

Aubry, J. ; Zachanism, A. ; Simonin. G. & Paraf, A. (1979). New data on the mechanism of action of immuno-adjuvants. Veterinary Science Com. 2, 265-276.

Baba, T. ; Yamashita, N. ; Kodama, H. ; Mukamoto, M. ; Asada, M. ; Nakamoto, K. ; Nose, Y. & Mcgruder, E. D. (1998a). Effect of Tylosin Tartarate on humoral immune response in chickens. J. Vet. Med. , 45: 279-286. Black-Well Wissenchafts-Verlage, Berlin.

Baba, T. ; Yamashita, N. ; Kodama, H. ; Mukamoto, M. ; Asada, M. ; Nakamoto, K. ; Nose, Y. & Mcgruder, E. D. (1998b). Effect of Tylosin Tartarate (Tylan soluble) on cellular immuner response in chicken. Pou. Sci. , 77: 1306-1311. Black-Well Wissencharts-Verlag. Berlin.

Barksdale, L. & Kim, K.S.(1977).Mycobacterium. Dep. of Microbiology . Vol. 41. New York.

Baron , E. J. & Finegold, S. M. (1990). Baily & Scotl's diagnostic microbiology 8th ed, E. J. Baron & S. M. Finegold(eds.), P: 249-257. Mosby-Year Book Inc. , London.

Baum, M. K. ; Posner, G. S. & Campa, A. (2000). J. Nutr;130: 1421S-1423S.

Berntrop, E. & Nilsson, I. M. (1996). Immunotolerance and the immune modulathion protpcol. Vox. Sang. , 70(1): 36-61.

Biselli, R. ; Matricardi, P.M. ; Amelio, R.D. & Fattorossi, A.(1992).Multiparametic Flow Cytometric Analysis Of The Kinetics Of Surface Molecule Expression After Polyclonal Activation Of Human Periphral Blood T- Lymphocytes. Scand. J. Immunol. 35: 439 – 447.

Bishop, M. C. ;Dben-Von Laufer, J. L. ;Fody, E. P. & Thirty three conterbutors. (1985). Clinical Chemistry, Principles, Procedures and Correlation's. The Murray Printing Company, Philadelphia.

Blecka, F. (1988). Immunomodulation: ameans of disease prevention in stressed livestock. J. Anim. Sci. , 66: 2084-2090.

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

Blecka, F. B. & Backer, P. E. (1986). Effect of cortisol in vitro and in vivo on production of bovine interlukin-2. Am. J. Vel. Res. , 47: 841-845.

Brooks, G. F. ; Butel, J. S. & Morse, S. A. (2004). Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology, 23th ed. , pp: 279-289. Alange Medical Book, Middle East Edition. Appelton and Lange, California.

Bruno, T. F. ; Buser, D. E. ; Syme, R. M. ; Woods, D. E. & Mody, C. H. (1998). *Pseudomonas aeroginosa* Exoenzyme S Is amitogen but not asuperantigen for human T-Lymphocytes. Infect Immun. P. 3027-3079, Vol. 66, No. 7. Canada.

Burger, R. , *et. al*. (1998). Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Intl. J. Immunopharmacol. 19(7): 371.

Cavaillion, J. M. ; Fitting, C. ; Haeffner, C. N. ; Kirsch, S. J. & Warren, H. S. (1990). Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein bound LPS. Infect Immune; 58: 2375-2382.

Chakrabarty, A.K. ; Saha, K. ; Sen, P. ; Sharma, K.K. & Agarwal, S.K.(1981).Effects of antibacterial agents on the complement system.Immunopharmacol, 3: 281 – 287.

Chandra, R. K. (1997). Nutrition and the immune system: an introduction. Am. J. Clin. Nutr. 66: 460. S-463. S[Abstract].

Chen, C. & Billingsley, P. F. (1999). Detection and characterization of amannan-binding lectin from the mosquito, *Anophles stepheni* (Liston). Department of Zoology . Eur. J. Biochem. 263, 360-366.

Chiller, J. M. ; Skidmore, B. J. ; Morrison, D. C. & Weigle, W. O. (1973). Bacterial lipopolysaccharide and mitotic activity. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 70: 2129.

Christe, P. ; Moller, A. P. ; Saino, N. & De Lope, F. (2000b). Genetic and enviromental components of phenotypic variation in immune response and body size of acolonial bird, *Delichon urbica*(the house martin). Heredity 85, 75-83.

Christe, P. ; Arlettaz, R. & Vogel, P. (2000a). Variation in intensity of aparasitic mite(*Spinturnix myoti*) in relation to the reproductive cycle & immunocompetance of it is (*Myotis myotis*). Ecology Letters 3: 207-212.

Christe, P. ; DeLope, F. ; Gonzalez, G. ; Saino, N. & Moller, A. P. (2001). The influence of environmental condition on immune responses, morphology and recapture probability of nestling house martins(Delichon urbica)Oecologia 126: 333-338.

