وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة كربلاء /كلية التربية

استخدام مصل الإبل العراقية كبديل كفوء عن مصل جنين البقري في الأوساط الزرعية النسيجية

رسالة تقدمت بها

سيناء جبوري محمد البازي

إلى مجلس كلية التربية بجامعة كربلاء

و هي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير

في علوم الحياة/علم الحيوان

أشراف

الأستاذ المساعد الدكتور هادي رسول حسن

الأستاذ الدكتور ناهي يوسف ياسين

*2006*م *1472*هـ

بِسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إِنَّـــا فَتَحْنَـــا لَـــكَ فَتْحًـــا مُّبِينًـــا{١}
لِيَغْفِرَ لَكَ اللَّهُ مَا تَقَدَّمَ مِن ذَنبِكَ
وَمَــا تَــأَخَّرَ وَيُــتِمَّ نِعْمَتَــهُ عَلَيْــكَ
وَيَهْــدِيَكَ صِــرَاطًا مُّسْــتَقِيمًا{٢}
وَيَنصُرَكَ اللَّهُ نَصْرًا عَزِيزًا{٣ }

صدق الله العظيم

الفتح{ ١-٣}

بسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إقرار المشرفين على الرسالة

نشهد بأن رسالة الماجستير الموسومة " استخدام مصل الإبل العراقية كبديل كفوء عن مصل جنين البقري في الأوساط الزرعية النسيجية " ‘عدت تحت أشرافنا في قسم علوم الحياة /كلية التربية / جامعة كربلاء وفي المركز العراقي لأبحاث السرطان و الوراثة الطبية /بغداد ، و هي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير

المشرف **المشرف**

الأستاذ المساعد الدكتور **الأستاذ الدكتور**

هادي رسول حسن **ناهي يوسف ياسين**

إقرار رئيس قسم علوم الحياة

أشهد بأن أعداد هذه الرسالة قد جرى تحت أشرافي في جامعة كربلاء كلية التربية (قسم علوم الحياة) وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في قسم علوم الحياة/زراعة نسيجية.

التوقيع:

رئيس القسم : أ.م .د ستار جاسم حتروش

المرتبة العلمية:أستاذ مساعد

الكلية والجامعة: كلية التربية / جامعة كربلاء

التاريخ:

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

أشارة إلى التوصيات المتوفرة ، هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

رئيس اللجنة: أ.م.د. سعد حمد عبد اللطيف

المرتبة العلمية :أستاذ مساعد

التاريخ:

بسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إقرار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة المناقشة ، اطلعنا على رسالة الطالبة (سيناء جبوري محمد البازي) الموسومة بـ(أستخدام مصل الإبل العراقية كبديل كفوء عن مصل جنين البقري في الأوساط الزرعية النسيجية) وناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما لها علاقة بها وذلك بتاريخ ٢٠٠٦/٥/٢٣ ونشهد بأنها جديرة بالقبول بدرجة (امتياز) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة/علم الحيوان.

رئيس اللجنة
التوقيع:
الاسم: د. صالح محسن البدر
المرتبة العلمية: أستاذ
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة
التوقيع:
الاسم:د.شلال مراد حسين
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان:المركز العراقي لبحوث السرطان_جامعة المستنصرية
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة
التوقيع:
الاسم: د. سعد حمد عبد اللطيف
المرتبة العلمية:أستاذ مساعد
العنوان:مدير وحدة أبحاث الرزازة_جامعة كربلاء
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة (المشرف)
التوقيع:
الاسم: د.هادي رسول حسن
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان:كلية التربية_جامعة كربلاء
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة (المشرف)
التوقيع:
الاسم: د. ناهي يوسف ياسين
المرتبة العلمية:أستاذ
العنوان :مدير المركز العراقي لبحوث السرطان_جامعة المستنصرية
التاريخ: / /٢٠٠٦

مصادقة عمادة كلية التربية/جامعة كربلاء على قرار اللجنة

التوقيع:
الاسم: د.حسين كاظم القطب
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
التاريخ: / /٢٠٠٦

بسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن هذه الرسالة الموسومة (استخدام مصل الإبل العراقية كبديل كفوء عن مصل جنين البقري في الأوساط الزرعية النسيجية) للطالبة سيناء جبوري محمد البازي /قسم علوم الحياة /الدراسات العليا (الماجستير) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع

الاسم : أ.م.د.عبود جودي الحلي

المرتبة العلمية:أستاذ مساعد

الكلية و الجامعة:كلية التربية_جامعة كربلاء

التاريخ:

الإهداء

إلـــى مـــن غـــرس فـــي داخلـــي حـــب العلـــم و المعرفة.....

أبي

إلـــى مـــن حرســـتني بـــدعائها وخففـــت عنـــي بحنانها.....

أمي

إلى سندي وجوهرتي.....

أخي عمار

إلى كنوزي الثمينة و شموعي المنيرة.....

هـــادي، وفـــاق ،غصـــون ،

حسن وحسين

إلى أحبائي.....

أخوتي و أخواتي

سيناء

شكر و تقدير

الحمد لله و الصلاة والسلام على سيدنا ونبينا و شفيعنا محمد و على آل بيته الطاهرين و صحبه الغر الميامين.
الحمد لله الذي وفقني و أغناني بفضله و سخر لي جمعاً من الخيرين ممن كانت رفقتهم عوناً لي ، و اشكر في البدء عائلتي و أختي د.وفاق وعائلتها على الوقت المسروق من راحتهم لأتمام مسيرتي.
ومن عرفان بالجميل و أزدراء الفضل لأهله أن أتقدم بوافر الشكر و التقدير لأستاذي المشرف الدكتور هادي رسول حسن لأشرافه على هذا البحث و تقديمه الأراء القيمة .كما أتقدم بجزيل الشكر و الأمتنان الى من كان لي الأب قبل الأستاذ أستاذي الدكتور ناهي يوسف ياسين الذي وضع فكرة البحث و ساهم بإنجازها بتوفير كل المستلزمات المطلوبة للبحث فضلاً عن مساندته لي بتوجيهاته السديدة و التي كانت لي خير عون .
شكري وتقديري إلى عمادة كلية التربية\جامعة كربلاء و الى رئيس قسم علوم الحياة و الى الأخوات العزيزات الأخت مريم و الأخت أثمار و الأخت سناء وا لأختين غيداء و أنوار.
كما لايسعني الأ ان اعبر عن جزيل شكري و فائق تقديري الى المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية لما قدمته لنا من تسهيلات و دعم معنوي في مختلف الأصعدة من أدراة و موظفين على وقوفهم معي لأنجاز هذا العمل و أخص منهم بالذكر أخي و أستاذي العزيز الدكتور أحمد مجيد الشمري على تحمله العبء الكبير في أنجاز هذا البحث فتقف الكلمات عاجزة عن شكره و الأمتنان له فجزاه الله عني خير جزاء.كما اتقدم بالشكر و الأمتنان الى الأختين العزيزتين الأنسة أسماء المختار و الأنسة آمال محمد علي على مساندتهما لي وو قوفهم معي طيلة فترة الدراسة.
كما أتقدم بالشكر الجزيل الى نعم الأخت و الصديقة السيدة سؤدد عبد الستار من مكتبة المركز و الدكتورة آمان ذنون والأخت توحيد فاضل و الآنسة نادية طارق و الآنسة رشا عبد الأميرالزبيدي و الأنسة عابدة و السيدة سعاد و الآنسة نور هاشم و السيدة زينب على مؤازرتهم لي طيلة فترة البحث.
و لايفوتني أن اشكر جميع زملائي و زميلاتي طلبة الدراسات العليا و بالأخص د.هند حسين و د. مثنى عبد القادر ود. حامد ناجي ود. وفاء فوزي و د. عبد الله أبراهيم و الأخوة مصطفى نهاد و هيثم الكبيسي والأخوات نيبال مطير و رشا عبد الأمير و أزهار موسى و لقاء حسون .
شكري و تقديري الى الدكتورة لقاء من كلية الطب البيطري \جامعة بغداد على توجيهاتها العلمية القيمة و الى موظفات المكتبة المركزية \جامعة بغداد – قسم الأطاريح و بالأخص الأخت هدى.

الخلاصة

جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على أستعمال مصل ذكور الإبل العراقية كبديل عن مصل جنين الأبقار في الأوساط الزرعية النسيجية .حيث شملت هذه الدراسة تنمية الخطوط الخلوية السرطانية (خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 و خط خلايا الغدد اللبنية الفأري AMN-3 و الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ REF) بأوساط حاوية على ثلاثة تراكيز من مصل الإبل (5%، 10%و15%) و بثلاثة أعمار (خمسة أشهر ، سنتين و ثلاث سنوات) و لمدة سبعة أيام. و دراسة تأثيره على معدل نمو خلايا تلك الخطوط الخلوية و أطوار نموها(طور السكون Lag phase و طور اللوغارتمي Log phase و طور الأنحدار Declinephase) من خلال دراسة فترات أطوار منحنيات النمو لها وفترة التضاعف Population Doubling Time (PDT) و مقارنتها بالتركيز (5%) من مصل البقري كسيطرة. كما درست أشكال الخلايا لتلك الخطوط الخلوية و قورنت بالسيطرة، و تمت أيضاً المقارنة بين تلك التراكيز الثلاثة و الأعمار الثلاثة لمصل الإبل.فضلا عن الدراسة الوراثية الخلوية لخلايا الخطوط الخلوية المعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل و للعمر خمسة أشهر من خلال حساب معامل الأنقسام لها و دراسة الهيئة الكرموسومية لها ومقارنتها بالسيطرة.

كما د'رس تأثير أربع تراكيز من مصل الإبل (5%، 10%،15%و20%) و بأعماره الثلاث في انقسام الخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بأضافة العامل المشطر PHA من خلال حساب دليل الأنقسام الخلوي (MI) Mitotic Index ودليل التحسس الخلوي (BI) Blastocyte Index و مقارنته بالأوساط الحاوية على التراكيز الأربعة نفسها من مصل البقري و تركيز (20%) من البلازما البشري(وعدا كسيطرة) كما تمت المقارنة بين التراكيز الأربعة لمصل الإبل و بين أعماره الثلاثة.