Clark, J.M. & Switzer, R.L.(1977).Experimental biochemistry.2nd., p:147 -148.University of iLioil, Sanfrancisco.

Cooper, E.L.(2002).ComparitiveImmunology.Laoratory of comaritive Immunology. Dep. Of Neurobiology.California, 90095 – 1763, USA.

Cooper, E.L.(1982).General Immunology. J.Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease. Oxford.

Confer, A. W. & Adldinger, H. K. (1981). The in vivo effect of levamisol on phytohaenagglutination stimulation of lymphocyte in normal and Marek's disease virus inoculated chickens. Res. Vet. Sci. , 30: 243-245.

Coutinho, A. & Moller, G. (1974). Lipopolysacchride from G-ve bacterial and lymphocytes mitogenic. J. Immunol. , 3: 133.

De Lope, F.; Moller, A. P. & Delacruz ,C. (1998). Parasitism immune response and reproductive success in the house martin *Delichon urbica*. Oecologia, 114, 188-193.

Dellabona, P. ; Peccoud, J. ; Kappler, J.; Marrack, P. ; Benoist, C. & Mathis, D. (1990). Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. J. Cell. 62: 1115-1121.

Dufva, R. & Allander, K. (1995). Intraspecific variation in plumage coloration reflects immunresponse in great tit(*Parus major*) males. Funct. Ecol. , 9. 785-789.

Einstein, T. K. ; Killar, L. M. ; Sultzar, B. M. (1984). Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*. Mouse strain difference in vaccine and serum mediated protection. J. infect Dis; 150: 425-435.

Farber, E. (1990). Chemical Carcinogenesis. Biochem. Pharmacol. 39, 1837-1847.

Fenton, M. J. & Vermeulen, M. W. (1996). Immuno-pathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. J. of Infection and Immunity 64(3): 683-690.

Fudenberg, H. H. ;Stites, D. P. ;Caldwell, J. L. & Well, J. V. (1976). Basic and clinical immunology. 2nd ed. , Large Medical Publication. Midlle East Eddition, Lebanon.

Galanos, S. C. ; Rietschel, E. Th. ; Luderitz, O. & Westphal, O. (1971). The mitogenic activity of bacterial lipopolysaccharide as aprobe for T-cell function. Eur. J. Biochem. 19: 143.

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

Gershwin, M. E. ; Beach, R. S. & Hurley, L. S. (1985). Nutrition and Immunity. Academic Press, Orlando.

Goldstein, H. J. & Hayes, C. E. (1978). The lectins: carbohydrate binding protin of plants and animals. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. , 35: 127-340.

Golub, E. S. & Weigle, W. O(1967). Lymphocytes mitogenesis. J. Immunol. , 98: 1241 .

Gonzalez, C. R. ; Isibasi, A. ; Ortiz-Navarrete, V. ; Paniagua, J. ; Garcia, J. A. ; Blanco, F. & Kumata, J. (1993). Lymphocyte proliferative response to OMPs isolated from *Salmmonella*. Microbiol Immunol, 37: 793-799.

Gonzalez, G. ; Sorci, G. ; Moller, A. P.;, Ninni, P. ; Haussy, C. & Lope, F. De. (1999). Immunocopetence & condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows(*Passer domesticus*). J. Anim. Ecol. , 68: 1225-1234.

Grange, J. M. (1988). Mycobacteria and Human disease. Edward Arnold, London.

Greaves, M. F. & Bauminger, S. (1972). Structure and activities of lymphocyte mitogens. Nature New Biol. , 235: 67.

Hepper, K. ; Garman, R. D. ; Lyons, M. F. & Teresa, G. W. (1979). Plaque forming cell response in Balb/C mice by two preparations of LPS extract from *S. enteritidis*. J. Immunol; 122: 1290-1293.

Hohn, H. ; Kortsik, C. ; & Tully, G. (2003). Longitudinal analysis of *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa antigen-specific T-cells in patients with pulmonary tuberculosis: association with disease activity and cross-activity to apeptide from HIVenv gp. 120. European Journal of Immunology 33(6): 1613-1623.

Hu, O. & Zhu, S. (1990). Fnduction of ch. ab. in, male mouse. Mut. , Res. 244: 209-214.

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

Tizard, I.(1986).(Translated by: Dr. Moayad Sawa).An Intoduction To Veternary Immunology. Mosel Univercity.

Items from Regional Cancer Centre. (2004). Lectins as diagnostic tools. [Abstract].

Iverson, O. H. (1988). Theories of carcinogenesis. Hemisphere Publishing, Washington, D. C.

Jacob, L. S. (1996). Pharmacology. 4th ed. , Mass publishing company, Dokki, Giza, Egypt.

Jafri, S. (2004). Modeling the calcium-dependent activation of T-lymphocytes. School of Compulational Sciences. P: 4-30.

Johnstone, A. & Thorpe, R. (1982). Immunochemistry in practice. Blach Well Scientific Publication, London.