أظهرت النتائج مايلي:

١. أن للأوساط الزرعية المزودة بمصل الإبل القدرة على تنمية الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF الأنه كان أقل كفاءةً من السيطرة المزودة بـ ٥% من مصل البقري . و عند المقارنة بين تلك التراكيز لوحظ ان التركيز ١٥%

لمصل الإبل و بعمر خمسة أشهر أفضل التراكيز المستخدمة في تنمية خطوط الخلايا السرطانية و الطبيعية مقارنة ببقية التراكيز و الأعمار ، و لاسيما عند الخط الخلوي REF.

٢. وجد أن الخطوط السرطانية والطبيعية المنماة بالأوساط الحاوية على مصل الإبل لها أطوار السيطرة نفسها فيما عدا الأختلاف في أوقاته حسب التركيز وعمر مصل الإبل المستخدم حيث كانت أطول من السيطرة في طور Lag و أقل من السيطرة في طور Log وكذلك وجد أن طور Lag يقصر و يطول طور Log وتقصر فترة التضاعف PDT كلما أزداد تركيز المصل و قل عمر الحيوان .

٣. أن طور الDecline قد بدأ في أغلب المعاملات ومن ضمنها السيطرة عند نفس الوقت وعند أغلب الخطوط الخلوية المستخدمة في الدراسة . فكان أقرب عمر و تركيز من السيطرة عمر الخمسة أشهر و بتركيز 15% .

٤. لوحظ ان الخط الخلوي الطبيعي REF أطول الخطوط الخلوية المستخدمة في طور Lag و اقصرها في طور Log كما تميزت بطول فترة التضاعف PDT عند جميع خلايا خط REF المعاملة بالتراكيز الثلاثة مصل الإبل بجميع أعماره المستخدمة في الدراسة فضلا عن السيطرة مقارنة ببقية الخطوط الخلوية المستخدمة في الدراسة.

٥. وجد أن هناك ارتفاعاً معنوياً $p<0.01$ في عدد الخلايا اللمفاوية البشرية المنقسمة و المتحسسة المحفزة بالعامل المشطر PHA عند تنميتها بالتراكيز الأربعة من مصل الإبل و بأعماره الثلاثة مقارنة بالسيطرة. ألا أن هذا الأرتفاع تباين حسب عمر و تركيز مصل الإبل المستخدم فأزداد كلما زاد تركيز المصل وقل عمر الحيوان ، فكان اكثر الأعمار و التراكيز قدرةًعلى تنمية الخلايا اللمفاوية عمر الخمسة أشهر وبتركيز 20% .

٦. لم يغير مصل الإبل من شكل خلايا الخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية المستخدمة في الدراسة و لا على الهيئة الكروموسومية .كما لم يؤثر على الهيئة الكروموسومية التركيبية و العددية للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية.

قائمة الأشكال

الشكل	الصفحة
الشكل(٣-١) منحى النمو لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	٥٧
الشكل(٣-٢) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	٥٧
الشكل(٣-٣) منحى النمو لخلايا الخط الخلوي Hep-2 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	٥٨
الشكل(٣-٤) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	٥٨
الشكل(٣-٥) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي Hep-2 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة سنوات مقارنة بالسيطرة	٥٩
الشكل(٣-٦) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة	٥٩
الشكل(٣-٧) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	٦٢
الشكل(٣-٨) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	٦٢
الشكل(٣-٩) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	٦٣
الشكل(٣-١٠) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطانيAMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمرسنتين مقارنة بالسيطرة	٦٣
الشكل(٣-١١) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة	٦٤
الشكل	**الصفحة**

الشكل(٣-١٢) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمرخمس سنوات مقارنة بالسيطرة	٦٤
الشكل(٣-١٣) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	٦٧
الشكل(٣-١٤) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	٦٧
الشكل(٣- ١٥) منحنى لخلايا الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	٦٨
الشكل(٣-١٦) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	٦٨
الشكل(٣-١٧) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة	٦٩
الشكل(٣-١٨) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة	٦٩
الشكل(٣-١٩) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل(٥%،١٠%و ١٥%) بعمر خمسة أشهر على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة	٧٢
الشكل(٣-٢٠) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل (٥%،١٠%و١٥%) بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة	٧٣
الشكل(٣-٢١) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل (٥%،١٠%و١٥%) بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي Hep-2 مقارنة بالسيطرة	٧٣
الشكل(٣-٢٢) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز ١٥% على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة	٧٤
الشكل(٣-٢٣) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة	٧٥
الشكل	**الصفحة**
الشكل(٣-٢٤) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر سنتين على معدل نمو و	٧٥

أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة	
الشكل(٣-٢٥) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بالمقارنة مع السيطرة.	٧٦
الشكل(٣-٢٦) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز ١٥% على معدل نمو وأنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة	٧٦
الشكل(٣-٢٧) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة	٧٧
الشكل(٣-٢٨) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعيREF مقارنة بالسيطرة	٧٨
الشكل(٣-٢٩) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة	٧٨
الشكل(٣-٣٠) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز ١٥% على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة	٧٩

قائمة الصور

الصورة	الصفحة
الصورة (٣-١) خلايا الخط السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري و المعاملة بالتركيز ١٥% من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر (CV) **(X100)**.	٥٤
الصورة (٣-٢) خلايا الخط السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري (السيطرة) (CV) (X100).	٥٤
الصورة (٣-٣) خلايا الخط السرطاني AMN-3 لسرطان الغدد اللبنية الفأري المعامل بالتركيز ١٥% من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر (CV) (X100).	٥٤
الصورة(٣-٤) خلايا الخط السرطاني AMN-3 لسرطان الغدد اللبنية الفأري (السيطرة) (CV) (X100).	٥٤
الصورة	**الصفحة**
الصورة (٣-٥) خلايا الخط الطبيعي REF لجنين الجرذ المعامل بالتركيز ١٥% من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر(CV) (X400) .	٥٤

الصورة (٣-٦) خلايا الخط الطبيعي REF لجنين الجرذ (السيطرة) (CV) (X400).	٥٤

قائمة الجداول

الجدول	الصفحة
جدول(٣-١) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	٧٠
جدول(٣-٢) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	٧٠
جدول(٣-٣) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة سنوات مقارنة بالسيطرة	٧١
جدول (٣-٤) معامل الأنقسام الخلوي لخلايا الخط الخلوي Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة.	٨١
جدول (٣-٥) معامل الأنقسام الخلوي للخط الخلوي السرطاني AMN-3 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة.	٨١
جدول (٣-٦) معامل الأنقسام الخلوي لخلايا الخط الطبيعي REF و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل عند العمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة.	٨١
الجدول(٣-٧) دليل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بإضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة.	٨٧
الجدول(٣-٨) دليل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بإضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة	٨٧
الجدول(٣-٩) دليل الأنقسام الخلوي(MI) للخلايا اللمفاوية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بدون إضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة.	٨٨
الجدول(٣-١٠) دليل التحسس الخلوي(BI) للخلايا اللمفاوية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بدون إضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة	٨٨

قائمة الملاحق

الملحق	الصفحة
الملحق(١) يوضح مكونات الوسط الزرعي (RPMI-1640) حسب (Sigma-2005).	١١٥

الملحق (٢) بعض مكونات المصل الضرورية لبقاء و نمو الخلايا خارج الجسم الحي *In vitro* .	١١٧
الملحق (٣) يبين جانب من المكونات المهمة لمصل جنين البقري.	١١٨
الملحق (٤) مكونات بلازما الإبل ذي السنام الواحد البالغ المثبتة من قبل عدة باحثين	١٢٠
الملحق (٥) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بإضافة العامل المشطر	١٢٣
الملحق(٦) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بدون إضافة العامل المشطر	١٢٣
الملحق(٧) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بدون إضافة العامل المشطر	١٢٤
الملحق(٨) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بإضافة العامل المشطر	١٢٤

قائمة المختصرات

AMN-3	**Ahmed-Mohammed-Nahi-2003**
BI	**Blastocyte Index**
DMEM	**Dulbeccos's Modification of Eagle's Media**
EGF	**Epidermal Growth Factor**
EDTA	**Eythylene Diamine Tetra Acetic Acid**
Hep-2	**Human Epidermoid Larynx Carcinoma**
Hepes	**N-2-hydroxyethyl piperazine-N-ethanesulphornic acid**
Log phase	**Logarithmic phase**
MEM	**Minimal Essential Media**
MI	**Mitotic Index**
PBS	**Phosphate Buffer Saline**
PHA	**Phytoheamagglutinin**
PDGF	**Platelets Derived Growth Factor**
PDT	**Population Doubling Time**
REF	**Rat Embryo Fibroblast**
RPMI-1640	**Rosswell Park Memorial Institute-1640**

قائمة المحتويات

الموضوع	الصفحة
المقدمة	أ،ب
الفصل الأول أستعراض المراجع	
١- ١ الزرع النسيجي	١
١-١-١ نبذة تاريخية عن الزرع النسيجي	١
١-١-٢ تطبيقات الزرع النسيجي	٣
١-٢ الوسط الزرعي	٤
١-٢-١ الخصائص الفيزيائية للوسط الزرعي	٥
١-٢-١-١الرقم الهيدروجيني	٥
١-٢-١-٢ الأزموزية	٦
١-٢-١-٣ اللزوجية	٦
١-٢-١-٤ الشد السطحي و الرغوة	٦
١-٢-٢ مكونات الأوساط الزرعية المعرّفة	٦
١-٢-٢-١ الأحماض الأمينية	٧
١-٢-٢-٢ الفيتامينات	٧
١-٢-٢-٣ الأملاح	٨
١-٢-٢-٤ الكلكوز	٨
١-٣ المصل	٨
١-٣-١ مكونات المصل المهمة في الزرع النسيجي	٩
١-٣-١-١ البر وتينات	٩
١-٣-١-٢ الهرمونات و عوامل النمو	١٢
١-٣-١-٣ الدهون	١٥
١-٣-١-٤ المعادن و العناصر النادرة	١٥
١-٣-١-٥ المغذيات و المؤيضات	١٦
الموضوع	**الصفحة**
١-٤ الإبل	١٦