Juy, D. & Chedid, L. (1975). Comparison between macrophage activation and enhancement of non-specific resistance to tumors by mycobacterial immunoadjuvants. Pro c. Nat. Acad. Sci. USA, 72: 4105-4109.

Kadival, G. V. ; Chaparas, S. D. & Hussong, D. (1987). Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38 kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. The J. of Immunology 139(7). 2447-2451.

Kappase, A. ; R. Vachkova; S. Lacher & M. Tzoneve. (1990). Genotoxicity, Studies on the OPP. Mut. Res. 240: 303-208.

Killion, J. W. & Morrison, D. C. (1986). Protection of C3H / He J mice from lethal *Salmonella typhimurium* LT2 infection by immunization with lipopolysaccharide Lipid –Aassociated proten complex. Infect Immun. ; 54: 1-8.

Killion, J. W. & Mossison, D. C. (1998). Determinants of immunity to murine Salmonellosis: Studies in volving immunization with lipopolysacchariedlipid A-associated protein complexes in C3H / He J mice. FEMS Microbiol. Immunol; 1: 41-53.

King, M. T. ; Wild, D. ; Gocke, E. & Eckhardt, K. (1982). 5-Bromodeoxy uridintablets with improved depot effect for analysis in vivo of SCEs in bone marrow and spermatogonial cells. Mutat. Res. , 97: 117-129.

Kishimoto, H. C.; D. Surh, & J. Sprent. (1995). Uperculation of surface markers on dying thymocytes. J. Exp. Med. 181: 649-655.

Kolberg, J.(1992).Monoclonal Antibodies Against Rice Bran Lectin. J.Biol. Chem. Hoppe- Seyler, 373: 77- 80.

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

Lefferts, L. Y. (2000). Pesticide residues variability and acute dietary risk assessment : a consumer cerspectiv. Food Additives and Contaminant, 17(7): 511-517. Taylor and Francis Ltd.

Licastro, F. ; M. Chiricolo; L. Barbieri; F. Strip; A. Falasca; C. A. Ross, & C. Franceschi. (1993). Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T-lymphocytes affect immune responses. Int. J. Biochem. 25: 845-852.

Licastro, F. ;Mocchegiani, E. ; Zannotti. M. ; Arena, G. ; Masi, M. & Fabris, N. (1992). Zince effects the metabolism of thyroid hormones in children with Down's syndrome: normalization of thuroid stimulatiog hormone and of reversal triiodothryonine plasmic levels by dietary zinc supplementation. Int. J. Neurosci. 65: 259-268.

Lochmiller, R. L. ; Vestey, M. R. & Boren, J. C. (1993). Relation ship between protin nutritional status and immunocompetance in northem bobwhite chicks. Auk, 110, 503-510.

Louis, J. A; Chiller, J. M. & Weigle, W. O. (1973). Mitogenesis in immunobiology. J. Expt. Med. , 138: 1481.

Lu, L. -J. W. ; Liehr, J. G.; Sirbasku, D. A. ; Randerath, E. & Randerath, K. (1988). Too many rodent carcinogens. Carcinogenesis 9, 925-929.

Luderitz, O. ; Wastphal, O. ; Staub, A. & Nikaido, H. (1971). In microbial tpxins. By G Weinbaum, S. Kadis and S. J. Ajl, A cadpress, Vol-4. P. 145. NewYork.

Maino, V. C. ; Suni, M. A. & Ruitenberg, J. (1995). Rapid fiow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. Cytometry 20: 127-133.

Manson, J. M. (1986). Teratogens. In: Klaassen, C. D. ; Amdur, M. D. & Dull, J. (eds). Toxicology. 3th ed. , pp. 195-200. Macmillian publishing Company, New York.

Maskaleris, T. ; Lialiaris, T. & Triantaphyllidis, C. (1988). Induction of cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and of antineoplastic effects in ehrlich ascites tumor cells in vivo treated by methotrexate, hyperthermia and/or caffeine. Mutat. Res. , 422-236.

McClain, D. A. ; Wang, T. L. & Edelman, G. M. (1975). Cell. Immunol. , 15: 287.

McClain, D. A. & Edelman, G. M. (1976). Role of macrophages in lymphocyte mitogenesis. J. Exp. Med. 144, 1494.

McCorkle, F. ; Olah, I. & Glick, B. (1980). The morphology of the phytohaemagglutinin-induced cell response in the chicken's wattle. Poultry Sci. , 59, 616-623.

Merino, S. ; Martinez, J. M. ; Moller, A. P. ;, Sanabria, L. ; De Lope, F. P. ; Erez, J. & Rodriguez-Caabeiro. (1999). Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. Anim. Behav. , 58, 219-222.

Mody, C.H. ; Buser, D.E. ; Syme, R.M. & Woods, D.E.(1995).*Psedomonas aerogenosa* Exoenzyme S induces Proliferation Of Human T- Lymphocytes. Infect. Immun. 63: 1800 – 1805.