١-٤-١ نبذة تاريخية عن الإبل	١٦
١_٤_٢ تصنيف الإبل	١٧
١_٤_٣ الإبل العراقية	١٨
١-٤-٤ بعض الخصائص الوظيفية للإبل	١٩
١_٤_٥ دم الإبل	٢١
١_٤_٥_١ خلايا الدم	٢١
١-٤-٥-١-١ خلايا الدم البيض	٢١
١-٤-٥-١-٢ كريات الدم الحمر	٢٢
١_٤_٥_٢ بلازما الدم	٢٤
١_٥ الوراثة الخلوية	٢٥
الفصل الثاني المواد و طرائق العمل	
1-2 المواد	٢٩
٢-١-١ الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة	٢٩
٢_١_٢ المحاليل الكيميائية المستخدمة في الدراسة	٣٢
٢_١_٣ تحضير الأدوات المختبرية	٣٤
2-1-4 المواد والمحاليل المستخدمة في الدراسة	٣٤
2-1-4-1 المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي	٣٤
2-1-4-2 المحاليل الخاصة بالوراثية الخلوية	٣٧
٢-١-٥ الخطوط الخلوية	٤٠
2-1-5-1 الخط الخلوي لسرطان الحنجرة البشري (Hep-2)	٤٠
2-1-5-2 الخط الخلوي لسرطان الغدد اللبنية الفأري (AMN-3)	٤٠
2-1-5-3 الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (REF)	٤٠
٢-٢ طرائق العمل	٤١
٢-٢-١ مخطط التجربة	٤١

2-2-2 جمع عينات دم الإبل	٤٢
2-2-٣ دراسة تأثير مصل الإبل في تنمية الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية	٤٢
٢-٢-٣-١ تهيئة الوسط الزرعي والخطوط الخلوية	٤٢
٢-٢-٣-٢ عد الخلايا الحية	٤٣
٢-٢-٣-٣ تأثير مصل الإبل بتراكيز وأعمار مختلفة على نمو الخطوط الخلوية	٤٣
٢-٢-٣-٤ الفحص المجهري	٤٤
٢-٢-٣-٥ منحنى نمو الخلايا	٤٤
2-2- ٥ الإدامة والمحافظة على الخطوط الخلوية	٤٥
٢-٢-٦ دراسة وراثية خلوية للخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية بعد معاملتها بمصل الإبل	٤٥
٢-٢-6-١ الحضن و الحصاد	٤٦
٢-٢-٦-٢ المعاملة بالمحلول واطىء التوتر	٤٦
٢-٢-٥-٣ التثبيت	٤٦
٢-٢-٦-٤ تحضير الشرائح الزجاجية	٤٦
٢-٢-٦-٥ التقطير	٤٧
٢-٢-٦-٦ التصبيغ	٤٧
٢-٢-٢-٦-٧ الفحص المجهري	٤٧
2-2- ٧ تأثير مصل الإبل على نمو الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي	٤٧
٢-٢-٧-١ عينة الدم	٤٧
الموضوع	**الصفحة**
٢-٢-٧-٢ زرع الدم	٤٧
٢-٢-٧-٣ حصاد الخلايا	٤٨

٢-٢-٧-٤ التثبيت	٤٩
٢-٢-٧-٥ تحضير الشرائح المجهرية	٤٩
٢-٢-٧-٦ التحزيم	٤٩
٢-٢-٧-٧ تصبيغ الشرائح المجهرية	٥٠
٢-٢-٧-٨ فحص الشرائح المجهرية	٥٠
٢-٢-٨ التحليل الأحصائي	٥٠
الفصل الثالث النتائج	
٣-١ مصل الإبل	٥٢
٣-١-١ الفحص المجهري	٥٢
٣-١-١-١ الخط الخلوي السرطاني Hep-2	٥٢
٣-١-١-٢ الخط الخلوي السرطانيAMN-3	٥٢
٣-١-١-٣ الخط الخلوي الطبيعي REF	٥٣
٣-١-٢ منحنيات النمو للخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية النامية في الأوساط الحاوية على تراكيز و أعمار مختلفة من مصل الإبل	٥٥
٣-١-٢-١ خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2	٥٥
٣-١-٢-١-١ طور السكون Lag phase	٥٥
٣-١-٢-١-٢ طور اللوغارتمي Log phase	٥٦
٣-١-٢-١-٣ طور الأنحدار Decline phase	٥٦
٣-١-٢-٢ خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3	٦٠
٣-١-٢-٢-١ طور السكون Lag phase	٦٠
٣-١-٢-٢-٢ طور اللوغارتمي Log phase	٦٠
الموضوع	**الصفحة**
٣-١-٢-٢- ٣ طور الأنحدار Decline phase	٦١
٣-١-٢-٣ خط خلايا الطبيعي لجنين الجرذ REF	٦٥
٣-١-٢-٣ -١ طور السكون Lag phase	٦٥
٣-١-٢-٣ -٢ طور اللوغارتمي Log phase	٦٥

٣-١-٢-٣ -٣ طور الأنحدار Decline phase	٦٦
٣-١-٣ تأثير أستخدام مصل الإبل العراقية بتراكيز مختلفة لحيوانات مختلفة الأعمار في تنمية خطوط الخلايا السرطانية والطبيعية	٧١
٣-١-٣-١ خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2	٧١
٣-١-٣-٢ خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3	٧٤
٣-١-٣-٣ خط خلايا الطبيعي لجنين الجرذ REF	٧٧
٣-١- ٤ دراسة وراثية خلوية للخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF و المعاملة بالأوساط الحوية على مصل الإبل	٨٠
٣-١-٤-١ الخط الخلوي السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري	٨٠
٣-١-٤-٢ الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لسرطان الغدد اللبنية الفأري	٨٠
٣-١-٤-٣ الخط الخلوي الطبيعي REF لجنين الجرذ	٨٠
٣-١-٤-٤ حساب معامل الأنقسام (MI)	٨٠
٣-١-٥ دراسة وراثية خلوية لتأثير تراكيز مختلفة من مصل الإبل العراقية، لحيوانات مختلفة الأعمار على الخلايا اللمفاوية البشرية	٨٢
٣-١-٥-١ دليل الأنقسام الخلوي (MI) و التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية بإضافة العامل المشطر (PHA) وبدون أضافته	٨٢
٣-١-٥-١ –١ بإضافة العامل المشطر (PHA)	٨٢
٣-١-٥-١-١-١ عمر خمسة أشهر	٨٢
٣-١-٥-١-١-٢ عمر السنتين	٨٤
٣-١-٥-١-١-٣ عمر خمس سنوات	٨٥
٣-١-٤-١-٢ بدون إضافة العامل المشطر PHA	٨٨
٣-١-٤-٢ التغيرات الكروموسومية	٨٩
الفصل الرابع المناقشة	
٤-١ دراسة تأثير معاملة خلايا الخط السرطاني Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF بتراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة.	٩٠
٤-٢ دراسة تأثير مصل الإبل بأعمار و تراكيز مختلفة على انقسام الخلايا اللمفاوية	٩٥
الاستنتاجات و التوصيات	

الموضوع	الصفحة
الاستنتاجات	٩٦
التوصيات	٩٧
المصادر	
المصادر العربية	٩٨
المصادر الأجنبية	١٠١
الملاحق	
الملاحق	١١٥

المقدمة

يلعب الزرع النسيجي (Tissue culture) دور حيوي ومهم في جميع الفروع العلمية و الطبية ذات الأختصاص. إذ أصبحت تقنية الزرع النسيجي لخلايا الحيوان تطبق علىجميع المستويات العلمية من دراسة أساسيات الخلية (Basic cell) وعلم الأحياء الجزيئي(Molecular Biology) إلى التطور السريع في تطبيقات حقل علم التقانة الأحيائية Biotechnology و إنتاج الحيوانات المحورة جينيا (Pfragner& Freshney,2004 ; Doyle & Griffiths,2000). أن نجاح هذه التقنية في إكثار الخطوط الخلوية Cell lines والتي بدأت بصورة أساسية على خلايا الطيور و أنواع من اللبائن و من ثم الخلايا الطبيعية للأنسان(Fresheny ,2000)،حققت نجاحاً كبيراً في مجال أبحاث السرطان .فمن خلالها تم فهم طبيعة الخلايا السرطانية Cancer cells وتفاعلاتها الكيموحيوية . كما ساهمت هذه التقنية في معرفة دور الجينات في أحداث السرطان وطرق علاجه (Doyle & Griffiths , 2000) .كذلك أن لتقنية الزرع النسيجي الأثر في تطور علم الوراثة الخلوية السريرية والسرطانية (Clinical & Cancer Cytogenetic) والتي أسهمت في معرفة الكثير من الظواهر المتعلقة بحدوث أختلالات في بعض كروموسومات الإنسان . فخلال العقود الثلاثة الأخيرة أصبحت دراسة كروموسومات الإنسان الشاغل الأول لكثير من الباحثين. و الآن أصبح العمل على المستوى الجزيئي من الصعب إنجازه ما لم تكن هنالك معرفة بأساسيات الوراثة الخلوية (Yaseen *et al*. ,1999).

استخدمت أوساط زرعية مختلفة لتنمية الخلايا الجسمية الطبيعية و السرطانية مضافاً أليها عدد من الأمصال منها مصل جنين البقري (Fetal Calf Serum) وبصورة واسعة في الزراعة النسيجية للخلايا والأعضاء (Organ & Cell Culture) خارج الجسم الحي*In vitro*. إذ يعد المصل من المكونات الأساسية والشائعة في الأوساط الزرعية (Jan *et al*.,2003 ; Carlo *et al*.,2004) لأحتوائه على الكثير من المغذيات و المؤيضات و العديد من العوامل التي تسهم في نمو Growth وتكاثر Proliferation

وتمايز Differntiation الخلايا (Fresheny ,1995). وفي الآونة الأخيرة قل استخدام مصل جنين البقري في العراق بسبب تكلفته العالية التي تبلغ أضعاف المواد الكيميائية التي تُصنع منهاالأوساط الزرعية. كما أسهم انتشار مرض جنون البقر Bovine Spongioform Encephalitis في بعض الدول المنتجة للمصل في الإقلال من إنتاجه (Pfragner&Freshney , 2004; Carlo *et al.* ,2004). ولأن هذه الأوساط الزرعية تستخدم بكثرة في المراكز البحثية والمؤسسات الصحية في العراق لغرض تنمية الخلايا الحية وأجراء الفحوصات المختبرية والتشخيصية والبحثية . ولصعوبة الحصول على مصل جنين البقري و الحاجة لديمومة الأبحاث العلمية أصبح من الضروري أجراء محاولات لأستخدام بدائل محلية متوفرة . فجاءت فكرة استخدام مصل الإبل العراقي . حيث أن الإبل عموماً معروفة بقدرتها على التكيف في البيئة الصحراوية القاسية ، نتيجة إلى التكيفات المظهرية ، التشريحية و السلوكية إضافة للتكيفات الوظيفية التي أسهمت في زيادة تحمل الإبل للظروف المكانية و الزمانية التي وضِع بها (حسن، 2005).

وقد جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على استخدام مصل الإبل لمعرفة قدرته على تنمية الخلايا الطبيعة (Normal Cells)و السرطانية (Cancer Cells) خارج الجسم الحي *In Vitro* و استحداث أسلوب جديدة في تطوير تقنية الزرع النسيجي في القطر . وعليه هدفت هذه الدراسة الى :

١. دراسة أمكانية استعمال مصل الإبل العراقي بأعمار وتراكيز مختلفة في تنمية الخطوط الخلوية الطبيعية وأنواع مختلفة من الخطوط الخلوية السرطانية في الأوساط الزرعية خارج الجسم الحي ومقارنتها بالمصل البقري Bovine Serum .

٢. زراعة الخلايا اللمفاوية الطبيعية Normal lymphocytes في أوساط حاوية على مصل الإبل العراقي وبأعمار وتراكيز مختلفة من أجل التعرف على دوره في ديمومة حيوية الخلايا التي تنمى فيه و أثره في نشاطها الحيوي بالمقارنة مع البلازما البشري Human Plasma وتراكيز مختلفة من المصل البقري .

استعراض المراجع

١- ١ الزرع النسيجي Tissue Culture

يعرف الزرع النسيجي Tissue Culture على أنه تقنية لفهم سلوك الخلايا خارج الجسم الحي *In vitro* بعيدا عن التأثيرات المختلفة للأجهزة داخل جسم الحيوان والتي قد تكون ناشئة من عمليات الأتزان الطبيعي Normal homeostasis أونتيجة لتأثير عوامل الأجهاد Stress Factor الناتجة من التجارب المختلفة (Sultan & Haagsman, 2001; Freshney ,2000). و هو مصطلح شامل يتضمن زرع العضو Organ Culture (زرعاً ثلاثي الأبعاد لكتلة نسيجية محافظة على كل أو جزء من خصائصها) و الزرع الخلوي Cell Culture (زرع مشتق من خلايا متفرقة بطرق أنزيمية Enzymatic، ميكانيكية Mechanical أو كيميائية Chemical و المأخوذة أما من النسيج الأصلي Original Tissue أو من الزرع الابتدائي Primary Culture أو من خطوط خلوية (Cell Lines (Freshney ,2000 ; Easty *et al*., 1981).

١-١-١ نبذة تاريخية عن الزرع النسيجي

تعود المحاولات الأولى لاستخدام تقنية الزرع النسيجي إلى بدايات القرن الماضي من خلال ما قام به العالمان Ross Harrison عام 1907 و Alexis Carrel عام 1912. حين قام العالم هاريسون (Harrison) في عام 1907 من معهد Rockefeller بزرع أنسجة لجنين ضفدع لملاحظة تطور ونمو الألياف العصبية. وبالرغم من أن هذه التقنية أعطت شرارة لموجة جديدة من الأهتمام بزرع الأنسجة خارج الجسم الحي *In vitro* ، ألا أن قلة من الباحثين اتبعوا طريقته في أختيار العينة . وقد أعطى التقدم في العلوم الطبية حافزاً للأهتمام بالحيوانات ذوات الدم الحار كونها الأقرب للأنسان (Reedy *et al*., 2000) . و قام العالم كارل (Carrel) في عام١٩١٢ أيضا من معهد Rockefeller بتحسين مبادئ الزرع النسيجي من خلال النجاح في زراعة نسيج جنين الدجاج و المحافظة على أجزاء من أنسجة قلبه حية حتى الشهر الثالث من الزرع والنجاح في إدامة

نمو النسيج الطلائي لجنين الدجاج لمدة تتجاوز الثلاثة أشهر عندها ‘عدت عينة جنين الدجاج المفضلة للزرع (Carrel ,1912). ألا أن التطور في مجال العناية بالحيوانات المختبرية لاسيما العتر النقية من القوارض جعلت من اللبائن في مقدمة العينات المنتخبة (Freshney ,1995) . فبالرغم من قدرة أنسجة أجنة الدواجن على تجهيز مختلف أنواع الخلايا فأن لأنسجة القوارض القدرة على إنتاج خطوط خلوية مستمرة Continuos Cell Lines (Earle *et al.* ,1943).كما و تعتبر القوراض مستودعاً كبيراً للخلايا السرطانية التي لها القابلية على النمو في المستنبت . فضلا عن التطورات العديدة التي شهدها علم التقنية الجينية جعلت من القوارض و لاسيما الفأر العينة المفضلة في المستنبتات (Reedy *et al.* ,2000) . أن النجاح في هذه التقنية حفز على تطور واسع المدى للخطوط الخلوية الناشئة بصورة رئيسية من الطيور واللبائن Doyle & Griffiths (,2000).

التقدم العلمي الثاني والهام الذي أسهم في فتح مساحة جديدة في مجال علم تقنية الزرع النسيجي جاء من خلال التمكن من زرع خلايا مفردة في المستنبتات (Sanford *et al,* 1948). وكذلك التمكن من أستبدال الأوساط القديمة المستخدمة في انماء الخلايا(كمستخلص نسيجي معقد Complex tissue extract، خثرة Clots ... و غيرها) بأوساط حاوية على خليط من مواد غذائية مع كمية قليلة من المصلSerum (Eagles, 1955) .غير أن الدلائل التي شجعت على الأهتمام بنسيج الإنسان هو قدرة الخلايا السرطانية للأنسان على إعطاء خطوط خلوية مستمرة مثل خلايا Hela (Gey *et al.* ,1952) . و مما ساعد على ذلك الدراسة التي قاما بها (Hayflick & Moorehead;1961) حيث تمكنا من إنماء خلايا طبيعية للأنسان لها فترة حياة قصيرة . لذا فقد أصبح بالإمكان من خلال هذه الدراسة وغيرها من الدراسات مثل دراسة (Puck & Marcus ,1955) و دراسة (Leibovitz ,1963) من أنجاز الكثير من التحويرات و التي كان من الصعب إنجازها في السابق منها إنتاج خطوط خلوية محورة جينياً ، دراسة فسلجة و أيض الخلايا ، المقارنة المباشرة ما بين الأنسجة الطبيعية و المحورة و دراسة نموهما (Mather & Roberts , 1998).

١-١-٢ تطبيقات الزرع النسيجي

لقد لعب الزرع النسيجي ومنذ بدايته دوراً مهماً في العلوم الطبية وفي فرعين أساسين من البحوث الطبية ، إنتاج اللقاحات المضادة للفيروسات وفهم بيولوجية الورم Neoplasia (Pfrogner & Freshney ,2004 ; Doyle & Griffiths ,2000) . فقدرة الخلايا السرطانية للنمو في المستنبت خلق ثورة في فهم هذا المرض . فالكثير من الأورام زرعت بنجاح وأعطت وسائل لدراسة بيولوجية السرطان وكيفية علاجه . و أسهمت الخطوط الخلوية السرطانية وبصورة فعالة في فهم دور الجينات و التفاعلات الكيموحيوية للخلايا السرطانية
(Doyle & Griffiths ,2000). لقد تبنت العديد من التطبيقات الروتينية في مجال الطب والصناعة تقنية الزرع النسيجي ،منها التحليل الكروموسومي Chromosomal analysis لخلايا مأخوذة من غشاء السَّلىَ amnion في الرحم أمكن من خلالها أن توضح تواجد الأعتلالات الجينية في الجنين . كما أمكن تقيم الإصابات الفيروسية كمياً ونوعياً من خلال استخدام طبقة أحادية Monolayer لخلايا مضيف مناسب (Freshney ,2000) ، كما أصبح بالأمكان قياس التأثير السمي للعقاقير والتلوث البيئي الشديد من خلال استخدام فحوصات مختلفة خارج الجسم الحي(الأعظمي، ٢٠٠٠ ؛الحلي، ٢٠٠٤ ؛ خلف، ٢٠٠٥).كما تم دراسة التغايرات الكروموسومية و تطور النسيلات للخطوط الخلوية السرطانية و دراسة تأثير أفرازاتها على نمو الخلايا اللمفاوية الطبيعية (علي، ٢٠٠٤). و كذلك أختبار العلاجات الجديدة و قياس فعالياتها ضد الخلايا السرطانية (الشمري، ٢٠٠٣) .

أسهم الكثير من تطبيقات الزرع النسيجي في حل بعض المشاكل الطبية من خلال إثبات بأن مستنبت خلايا البشرة Epidermal Cells يتكون من طبقات متمايزة وظيفياً (Green *et al.* ,1979) . و أن الخلايا المبطنة للوعاء الدموي Endothelial Cell تكّون الشعيرات الدموية Capillaries (Folkman & Haudenschild ,1980) . و أمكانية استخدام نفس خلايا الفرد في جراحة التطعيم المتجانس Homograft surgery ، و جراحة أعادة البنية Reconstructive surgery

(Christenson *et al.*,2004 ؛Sutherland &Mayer,2003).كما اصبح الآن مقبولا عمليا في بعض وحدات الحروق ، أخذ خزعة Biopsy من الجلد السليم للمريض و إكثارها ، و إرجاع هذه الخلايا المستنبتة بزرعها في المناطق المتضررة بشدة (Macky,2000 ; Boyce & Hansbrough ,1998;Gallico,1990). كما و أصبح بالإمكان نقل جينات طبيعية الى خلايا تعاني من نقص جيني وإرجاع مثل هذه الخلايا المصححة جينياً Corrected cells و زرعها في المريض (Rosenfeld *et al.*, 1992) .