Moller, A. P. & Erritzoe, J. (1996). Parasite virulence and host immune defense: host immune response in related to nest evolution of host social behavior. Adv. Stud. Behav. , 22, 65-102.

Moller, A. P.; Christe, P. ;Erritzoe, J. & Mavarez, J. (1998). Condition, disease defence. Oikos, 83, 301-306.

Moller, A. P. ; De Lope, F. ; Moreno, J. ; Gonzalez, G. & Peres, J. J. (1994). Ectoparasite and host energetic: house martin bugs and house marten nestling. Oecologia, 98, 263-26

Mosmann, T. R.& Sad, S. (1995). Interlukin (IL)-4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8+ TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autononmous proliferation but retention ofcytotoxicity and synthesis of other cytokines. J. Exp. Medicine, Vol 182, 1505-1515.

Muneer, M. A. ; Farah, I. O. ; Newman, J. A. & Goyal, S. M. (1988). Immunosuppression in animals. (Review). Birt. Vet. J. , 144(3): 281-300.

Muneer, M. A. ;FARAH, i. o. ;Newman, J. A. & Goyal, S. M. (1988). Immunosuppression. Amer. J. Vet. Res. , 45: 1425.

Munford, R. S. ; Hall, C. L. & Dietschy, J. M. (1981). Binding of *S. typhimurium* LPS to rat high density lipoprotein. Infect Immun; 34: 833-843.

Naji, S. A. ; Sahin, N. ; Wagner, G. & William, S. J. (1984). Causes of immunosuppression. Amer. J. Vet. Res. , 45: 1425.

Novogradsky, A. (1974). Structure and activities of lymphocyte mitogens. Eur. J. Immunol. , 4: 646.

Novogradsky, A. & Katchalski, E. (1971). T-cells mitogen and macrophages. Biochim. Biophys. Acta 278, 579.

Nowell, P. C. (1960). Structure and activation of lymphocyte mitogens. Cancer Res. , 20: 462.

Orr-Weaver, T. H. & Spradling, A. C. (1986). Too many rodent carcinogen. Mol. Cell. Biol. 6, 4624-4633.

Panigrahy, B. ; Grumbles, C. ; Miller, D. ; Naji, S. A. & Hall, G. F. (1988). Causes of immunosuppression IN: Muneer, M. A. , Farah, I. O. , Newman, J. A. & Goyal, S. M. (eds). Immunosuppression in animals. (Review). Birt. Vet. J. , 144(3): 288-300.

Parslow, T. G. ; Stites, D. P. ; Terr, A. I. & Imbodens, B. (2001). Medical immunology. 10th ed. , McGraw, Hill Comp. Inc. USA.

Pathan, A. A. ; Wilkinson, K. & Klenerman, P. (2001). Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-GAMA secreting CD4 T-cells in *Mycobacterium tuberculosis*- infected individuals: Association with clinical disease state and effect of treatment. J. of Immunology 167: 5217-5225.

Payne, H. G. ; Nelson, L. W. & Jrweikel, J. H. (1974). Effects of cyclophosphamide on somatic cell chromosome in eats. Toxicol. Appl. Pharmacol. , 30: 360-368.

Preston-Martin, S. ; Pike, M. C. ; Ross. R. K. ; Jonea, P. A. & Henderson, B. E. (1990). Inchemically Induced Cell Proliferation: Implications for risk assessment , eds. Butterworth, B. & Slaga, T. (Alan R. Liss, Inc. NewYork), in press.

Petruska, J. ; Marsh, J. P. , Kagan, E. & Mossman, B. T(1988). Too many rodent carcinogens. Am. Rev. Respir. Dis. 137, 403.

Playfair, J. H. L. & Chain, B. M. (2001). Immunology at aGlance. 7th ed. , Farhangi Entesharati-e Teymurzadeh: Nashr-e Tabib, Iran.

Powell, A. E. & Leon, M. A. (1970). Parallel induction of T-cell stimulation: positive control of T-cell response by mitogen treated microphages. Exp. Cell Res. 62. 315.

Ray, S. & Chatterjee, B. P. (1995). Saracin: alectin from *Saraca indica* seed integument recognizes complex carbohydratrs. Phytochem. , 40(3): 643-649.

Raychoudhury, S. S. ;Suarez, S. S. & Buhi, W. C. (1993). Distribution of lectin binding sites in the oviducts of cycling and hormone treated pigs. J. Exp. Zool. , 265: 659-668.

Reese, A. R. E. ; Betts, R. F. & Gumustop, B. (2000). Handbook of antibiotic. 3th ed. , Lippincott Williams And Wilkins publishing company, Philadelphia.

Roitt, I. & Rabson, A. (2000). Realy essential medical immunology. Black Well Science Ltd.

Roitt, I. , Brostoff, J. & Male, D. (2001). Immunology. 6th ed. , Harcourt Publisher Limited.