هناك الكثير من الأبحاث تعتمد في دراستها على تقنية الزرع النسيجي . مثل تقنية الاندماج الخلوي Cell fusion و التحويرات الجينية Genetic manipulation (Powell *et al.*, 1999 ;Frederick *et al.* ,1993 ؛ Merril ,1971). كما أسهمت هذه التقنية بصورة كبيرة في مجال علم المناعة من خلال معرفة عمل الأضداد و تركيب المحددات المستضدية Antigenic determinant (Epitop) (Kohler & Milstein , 1975) .وذلك عن طريق تقنية الأضداد أحادية النسل Monoclonal antibody و التي تعتمد بصورة أساسية على تقنية الزرع النسيجي. كما ونشأت تقنية جديدة وواسعة من خلال القدرة على إدخال الجينات إلى خلايا كائنات غير حقيقية النواة Prokaryotic cells . ألا أن خلايا حقيقة النواة Eukaryotic cellsو منها خلايا اللبائن كانت الأفضل في تقنية الإدخال الجيني لإنتاج خطوط خلوية و منها خلايا الإنسان (Freshney ,2000). لذا فأن تقنية الزرع النسيجي أصبحت الأداة الأساسية و الضرورية في كثير من المجالات العلمية (Sultan & Haagsman ,2001).

١-٢ الوسط الزرعي Culture Media

هو عبارة عن خليط غذائي يُكمل بالمصل أو غيره من السوائل الحيوية المعقدة مثل (الحليب Milk ، مستخلص جنيني Embryo Extract أو البلازما Plasma) . أو مع خليط معلوم من الهرمونات و عوامل النمو . و ‘تعد الأوساط الزرعية الحجر الأساس للزرع النسيجي (Mather & Roberts ,1998).

في الوسط الزرعي الجيد يجب أن توفر جميع العوامل (المكونات) المحيطة بالخلايا داخل الجسم الحي *In vivo* عندها فقط ‘يمكن للخلايا أن تعيش ، و تتكاثر و تتمايز . بمعنى أن يوفر لها جميع الاحتياجات الضرورية من مواد مغذية مع عوامل النمو . (Mao *et al*., 2003 ; Harris *et al*.,1980)

منذ التمكن من استئصال خلايا النسيج الأصلي للكائن الحي و زرعها في مستنبت. و اكتشاف إمكانية الحصول على مزرعة ثانوية Sub culture ، و التكاثر خارج الجسم الحي . بدأت المحاولات لتوفير أوساط معرّفة Defined Media يساند استمرار نمو الخلايا ، و استبدال الأوساط الطبيعية Natural Media بأوساط مصنعة Synthetic Media .(Darling & Morgan, 1994)

يوفر الوسط الغذائي للخلايا المنقسمة الاحتياجات الضرورية من أحماض الأمينية Amino Acids ، أحماض دهنية Fatty Acids ، سكريات Sugars ، المعادن النادرة Trace Elements ، الفيتامينات Vitamins ، العوامل المرافقة Co-Factors . كما يوفر الأيونات Ions و الجزيئات Molecules الضرورية للحفاظ على المحيط الكيميائي للخلايا .(Mao *et al*., 2003)

١-٢-١ الخصائص الفيزيائية للوسط الزرعي Physical properties of media

للوسط الزرعي خصائص فيزياوية محددة وهي كما ذكرت من قبل . (Pfrogner & Freshney ,2004; Mather & Roberts ,1998)

١-٢-١-١ الرقم الهيدروجيني pH

الرقم الهيدروجيني للوسط ضروري ليس فقط للحفاظ على الاتزان الأيوني المناسب، و أنما للحفاظ على الوظائف المثالية للأنزيمات ، و ارتباط الهرمونات و عوامل النمو مع المستقبلات الخلوية. و يعد pH=7 المستوى الأمثل لمعظم الخطوط الخلوية (Cell lines).حيث أن الأختلاف في مستواه له تأثير على معدل نمو الخلايا ووظائفها. يعد وجود المصل في الوسط عند تركيز 5-20% v\v كمنظم للحامضية،لذا فأن الأوساط الخالية من المصل تكون قليلة التحمل للتغايرات الكيمياوية و الفيزياوية .ولقياس مستوى حامضية الوسط يستخدم صبغة Phenol red.

١-٢-١-٢ الأزموزية Osmolality

ازموزية البلازما البشري Human plasma داخل جسم الأنسان *In vivo* تبلغ (290 mOsm / kg) .ألا أنها تختلف في بقية أنواع الحيوانات حيث تبلغ في الفئران مثلا (310 mOsm / kg) . و للأغراض العملية فان أزموزية الوسط خارج الجسم الحي *In vitro* تتراوح ما بين (260 mOsm / kg – 320 mOsm / kg) .

وللحفاظ على حموضية و أزموزية الوسط الزرعي تستخدم الدارئات (Buffering) . و من تلك الدارئات بيكاربونات الصوديوم $NaHCO_3$ و الهبس Hepes .

١-٢-١-٣ اللزوجية Viscosity

يأتي تأثير لزوجية الوسط الزرعي من مكونات المصل ، و التي تظهر أهميتها عند تعرض الخلايا إلى التحطم الميكانيكي من عملية رج المعلق الخلوي Cell suspension ، أو بعد تعرضها للتربسين Trypsinization في المستنبت أحادي الطبقة Monolayer Culture.

١-٢-١-٤ الشد السطحي و الترغي Surface tension & Foaming

يعزز الشد السطحي من التصاق الخلايا في الزرع الابتدائي Primary explant بسطح المادة الأساس . كما يعمل تقليله على تقليل الرغوة Foam المتكونة في الوسط المعلق الخلوي الحاوي على المصل Serum .

١-٢-٢ مكونات الأوساط الزرعية المُعرّفة Constituents of Defined Media

تختلف الأوساط الزرعية المعرفة Defined Media من بسيطة في مكوناتها مثل (MEM) (Eagle ,1959) إلى المعقدة في تركيبها مثل 199 (Morgan *et al* . ,1950) ، RPMI –1640 (Moor *et al* . ,1967) و F_{12} (Ham ,1965) . كما تختلف الأوساط في تركيز المواد المغذية فيها من الواطئ كما في F_{12} إلى العالي كما في (DMEM) (Dulbecco & Freeman ,1959; Morton ,1970).

يوضح الملحق(١) مكونات أحد الأوساط الزرعية (RPMI-1640) المستخدم في الدراسةحسب (Sigma, 2005).

أما أهم مكونات الأوساط الزرعية :

١-٢-٢-١ الأحماض الأمينية Amino Acids

تحتاج الخلايا في المستنبتات إلى الأحماض الأمينية الضرورية Essential Amino Acids بالرغم من اختلاف الأحتياجات بين خلية وأخرى . كما يمكن أضافة بعض الأحماض الأمينية غير الضرورية Non Essential Amino Acids إلى الوسط Shao (*et al*., 2002). بعض الخطوط الخلوية تحتاج الى الكلوتامين Glutamine كمصدر للكاربون الذي يعد المصدر الأساس للطاقة أكثر من استعمالها للكلوكوز (Bacquer *et al*., 2002) .

١-٢-٢-٢ الفيتامينات Vitamins

يحتوي وسط MEM فقط على مجموعة ب (Group – B) من الفيتامينات . أما الاحتياج الى الأنواع الأخرى من الفيتامينات فتأتي من المصل . الفيتامينات الذائبة في الدهون مثل فيتامين د vitamins D ، فيتامين كي vitamins K، فيتامين إي vitamins E و فيتامين أي vitamins A عادة لا تضاف إلى الوسط عند تحضيره. و أن وجدت فلا تكون نشطة بمرور الوقت بعد إضافة الوسط إلى الخلايا مما يدل على فائدته و ضرورته لبعض أنواع الخلايا ، لذا يجب أضافته منفصلاً (Mather & Roberts ,1998) .

١-٢-٢-٣ الأملاح Salts

تتألف الأملاح المضافة إلى الوسط بصورة رئيسية من أيونات الصوديوم Na^+ ، البوتاسيوم K^+ ، المغنيسيوم Mg^{+2} ، الكالسيوم Ca^{+2} ، الكلور CL^- و جذور الكبريتات So_4^{-2} ، الفوسفات Po_4^{-3} و البيكاربونات HCO_3^- . بعض تلك الأملاح تسهم في الحفاظ على ازموزية و حامضية الوسط مثل بيكاربونات الصوديوم $NaHCO_3$. أما الأيونات مثل Ca^{+2} ، Na^+ ، K^+ ، CL^- تنظم جهد الغشاء . بينما الكبريتات So_4^{-2} ، الفوسفات Po_4^{-3} والبيكاربونات HCO_3^- ينظم الشحنة داخل الخلية . تركيز بيكاربونات الصوديوم $NaHCO_3$ في الوسط يحدد من خلال تركيز CO_2 في الجو المحيط Gas phase (Freshney ,2000).

١-٢-٢-٤ الكلكوز Glucose

'يعد الكلكوز مصدراً للطاقة في الوسط . يتأيض بعملية التحلل السكري Glycolysis لتكوين البايروفيت Pyruvat و الذي قد يتحول بدورهِ أما إلى لاكتيت Lactateأو أستيل كو أنزيم أي Actyle CoA و الدخول إلى دورة كريبس Citric Acid Cycle لتكوين ثنائي أوكسيد الكاربون CO_2 (Luisier *et al*., 2002) .

الوسط المستخدم في الدراسة الحالية هو RPMI – 1640 و هو مختصر لـ Rosswell Park Memorial Institute . و الذي 'يعد من الأوساط المعقدة في تركيبها و يستخدم مع المصل .و يستعمل لأغراض المحافظة على استمرارية الخطوط الخلوية و خاصة مع خلايا الأنسان ، كما أمكن استخدامه مع أنواع أخرى من خلايا اللبائن (Pfrogner & Fresheny ,2004) .

١-٣ المصل Serum

يتكون المصل من خليط من جزيئات حيوية ذات أوزان جزيئية مختلفة لها فعاليات مختلفة من الاتزان الفسيولوجي المحفز و المثبط للنمو . فالمصل ليس سائل بسيط يتكون من أزالة فايبروجين البلازما ، ففضلا عن مختلف البر وتينات البلازمية ، البيبتيدات ، الدهون ، الكاربوهيدرات ، المعادن ...ألخ فأنه يحتوي على عوامل تتحرر من تجمع الصفائح الدموية Platelets aggregation مثل عامل النمو المشتق من الصفائح

الدموية Platelets Derived Growth Factor (PDGF) ، عوامل النمو المحولة –بيتا Transforming Growth Factor –*B* (TGF-*B*) و اللذان لا يتواجدان في البلازما . حيث يعمل الأول على حث نمو الخلايا مثل الأورمات الليفية Fibroblasts و الأخر يحث تمايز الخلايا مثل الخلايا الطلائية Epithelial cells .(Heldin & Westermark, 2000 ; Goddard *et al*.,2000)

من أهم الأمصال المستخدمة في الأوساط الزرعية هو المصل البقري Bovine Serum (سواء كان الجنين Fetal ، الوليد New born أو البالغ Adult)، مصل الحصان Horse Serum و مصل الأنسان Human Serum (Thompson *et al*. ,2002 ; Mather &Roberts ,1998). و يعد مصل جنين البقري Fetal Calf Serum (FCS) من أول و أكثر أنواع الأمصال أستخداماً في الزرع النسيجي (الخلوي و العضوي) ، حيث أمكن استخدامه لأغلب أنواع الخلايا Thompson *et al*. .(Carlo *et al*., 2004 ; Jan *et al*, 2003 ; ,2002)

١-٣-١ مكونات المصل المهمة في الزرع النسيجي

Serum consistent important in tissue culture

وضحت بعض مكونات المصل الضرورية لبقاء ونمو الخلايا خارج الجسم الحي في الملحق (2). ومن أهم هذه المكونات:

١-٣-١-١ البر وتينات Proteins

بالرغم من أن البروتينات تعد من أهم و أكبر مكونات المصل ألا أن دور الكثير منها في الزرع النسيجي خارج الجسم الحي *In Vitro* ما يزال مبهما . و هناك بر وتينات قليلة نسبياً يحتاج أليها الزرع النسيجي أكثر من غيرها (Freshney ,2000).

و من تلك البر وتينات

- **عوامل الارتباط والانتشار Attachment & Spreading factors**

معظم الخلايا الموجودة في داخل الجسم الحي *In vivo* مرتبطة مع غيرها من التراكيب مثل النسيج الرابط Connective tissue ، الغشاء القاعدي Basement

Membrane أو مع مطرق معدني Mineral matrix ،مثل خلايا العظم Bone cells لا تستطيع النمو خارج الجسم الحي *In vitro* كمعلق خلوي Cell Suspension . فإذا وضعت في المستنبت من دون أن ترتبط بسطح أو بغيرها من الخلايا فأنها ستموت . أما الخلايا الموجودة في الدم ، اللمف و غيرها من السوائل ، فهي و حدها التي تستطيع أن تنمو خارج الجسم الحي *In vitro* في معلق بصورة طبيعية . لذا فالدور المهم للمصل هو توفير عوامل ارتباط للخلايا في الزرع النسيجي خارج الجسم الحي و التي هي عبارة عن مكونات المطرق خارج الخلايا (Extra Cellular Matrix (ECM . فبعض أنواع الخلايا يجب أن ترتبط أولا بالمادة الأساس ومن ثم تنتشر قبل أن تبدأ بالتكاثر و تكوين طبقة أحادية. ألا أن ألتصاقها يكون بشكل غير مباشر بالسطح الزجاجي أو البلاستيكي للزرع النسيجي و إنما يكون عن طريق بروتينات المصل (Ali, 2000; Giard ,1988) . و من تلك البروتينات الفايبرونكتين Fibronectine ، فترونكتين Vitronectine ، لامينين Laminine و ثروبوسبوندين Thrompospodin التي تكون خلوية المنشأ. ألا أن الخلايا تفقدها عند عملية التربسين Trypsinaziton بعد كل زرع ثانوي ، عندها تحتاج إلى بروتينات المصل للارتباط (Ali,2000) . كما تعد هذه البروتينات من العوامل المشطرة Mitogenic factor (Freshney ,1995). و من البروتينات المصلية المدروسة الفايبرونكتين و هو من البر وتينات السكرية Glycoprotien الذائبة ذا الوزن الجزيئي العالي نسبياً الذي يتراوح ما بين (220 – 440) كيلو دالتن Mosher (1984,). عُين بروتين الفايبرونكتين لأول مرة عام 1948 عند تحضير مولد الليفين Fibrinogen (Mosesson & Umfleet ,1970) . يدمص Adsorbed هذا البروتين السكري مباشرة بالمادة البلاستيكية أو الزجاجية للزرع النسيجي حيث يوفر سطح محور Modified surface يسهل من ارتباط الخلايا (Hynes ,1992). أوجد الباحث المسعودي في عام 2004 أن للفايبرونكتين القدرة على زيادة الكفاءة و القابلية الألتهامية للخلايا البلعميةخارج الجسم الحي .

- **البر وتينات المرتبطة Binding protein**

يوفر المصل عدداً من البر وتينات المرتبطة وظيفتها حمل المواد الضرورية ذات الكتل الجزيئية الواطئة ، ومن تلك البر وتينات :

١_الألبومين Albumin

و هو من أهم بر وتينات المصل ، يتميز بوفرته و قلة وزنه الجزيئي 70.000 دالتن و يتكون في الكبد ، له وظائف عدة داخل الجسم الحي وخارجه (محي الدين و يوسف ، 1990) منها

- منظم لتغايرات الحامضية والقاعدية.
- حامل Carrier للهرمونات(مثل هرمون الثايروكسين) ، عوامل النمو ، الدهون مثل (الكوليسترول ، الحوامض الدهنية) ، الفيتامينات الذائبة في الدهون Lipophilic vitamins ، العقاقير Drugs ، المعادن ... و غيرها.
- منظم للضغط التناضحي Osmotic pressure .
- عامل حماية Protecting agent ضد التحطم الميكانيكي (والتي تشمل قوى القص Shear forces) (Tang *et al*., 2003).

٢_الترانسفرين Transferrine

و هو من بر وتينات بيتا – كلوبيولين B_Globulin المصلية .مهم لمعظم الخلايا في المستنبت حيث تمتلك مستقبلات خاصة للارتباط به . يعمل كناقل لأيون الحديديك ، حيث يرتبط معه و يقلل من سميته و خطره كمحطم للخلايا و يجعله مقبولا بيولوجيا Bioavailable . كما يعمل كمشطر للخلايا المستنبتة (Pfrogner & Freshney , 2004).

٣_بروتين ألفا $_2$– كلوبيولين المضاد للتربسين
a_2 – Macroglobulin (Anti trypsin)

أن إضافة المصل بعد عملية الزرع الثانوي و التي يستخدم فيها أنزيم التربسين تثبط أي نشاط أنزيمي متبقي محلل للبروتين و محطم للخلايا . يتم هذا الفعل من خلال بروتين ألفا$_2$ – كلوبيولين الذي يعد من أكثر بر وتينات المصل تركيزاً (Freshney ,200٠) . كما أن

لـــه فعـــلاً نـــاقلاً لمختلـــف الســـايتوكينات(الحـــركيـــات خلويـــة) Cytokines (Strieter *et al.*, 2002) .

١-٣-١-٢ الهرمونات Hormones و عوامل النمو Growth factors

يعرّف النمو على أنه مجموعة من الأحداث المتسلسلة و المعقدة و التي تشمل تنظيم أوجه متعددة من أيض الخلايا و المتضمنة ارتباط و انتشار الخلايا ، نقل Transport ، تخليق الجزيئات الكبيرة Macromolecular synthesis الانقسام الخيطي Mitosis ، حركة الخلية Cell movement ، تمايز الخلايا Cell differentiation و استخدام الطاقة Energy utilization (Mather & Roberts ,1998) . كما يعرّف النمو ببساطة على أنه زيادة في الحجم نتيجة لثلاث عمليات هي تضخم الخلايا و زيادة عددها و تكوين المادة بين الخلايا . تحتاج هذه العملية المنظمة إلى مواد أولية خارجية ، تعلب الهرمونات الدورالأساسي في توفيرهـــا للخلايـــا و في تحفيـــز عمليـــة الانقســـام الخلـــوي و عمليـــة إفـــراز المـــواد (البطاينة و جماعته ، 2002) . و الهرمون عبارة عن مادة كيماوية تتكون في منطقة معينة من الجسم الحي ، و تنتقل الى منطقة أخرى لإظهار تأثيرها (محي الدين و يوسف ، 1990)
ومن أهم تلك الهرمونات الضرورية للخلايا المزروعة في المستنبت

١_هرمون الأنسولين Insulin hormone

و هـو عبـارة عـن ببتيـد متعـدد Polypeptides وزنـه الجزيئـي 60.000 دالتن يفرز من خلايا بيتا Cells-*B* لجزر لانكرهانز Islend of Langerhans في البنكرياس (Raymond & Ruddon , 1981 ؛ محي الدين و يوسف ، 1990) . يتـــألف مـــن سلســـلتين مـــن الحـــوامض الأمينيـــة المرتبطـــة مـع بعضـها بجسـور ثنائيـة الكبريـت. يكـون هرمـون الأنسـولين ضـرورياً لجميـع أنـواع الخلايـا في المسـتنبت ، حيـث يعـزز مـن إدخـال الكلكـوز Glucose و الأحمـاض الأمينيـة Amino Acids ممـا يعـزز مـن نمـو الخلايـا (Ducluzeau et al ., 2002 ; Renata *et al*. 2000 ; Traxinger & Marshal 1989). و

نتيجة لتلك الصفة أو لقابلية الارتباط بمستقبلات عامل النمو الشبيه بالأنسولين Insulin like Growth Factor – 1 (IGF-1) فله تأثير مشطر Mitognic effect للخلايا المزروعة بالمنستنبت (Emmison *et al*., 1999) .

٢_ هرمونات القشرانية السكرية Glucocorticoids

و قد سميت بهذا الأسم لأنها تؤثر على أيض الكاربوهيدرات ، و تزيد من تكوين الكلكوز . و كذلك لكونها تفرز من قشرة الغدة الكظرية Adrenal cortex . و من أنواعها المهمة لخلايا المستنبت ، الكورتزول Cortisol و الدكساميثازون Dexamethasone و اللذان يعملان على تحفيز أو تثبيط تكاثر الخلايا في المستنبت اعتمادا على نوع و كثافة الخلايا (Lambillotte *et al*., 2002; Ottosson *et al*., 2000). يعمل الهايدروكورتيزون Hydrocortisone على تعزيز ارتباط الخلايا و تكاثرها (Chino *et al*. 2000; Chae *et al*., 2000).ولكن في بعض الحالات (مثل الكثافة العاليةللخلايا) ممكن ان يكون موقّفاً لنمو الخلايا Cytostatic ، وذلك بحثها على التمايز (Speirs et al.1991).