Rojas, R. E. ; Torres, M. ;, Fournie, J. J. ; Harding, C. V. ; & Boom, W. H. (2002). Phosphoantigen presentationby macrophages to Mycobacterium tuberculosis – reactive T-cells: Modulation by chloroquine. J. of. infection and immunity 70(8): 4019-4027.

Roth, J. A. & 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. ; Abruzzini, A. F. & Frank, D. E. (1990). Infuence of recombinant human interleukin-2 administration on lymphocyte

and neutrophil: function in clinically normal and dexamethasone treated cattle. Am. J. Vet. Res. 51: 546-549.

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

Russo, A. & Levis. (1992). Detection aneaploidy in male germ cell of mice by means of ameiotic micronucleus assay. Mut. Res. 281: 187-191.

Saino, N. ; Calza, S. & Moller, A. P. (1997b). Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. J. Anim. Ecol. , 66, 827-836.

Saino, N.; Bolzern, A.M. & Moller, A.P.(1997a).Immunocompetance , Ornamentation, And Viability Of Male Barn Swallows(*Hirundo rustica*).Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94: 549 – 552.

Sakazaki, H. ; Ueno, H; Umetani, K. ; Utsumi, H. & Nakamuro, K. (2001). Immunotoxicological evaluation of environmental chemicals utilizing mouse lymphocyte mitogenesis test. Department of Biophysics , Graduate School Of Pharmaceutical Sciences. An Internet lecture: 1-18.

Selvaraj, R. ; Gopal, G. ; Raja, A. & Kumaraswami, V. (2003). Pattern recognition technique in immunological antigenic tests to identify Mycobacterium tuberculosis infection. J. of Tuberculosis-(Edinb.)82(6): 261-266.

Sharon, N. (1976). Lectins as mitogens. IN: Mitogens in immunology. J. J. Oppenheim & D. L. Rosenstreich(eds.), P: 31-41. Academic Press, New York.

Sharon, N. & Lis, H. (1972). Mitogens in immunobiology. J. Science. 177: 949.

Sharon, N. & Lis, H. (2004). Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Ahistorical Over View. Glycobiology. 16(5): 2251-2253.

Sheeler, P. & D. E. Bianchi. (1983). Cell biology. (2nd ed.), P: 343-344.

Shiraishi, Y. (1978). Chromosome aberration induced germ cells of mice. Mut. Res. 57: 313-324.

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-mashta, S. (2004). The agglutinating and humoral immunomodulating activities of *Oryza sative L. cucumis melo*, & *Panicum miliaceum L* dry seed lectins. Med. J. Of Babylon. Vol. 1. 50-55.

Shnawa, I.M.S. & Kadum, S.A.(2004).Vitamin D2 As Humoral Immunosupressant In Rabbit. Medical J. of Babylon. Vol.1, No:2.

Shubber, E. K. & Al-Allak, B. M. A. (1986). Spontaneous chromosomal aberration and SCEs in human lymphocytes. Effects of culture conditions. Nucleas. 29: 92-98.

Shubber, E. K. , & Salih, H. (1988). Cytogenetic for interaction between drug and radiation. Nucleus, 31: 24-30.

Skidmore, B. J. ; Chiller. J. M. ; J. Morrison, D. C. & Weigle, W. O. (1975a). Mitogenic activity OF bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol. , 114: 770.

Smits, J. & Williams, T. D. (1999). Validation of immunotoxicology techniques in psaaerine chicks exposed to oil sands tailings water. Ecotoxicology & Environmental safety 44, 105-112. Canada.

Smits, J. E. G. (2001). Antibody-mediated immunotoxicity in american kestrels(*Falco sparverius*) exposed to polychlorinated biphenyls. J. toxicology and environmental Health, Part A, 62: 217-226.

Sobti, R. C. ; Krishan, A. & Pfaffenberger, C. D. (1982). Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro organophosphates. Mutat. Res. , 102: 89-102.

Soler, M. ; Martin-Vivaldi, M. ; Marin, J. M. & Moller, A. P. (1999). Weight lifting & health status in the black wheatear. Behav. Ecol, 10: 281-286.

Sollid, L. M. ; J. Kolberg; H. Scott; J. Ek; O. Fauza & P. Brandtzaeg. (1986). Antibodies to wheat germ agglutinin in celiac disease. Clin. Exp. Immunol. , 63: 95-100.

Speirs, R. S. ; Bensons, R. W. ;, Knowles, B. J. & Roberts, D. (1988). Causes of immunosuppression. In: Muneer, M. A. , Farah, I. O. , Newman, J. A. & Goyal, S. M. (eds). Immunosuppression in animals. (Review). Birt. Vet. J. , 144(3): 288-300.

Stadecker, M. J. ; Lukic, M. ; Dvorak, A. & Leskowitz, S. (1977). The cutaneus basophil response to phytohaemagglutinin in chicken. J. Immunol. , 118, 1564-1568.