قد تحتاج بعض الخطوط الخلوية الى الهرمونات الستيرويدية Steroid Hormones التي تفرز أيضاًمن قشرة غدة الكظر مثل هرمونات أوستراديول Ostradiol ، الأندروجين (Androgen)، البروجستيرون (Progesterone) (Freshney ,1995).

٣_هرمونات الغدة الدرقية Thyroid hormones

و أهمها الثايرونين ثلاثي اليود (T_3) tri iodo thyronine تحتاج أليه بعض الخطوط الخلوية لأغراض النمو (Bocanera *et al*., 1999).

هناك عوامل مفترضة تسهم في نمو وتكاثر و تمايز أنواع مختلفة من الخلايا . و في حالة التوصل إلى منشأ و تخليق و تحرير و أيض و آلية عمل هذه العوامل ، فعند ذاك يمكن اعتبارها هرمونات (البطاينة و جماعته ، 2002) . معظم عوامل النمو هذه توجد في المصل بتراكيز قليلة تقدر بالـ نانوغرام / مل أو أقل ، و هي عبارة عن ببتيدات متعددة . بعضها يكون متخصصاً

لنوع معين من الخلايا لحثها لمراحل متقدمة من التمايز مثل عوامل النمو المكونة للدم Hemaopoietic Growth Factor (HGF) . و البعض الأخر يكون أقل تخصصاً حيث يعمل على سلالات مختلفة من الخلايا مثل عامل نمو البشرة Epidermal Growth Factor (EGF) و الذي يحفز نمو خلايا الأرومة الليفية Fibroblasts و خلايا الأدمة Epidermal cells . و قد يحفز نوعاً واحداً من الخلايا إلى عدد من عوامل النمو ، فالأرومات الليفية تستجيب لعامل النمو للأرومات الليفية Fibroblasts Growth Factor (FGF) و عامل نمو البشرة (EGF) و عامل نمو المشتق من الصفائح الدموية (PDGF) ، حيث تعمل بعض هذه العوامل بصورة متزامنة Synergistically مع بعضها البعض (Freshney ,1995).

١_عامل النمو المشتق من الصفائح الدموية Platelets Derived Growth Factor (PDGF)

و هو عبارة عن عامل متعدد الببتيد موجب الشحنة وزنه الجزيئي 13.000 كيلو دالتن يتحرر من حبيبات ألفا الموجودة في الصفائح الدموية في أثناء تجمعها بعملية التخثر (Bullock *et al.*, 1994). له نشاط مشطر و يعد من أهم عوامل النمو في المصل ، ويعمل علىتحفيز نمو خلايا الأرومة الليفية وخلايا العصبية Glial cell و خلايا العضلات الملساء خارج الجسم الحي (Heldin & Westermark, 2000 ; Banai *et al*., 1998). أما داخل الجسم الحي فله دور في المواقع التالفة في مناطق الجرح حيث يعمل على تحفيز تكاثر خلايا العضلات الملساء في جدران الشرايين بالإضافة إلى خلايا الأرومات الليفية باعتبارها جزءاً من عملية التئام الجروح (Chang *et a*l., 2004 ; Heldin & Westermark, 2000).

٢_عامل النمو Transforming Growth Factor – *B* (TGF-*B*)

عامل نمو ببتيدي متعدد يتحرر من الصفائح الدموية عند التخثر يعمل على تثبيط النمو أو يحث تمايز الخلايا الطلائية (Goddard *et al.* ,2000). كما وجد أ ن لهذا العامل تأثيراًمحفزاً لنمو خلايا الأرومات الليفية و حثها على تصنيع الكولاجين Collagen (Duncan *et al*., 1999).

٣_العوامل الشبيهة بالأنسولين Insulin – Like Growth Factor (IGF)

هي مجموعة من ببتيدات متعددة و التي يكون تركيبها مقارباً نسبياً للأنسولين. وزنها الجزيئي 7000 كيلو دالتن . كما أن لها فعل الأنسولين حيث يرتبط مع مستقبلات الأنسولين التي بدورها ترتبط بمستقبلاتهم ولكن بألفة أقل . ألا أنهما لا يتمكنان من أن يتعادلا مع الأجسام المضادة للأنسولين Sinha *et al* . ,1990) ; Niedzwiedzka ,2000). هناك نوعان من العوامل الشبيهة بالأنسولين النوع الأول و الثاني (IGF –1 & IGF-2) و لابد من تواجدهما مع الأنسولين للحصول على ظروف مثالية لنمو و تكاثر عدد من أنواع الخلايا خارج الجسم الحي . كما أن لهما دوراً تنظيمياً في دورة الأنقسام الخلوي للأورمات العصبية في أثناء فترة النمو الجنيني . (البطاينة و جماعته ، 2002 ؛ Hartmann et al . ,2005) . لهما فعل مشطر حيث يكون أقوى بعشر مرات من الأنسولين ، ألا أنهما يمثلان 5 – 10 % من النشاط المشطر للمصل (Freshney ,2000 ; Hartmann *et al.* ,2005).

١-٣-١-٣ الدهون Lipids

تحتاج العديد من الخلايا إلى مصدر خارجي للأحماض الدهنية لكي تنمو خارج الجسم الحي ، بسبب أن التصنيع الحيوي Biosynthesis للأغشية من أستيل كو أنزيم أي Acetyle CoA يحتاج إلى الكثير من الطاقة (Freshney ,2000) . و ‘يعد المصل المصدر الغني بالدهون بأنواعه المختلفة و الضروري لبقاء الخلايا و لاسيما للنمو . حيث تختلف الخلايا في احتياجاتها للدهون الفسفورية Phospholipids ، اللسثين Lecithin و الكوليسترول Cholesterol و الأحماض الدهنية الضرورية Essential fatty acids مثل Oleic acid, Lenolic acid). توجد الدهون في المصل بشكل مرتبط مع بروتيناته مثل الألبومين أو بشكل معقد مع البروتينات ليكّون البروتينات الدهنية Lipoproteins لذلك فأن الدهون تكون قليلة الذوبان أو لا تذوب في الماء (Burton *et al.*, 2000) .

١-٣-١-٤ المعادن و العناصر النادرة Mineral & Trace elements

دور العناصر النادرة غير العضوية مثل النحاس Cu ، الخارصين Zn ، الكوبالت Co ، منغنيز Mn ، موليبديوم Mo ، فناديوم Va ، الحديد Fe و السيلينيوم Se الموجودة في المصل و المرتبطة ببر وتينات المصل لم تفسر بصورة دقيقة (Freshney ,2000) . و حسب (Hewlett ,1991) ، يعد السيلينيوم المعدن الوحيد النادر الذي له تأثير واضح على الخلايا و لاسيما الخلايا البشرية . فأوكسيد السيلينيوم SeO_2 له دور كمرافق أنزيمي يعمل على تنشيط عدد من الأنزيمات الضرورية بالعمليات الأيضية لإزالة السمية مثل أنزيم glutathione peroxidase . كما يعمل السيلينيوم على إخماد فعل الجذور الحرة مثل الجذور الحرة للأوكسجين السامة للخلايا Cytotoxic oxygen free radical كما أكد ذلك الباحثين(Obera et al.,2001.;Daryl *et al.*2003).

١-٣-١-٥ المغذيات و المؤيضات Nutrient & Metabolites

يحتوي المصل على أحماض أمينية Amino Acids ، كلكوز Glucose ، الكيتونات الحامضية Ketoacids و عدد من المغذيات الأخرى و المؤيضات الوسطية Intermediary metabolites . تلك المكونات تكون ضرورية في الوسط الزرعي ولاسيما الأوساط الزرعية البسيطة Simple media (Freshney ,2000).

يوضح الملحق(3) يبن جانب من أهم مكونات لمصل جنين الأبقار حسب (Lindl & Bauer ,1989).

١-٤ الإبل

١-٤-١نبذة تاريخية عن الإبل

أشار القران الكريم الى الإبل و دقة خلقها و لما تلعبه من دور في حياة الإنسان و تأريخه و فوائدها التي لا تحصى . فقد ورد ذكرها في القرآن الكريم في أكثر من موضع ليبين الله سبحانه و تعالى للناس قدرته في الخلق و لإبراز مكونات هذا الحيوان العجيب الذي سخره الله لخدمة الإنسان ، فقال تعالى {أفلا ينظرون إلى الإبل كيف خلقت } (الغاشية /١٧) . و لقد ورد ذكر الإبل في القرآن الكريم في موضعين و الناقة في سبعة مواقع (أبن كثير ، 1969) .

يعتقد أن الإبل نشأت في أمريكا الشمالية في العصور القديمة (في العصر الأيوسيني) و كان حجمها حينذاك صغيرا مماثلا لحجم الأرنب ولها أربع أصابع في كل قدم و أسنا مها غير متميزة . و بقيت كذلك لفترة تقدر بنحو 40 مليون سنة (وردة، ١٩٩٦; Tibary ,1997 ; Nowak ,1999) . بعدها تطور حجم الإبل كثيراً و هاجرت من أمريكا الشمالية إلى مناطق مختلفة من العالم .حيث تباينت أشكالها تبعاً للبيئات التي انتقلت أليها و منها المناطق الصحراوية و شبه الصحراوية في الشرق الأوسط و شمال أفريقيا حيث 'عثر على بقايا للإبل في فلسطين تعود إلى 1800 سنة قبل الميلاد (Johnson *et al.* ,1969) . و قد ذكرت الإبل لأول مرة في بابل قبل 1900 سنة قبل الميلاد (Higgin ,1986).

من جهة أخرى ذكر ستانلي (Stanely) عام 1985 أن الإبل ذات السنامين لها تأريخ قديم جداً في الصين قد يعود الى العصور الجليدية ، حيث وجدت بقايا لعظام الإبل في الصين منذ 6000 سنة . و لكنها لم تعرف هل هي عظام الإبل مستأنسة أو برية و مثل هذه الأمور هي التي أخرت معرفة تاريخ و مكان استئناس الإبل و استخدامها من قبل الإنسان (العوامي ، 1985).