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

Studnicka, M. ;Siwicki, A. ;A. K. Morand, M. ;Rymuszka, A. Bownik, A. & Terech-Majewska, E. (2000). Modulation of non-spesific defence mechanism and specific immunresponses after suppression induced by exnobiotics. J. Appl. Ichthyol. , 16(1): 1-7. Black-Well Wissenschafts-Verlag, Berlin.

Subchana, S. ;Pillai, R. M. & Nair, G. K. (1984). Immunomodulatory effect of livamisole on the antibody response to newcattle disease viruse in chicken. Kerala. J. Vet. Sci. , 15: 145-149.

Susselan, K. N. & Mitra, R. (2001). Purification and characterization of hemagglutinin isolated from the leaves of *Chenopodium*

(*Chenopodium amaranticolor*). Ind. J. Biochem. Biophys. , 38: 186-192.

Susselan, K. N. ; Bhatia, C. R. & Mitra, R. (1997a). Purification andCharacterization of two major lectins from *Vigna mungo*(Blachgram). J. Biosci. , 2(4). 439-455.

Susselan, K. N. ;Bhatia, C. R. & Mitra, R. (1997a). Characteristics of tow major lectins from mungbean(*Vigna radiata*) seeds. Plant Foods Human Nutr. , 50: 211-222.

Tanaka, T. ; Sugiura, H. ; Inaba, R. ; Nishikawa, A. ; Murakami, A. ; Koshimizu , K. & Ohigashi, H. (1999). Immunomudulatory action of Citrus auraptene on macrophage function and cytokine production of lymphocytes in femal BALB/c mice. Department Of Pathology, Carcinogenesis, Vol. 20, No. 8, 1471-1476.

Tateno, H. & Goldstein. I. J. (2003). Molecular Cloning, Expression, and Characterization of novel haemolytic lectins from the mushroom *Laetiporus sulphureus* , which show homology to bacterial toxins. J. Biol. Chem. , Vol. 278, Issue uz, 40455-40463.

Testi, R.; Phillips, J. H. & Lanier, L. L. (1989). Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T-cell antigen receptor signaling. J. Immunol. 142: 1854-1860.

Tizard, I.(1997).Immuology, Sannders College Publishing. London.

Thestrup – Pedersen, K. (1975a).Supprussion Of Tuberculin Skin Reactivity By Prior Tuberculin Skin Testing. Immunology 28:343 – 348.

Tong, C. ; Fazio, M. & Williams, G. M. (1980). Chemical Carcinogensis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7377-7389.

Wang, H. ; Ng, T. B. & Ooi, V. E. C. (1998). Lectins from mushrooms. Mycol. Res. , 102(8): 897-906.

Watson, J. ; Epstein, R. ; Nakoinz, I. ; & Ralph, P. (1973a). Lymphocytes mitogenisis by bacterial lipopolysaccharire. J. Immunol. 110: 43.

Werner, H. ; Maral, R. ; Floch, F. ; Migliore-Samour, D. & Jolles. P. (1975). Adjuvent & immuno-stimulation activities of water-soluble substances extracted from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biomedicine, 22: 440-452.

Wilson, V. L;. Smith. R. A. ; Ma, S. & Culter, R. G. (1987). Chemical Carcinogenesis. J. Biol. Chem. 262, 9948-9951.

Wu, K. C. ; Mahida, Y. R. ; Priddle, J. D. & Jewell, D. P. (1999). Effect of human intestinal macrophage on immunoglobulin production by human intestinal mononuclear cells bolated from patients with inflammatory bowel disease . J. of Experimental Immunology, 79: 35-40.

Zhang, R. ; Li, Y. & Wang, W. (1997). Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. Nutr. Cancer, 29, 24-28.

Zimmeran, M. (1999). Immune Enhancers. Nutrition Science News. An Internet Lectur: 1-6.

Summary

There are several materials that can be mitogenic for lymphocytes like phytolectines and lipopolysacchariedd. In this study, the extracted lectins of each species of plant were injected to two weeks old. Chicks to determine the mitogenecity effects of these lections on the T-lymphocytes and the immune primed chicks by two suggested immunmodulaters refadin and tuberculin.

The results showed a significant mitogenecity on the T-lymphocytes chicks. Linear relationship between the degree of mitogenecity and the concentration of lectin solutions. Clear immune suppressive effects was demonstrated on the T-lymphocytes division depending on the rate of refadin and tuberculin doses that have been used.

The results were incurging and could be used as model for further studied. The immunosuppressive model could useful to conferm of occurrence of experimentally immune modulation of chicks by using like these chemicals that could be of use in the autoimmune disease.

جدول (4-6): القراءات الخاصة بتفاعل سمك الجلد ومعامل إنقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل الأرومات اللمفية لتحديد الجرعة المثلى لنبات خيار الماء

تركيز اللكتين mg/ml	تفاعل الجلد المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الارومات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
خيار الماء 3.648	1.8 ± 0.373	0.418 ± 0.0105	0.096 ± 0.0031
خيار الماء 1	0.7 ± 0.199	0.078 ± 0.0005	0.02 ± SE*
خيار الماء $^{0.1}$	0.6 ± 0.244	0.038 ± 0.00008	Zero ± SE*
	$Y^- = 82.51 + (-46.09) x$ r = - 0.54	**$Y^- = 102.88 + (-72.76) x$** r = - 0.76	**$Y^- = 62.58 + (-716.5) x$** r = - 0.64
0.25 PHA	2.0	0.571	**0.037**
0.25 LPS	1.9	0.51	**0.05**
خيارالماء 3.648	1.8	0.418	**0.096**

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-7): تاثير متعدد السكريد الشحمي على معدلات سمك الجلـد ومعامل إنقسـام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأرومـات اللمفيـة

تركيز LPS mg/ml	تفاعل الجلد المعدل ±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الارومات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
1.0 LPS	1.1 ± 0.244	0.431 ± 0.014	0.025 ± SE*
0.5 LPS	1.7 ± 0.199	0.46 ± 0.0044	0.032 ± SE*
0.25 LPS	1.9 ± 0.186	0.51 ± 0.0086	0.05 ± 0.0029
	$Y^- = 2.01 + (-0.91)\ x$ r = - 0.99	**$Y^- = 4.78 + (-9.001)\ x$** r = - 0.94	**$Y^- = 1.53 + (-26.8)\ x$** r = - 0.905
0.25 PHA	2.0	0.571	0.037
0.25 LPS	1.9	0.51	0.05
خيار الماء 3.648	1.8	0.418	0.096

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-8): تاثير الملزن الدموي النباتي (PHA) على معدلات سمك الجلد ومعامل إنقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأورمات اللمفية كسيطرة موجية

تركيز PHA mg/ml		تفاعل الجلدmm المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الارومات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
1.0	PHA	$1.0 \pm SE^*$	0.1425 ± 0.00002	$Zero \pm SE^*$
0.5	PHA	1.2 ± 0.122	0.278 ± 0.0002	$0.0125 \pm SE^*$
0.25	PHA	2.0 ± 0.055	0.571 ± 0.0093	0.037 ± 0.00026
		$\mathbf{Y^- = 1.45 + (- 6.2) x}$ r = - 0.8	$\mathbf{Y^- = 1.114 + (- 1.606) x}$ r = - 0.92	$\mathbf{Y^- = 0.894 + (- 18.877) x}$ r = - 0.93
0.25	PHA	2.0	0.571	0.037
0.25	LPS	1.9	0.51	0.05
3.648	خيار الماء	1.8	0.418	0.096

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-9):تاثير محلول لكتين بذور نبات خيار الماء على كل من ومعدلات ثخن الجلد وانقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأورمات اللمفية

تركيز اللكتين mg/ml	تفاعل الجلدmm المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الارومات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
خيار الماء 3.648	1.8 ± 0.373	0.418 ± 0.0587	0.096 ± 0.026
خيار الماء 1.825	1.2 ± 0.338	0.231 ± 0.031	0.047 ± 0.0164
خيار الماء 0.9125	0.9 ± 0.244	0.212 ± 0.0729	0.02 ± SE*
	$Y^- = -1.82 + 3.03\ x$ r = 1	$Y^- = -1.27 + 11.85\ x$ r = 0.96	$Y^- = 0.164 + 36.13\ x$ r = 0.999
PHA 0.25	2.0	0.571	0.037
LPS 0.25	1.9	0.51	0.05
خيار الماء 3.648	1.8	0.418	0.096

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-10):تاثير محلول لكتين بذور نبات البطيخ على كل من ومعدلات ثخن الجلد وانقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأرومات اللمفية

تركيز اللكتين mg/ml	تفاعل الجلدmm المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الارومات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
البطيخ 5.565	1.6 ± 0.323	0.374 ± 0.0633	0.0715 ± 0.0356
البطيخ 2.787	1.2 ± 0.199	0.108 ± 0.7367	0.025 ± SE*
البطيخ 1.394	0.8 ± 0.199	0.049 ± 0.078	0.016 ± SE*
	$Y^- = -59000.7 + 63217.01\ x$ r = 0.86	**$Y^- = -19477.7 + 698997\ x$** r = 0.98	**$Y^- = -19477.7 + 698997\ x$** r = 0.988
PHA 0.25	2.0	0.571	0.037
LPS 0.25	1.9	0.51	0.05
خيار الماء 3.648	1.8	0.418	0.096

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-11): تاثيرالمحلول اللكتيني لبذور نبات الرقي على كل من معدل تثخن الجلد وانقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأورمات اللمفية

تركيز اللكتين mg/ml	تفاعل الجلدmm المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الاورمات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
الرقي 1.673	1.2 ± 0.122	0.287 ± 0.0076	0.063 ± 0.0062
الرقي 0.836	1.0 ± 0.353	0.248 ± 0.0019	0.023 ± SE*
الرقي 0.418	0.8 ± 0.122	0.1575 ± 0.0022	0.0125 ± SE*
	$Y^- = -2.17 + 3.15\ x$ r = 0.98	**$Y^- = -1.06 + 8.817\ x$** r = 0.911	**$Y^- = 0.184 + 23.91\ x$** r = 0.991
PHA 0.25	2.0	0.571	0.037
LPS 0.25	1.9	0.51	0.05
خيار الماء 3.648	1.8	0.418	0.096

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-12):تاثير المحلول اللكتيني لبذور نبات الحنظل على كل من معدل تثخن الجلد ومعامل انقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأورمات اللمفية

تركيز اللكتين mg/ml	تفاعل الجلدmm المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الاورمات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
الحنظل 1.115	1.2 ± 0.122	0.278 ± 0.0018	0.32 ± 0.00077
الحنظل 0.557	1.0 ± SE*	0.1146 ± 0.0012	0.26 ± 0.0003
الحنظل 0.278	0.7 ± 0.199	0.075 ± 0.0167	0.07 ± 0.0008
	$Y^- = -0.909 + 1.61\ x$ r = 0.953	**$Y^- = 0.04 + 3.91\ x$** r = 0.989	**$Y^- = 0.023 + 2.89\ x$** r = 0.885
PHA 0.25	2.0	0.571	0.037
LPS 0.25	1.9	0.51	0.05
خيار الماء 3.648	1.8	0.418	0.096

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-13) القراءات المسجلة لكل من معامل انقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأورمات اللمفية للمحاليل اللكتينية لبذور النباتات الأربعة المستخدمة(خيار الماء, لبطيخ, الرقي, الحنظل) والفروقات بين هذه القراءات

تركيز اللكتين mg/ml	تفاعل الجلدmm	معامل الانقسام%	الارومات اللمفية%
خيار الماء3.648	1.8	0.418	0.096
خيار الماء1.825	1.2	0.231	0.047
خيار الماء 0.912	0.9	0.212	0.02
البطيخ 5.565	1.6	0.374	0.0715
البطيخ 2.787	1.2	0.108	0.025
البطيخ 1.394	0.8	0.049	0.016
الرقي 1.673	1.2	0.287	0.063
الرقي 0.836	1.0	0.248	0.023
الرقي 0.418	0.8	0.1575	0.0125
الحنظل 1.115	1.2	0.278	0.32
الحنظل 0.557	1.0	0.1146	0.26
الحنظل 0.278	0.7	0.075	0.07

جدول (4-14): تاثير المضاد الحيوي (الريفادين) على كل من معدل تثخن الجلد وانقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأورمات اللمفية

تركيز المضاد mg/ml	تفاعل الجلدmm المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الاورمات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
50	1.9 ± 0.099	0.52 ± 0.0097	0.016 ± SE*
40	2.0 ± 0.157	0.547 ± 0.0115	0.025 ± SE*
30	2.1 ± 0.099	0.573 ± 0.0097	0.039 ± SE*
20	2.4 ± 0.099	0.79 ± 0.0043	0.47 ± SE*
10	2.5 ± 0.157	0.886 ± 0.0019	0.05 ± 0.0002
	$Y^- = 160.14 + (- 59.7)\ x$ r = - 0.97	**$Y^- = 90.21 + (- 90.65)\ x$** r = - 0.93	**$Y^- = 34.602 + (- 33.35)\ x$** r = - 0.41
0.25 PHA	2.0	0.571	0.037
0.25 LPS	1.9	0.51	0.05
خيار الماء 3.648	1.8	0.418	0.096

***المكررات المستحصل عليها غير كافية لقياس الخطا المعياري.**

جدول (4-15): تاثير التيوبركلين على كل من معدل تثخن الجلد وانقسام الخلايا اللمفاوية ومعدل تكوين الأورمات اللمفية

تركيز التيوبركلين mg/ml	تفاعل الجلدmm المعدل±الخطا القياسي	معامل الانقسام% المعدل±الخطا القياسي	الاورمات اللمفية% المعدل±الخطا القياسي
3 Tub.	1.8 ± 0.373	0.484 ± 0.00714	0.03 ± 0.00011
2 Tub.	2.1 ± 0.244	0.726 ± 0.0057	0.049 ± 0.0002
1 Tub.	2.2 ± 0.199	0.83 ± 0.0169	0.06 ± 0.00004
	$Y^- = 11.38 + (- 4.61)$ x r = - 0.96	**$Y^- = 5.73 + (- 5.48)$ x** r = - 0.97	**$Y^- = 5.017 + (- 65.12)$ x** r = - 0.98
0.25 PHA	2.0	0.571	0.037
0.25 LPS	1.9	0.51	0.05
3.648 خيار الماء	1.8	0.418	0.096