١_٤_٢ تصنيف الإبل

الإبل من الحيوانات المجترة تعود إلى رتبة الحافرية Ungulata و من رتبة مزدوجات الأصابع Artiodatyla و الفصيلة الفرعية Tylopoda ، و هي ذات أقدام غليظة و من العائلة الإبلية Camelida . و يعتقد الباحثون أن جنس الإبل *Camelus* الذي يضم نوعين من الإبل هما ذات السنام الواحد *Camelus dromedaries* التي توطنت الشرق الأوسط و شمال أفريقيا ، و ذات السنامين *Camelus bacterianus* و توطنت شرق آسيا و وسطها و هي أكثر ضخامة من النوع الأول كما أن الوبر الناتج عنها أكثر كثافة ، هما أقدم الإبل المعروفة حتى أنها سميت الإبل العالم القديم . أما جنس اللاما Lama فيضم أربعة أنواع *Lama guanicas* ، *Lama glama* ، *Lama pacos* ، *Lama vicugna* و هي الإبل العالم الجديد ، تتميز بصغر

حجمها و توجد في أعالي جبال أمريكا الجنوبية (وردة، ١٩٩٦; Hickmann *et al*. ,1998 ; Hillis *et al* . ,1996 ; Nowak ,1999).

التسلسل التالي يبين تصنيف و موقع الإبل العربية في المملكة الحيوانية

المملكة الحيوانية	Kingdom : Animalea
تحت المملكة عديدة الخلايا	Sub kingdom : Metazoa
شعبة الحبليات	Phylum : chordata
تحت شعبة الحبليات	Subphyllom : chordata
صنف اللبائن	Class : mammalia
تحت صنف الثديات الحقيقية	Sub class : Placentaries
رتبة الحيوانات الحافرية	Order : Ungulata
تحت رتبة ذوات الخف	Sub order : Artiodactyla
الفصيلة الفرعية وساديات القدم	Tylopoda
العائلة الإبلية	Family : Camelides
جنس الإبل	Genus : Camelus
نوع ذي السنام الواحد	Type : *Camelus dromedarius*

١_٤_٣ الإبل العراقية Iraqi camels

ُتعدّ المنطقتان الوسطى و الجنوبية مركزاً لتربية الإبل في العراق ، إذ يبلغ إنتاج الوسطى 51% و الجنوبية 47 % ، و في الشمالية 2 % فقط . و يقسم العراق من الناحية البيئية إلى ثلاث مناطق تصلح لتربية الإبل و هي:

1. بادية الجزيرة : و تشمل المناطق الواقعة ما بين دجلة و الفرات في الناحية الشمالية و تضم محافظة نينوى .

2.البادية الشمالية : و تشمل محافظة كر بلاء ، النجف و الأنبار حيث تتواجد أكبر نسبة منها.

3. البادية الجنوبية : و تشمل محافظة المثنى . (أكساد ، 1989) .

و هناك نوعان رئيسيان من الإبل في العراق هما

- الخّوار : و تنتشر في البادية الشمالية و بادية الجزيرة و بين سوريا و العراق . و تتميزِ الإبل سلالة الخّوار بحجمها المتوسط و رأسها الصغير و أطرافها الرفيعة و ذيلها الدقيق ، ألوانها فاتحة كما أن إنتاجها من الحليب مرتفع .

- الجودي : و تنتشر في البادية الجنوبية و تميز جمال هذه الإبل بعظامها الكبيرة و أجسامها الضخمة و تستخدم لأغراض الحمل و التنقل (العاني و جماعته ، 1990).

أشارت الندوة العراقية في جامعة بغداد سنة (1988) إلى أن موسم تناسل في الإبل في العراق يبدأ ابتداءاً من شهر تشرين الأول و يستمر حتى نيسان . و تتميز هذه الفترة بهطول الأمطار و نمو نباتات المرعى مما يزيد من نشاط الفحول الجنسي و إنتاج السائل المنوي الجيد .

١-٤-٤ بعض الخصائص الوظيفية للإبل Physiological feature of camel

- تختص الإبل بقدرة عالية على الرعي على العشرات من النباتات الصحراوية ذات القيمة الغذائية المنخفضة و الطبيعة الملحية العالية، حيث تكون نسبة السوائل المالحة

حوالي 30% من وزن الجسم وهي من أهم مصادر الماء للحيوان في حالة ندرته (Maloiy & Clemens, 1988).

- يستطيع الإبل أن يكون مجالاً حرارياً واسعاً لدرجة حرارة جسمه بحوالي ٧ درجات مئوية بما يتلائم إلى حد ما مع درجة حرارة الجو (حسون وجماعته، ١٩٩٠).

- تمتاز الإبل عن معظم الحيوانات بقدرتها الفائقة على تأمين تثبيط معدل توليد الحرارة الداخلية عن طريق تخفيض معدل الأيض عند تعرضه الى ظروف الجفاف (Bengoumi *et al.*1999).

- القدرة على شرب كميات كبيرة من الماء خلال فترة قصيرة من الزمن حيث تستطيع شرب ٢٠٠ لتر من الماء في مدة لاتتجاوز ثلاث دقائق ومن ثم تستطيع تنظيم فقدان هذه الكمية لفترة تتجاوز الأسبوعين(العاني وجماعته، ١٩٩٠).

- تمتاز الأوعية الدموية الشعرية بكونها سميكة الجدران وضيقة إلى الحد الذي لا تسمح فيه ألا لمرورخلية حمراء واحدة .فضلا عن ذلك لا توجد ثقوب في جدران الأوعية الدموية الشعرية ، لذا فأنها تمنع فقدان الماء من الدم عن طريقها الى المسافات البينية و بالتالي تحافظ على ثبات حجم الدم (Al-Qarawi *et al*. 2002).

- الإبل من الحيوانات موسمية التناسل في كلا الجنسين . يكتمل النمو الجنسي للناقة ولذكور الإبل بعمر ٣ سنوات ، متوسط فترة الحمل ٣٧٠ يوم وموسم التناسل و الولادة يترافق عادة مع موسم الأمطار ووفرة الغذاء في المراعي (Sghiri &Driancourt,1999).

١_٤_٥ دم الإبل Blood of Camel

يعد الدم واحداً من الأنسجة المهمة للحيوان نظراً للديناميكية التي يتصف بها و التي تجعله بحكم حركته المستمرة و المنتظمة يتحسس بالتغيرات الحاصلة في مختلف خلايا الجسم و أنسجته حيث يعد الوسط الناقل للجسم . وهو عبارة عن سائل لزج كثيف يقع ضمن الأنسجة الرابطة السائلة Liquid connective tissues . تبلغ كثافته 5 مرات كثافة الماء ، و يبلغ الرقم الهيدروجيني pH 7.4 في الأحوال الاعتيادية ، و هو يكون حوالي 6-10% من وزن الجسم اعتمادا على نوع الحيوان (Stevens & Lowe, 1991). في الإبل يكون اللون الغالب للدم احمر قاني (Yashwat, 2000).

يتألف الدم من جزئين رئيسين ، الجزء السائل (البلازما Plasma) و الجزء الخلوي Cellular و على الصفائح الدموية Platelets .

١_٤_٥_١ خلايا الدم Blood cells

يحتوي دم الإبل على نفس أنواع من الخلايا كما هو الحال في اللبائن الأخرى هي خلايا الدم البيض White Blood Cell و كريات الدم الحمر Red Blood Corpuscular .

١-٤-٥-١-١خلايا الدم البيض (Leuckocytes) WBC

لم يلاحظ في الإبل ما يشير إلى أن هناك أية تحويرات وظيفية مهمة للخلايا البيض كمظهر من مظاهر الأقلمة للحياة الصحراوية . و تقوم هذه الخلايا بوظائفها المعروفة في الحيوانات الأخرى من مقاومة العوامل الالتهابية و المرضية (Shringi ,2001) .

اتفقت العديد من الدراسات على أن عدد خلايا دم البيض في الإبل يفوق الحيوانات الأخرى (Shringi., 2001 ; Sarwar & Majeed ,1997 ; Haroun *et al.*1996 ; Salman & Afzal ,2004). ألا أن عدد خلايا دم البيض اختلفت حسب الفصلية و الظروف الفيزيائية و البيئية المحيطة بها ، حيث يتراوح معدل عددها في دم الإبل الطبيعية ما بين

7.0 _ 17.0 ألف خلية / ملم^{3} من الدم (Salman & Afzal,2004). أما في الإبل العراقية فيتراوح عددها ما بين 7.85– 14 ألف خلية / ملم^{3} من الدم (حسن ، 2005) .كما أن غالبية خلايا الدم البيض في دم الإبل هي من نوع خلايا العِدلة حيث بلغت النسبة المئوية لها (64.5%) من المجموع الكلي لعدد لخلايا دم البيض تليها الخلايا اللمفاوية (34%) ، الخلايا وحيدة النواة (0.9%) ، خلايا الحِمضة (0.6%) و خلايا القعدة(1.0%) (Haroun *et al.* ,1996) .و تشير دراسة (Nazifi *et al.*,1998) إلى عدم وجود فروق في عدد خلايا الدم البيضاء بين الذكور و الإناث الإبل .

١-٤-٥-١-٢كريات الدم الحمر RBC (Red Blood Corpuscular)

تنفرد كريات الدم الحمر للإبل عن مثيلاتها في اللبائن الأخرى ، حيث أن التغيرات الوظيفية التي تعاني منها هذه الحيوانات في محاولتها لتنظيم اتزانها البدني تفرض تغيرات مختلفة على الدم تؤثر بشكل مباشر أو غير مباشر على الكريات الحمر . حيث أن خصائص و طبيعة تركيبها تساعد الإبل على تحمل الظروف البيئية الصحراوية (Yashwat, 2000 ; Wernery *et al.* ,1999 ;Schroter et al.1990) .تتصف كريات الدم الحمر للإبل بكونها بيضوية الشكل مفلطحة عديمة النواة . كما لوحظ بان شكل و حجم الكريات الحمر لا يتغير كثيراً عند الجفاف أو الارتواء، الأنه بعد فترة أطول من الجفاف يقترب شكلها من الشكل الدائري . كما تتميز هذه الكريات بقابليتها على التمدد أكثر من كريات الدم الحمر لدى اللبائن الأخرى ومنها دم الإنسان (Wernery *et al.* ,1999 ; Warda & Zeisig ,2000) . تتميز هذه الكريات بمقاومتها للهشاشة التناضحية في محاليل منخفضة التوتر (حيث يبلغ الحد الأقصى لها 0.1 _ 0.2 % و الحد الأدنى 0.3% من كلوريد الصوديومNaCL) . لذا فأن الإبل تستطيع تحمل التقلبات الشديدة في تركيز المحتوى المائي تبعاً لجفاف البيئة المحيطة بها حتى أنها تستطيع أن تفقد قرابة 40 % من وزن جسمها ماء دون ظهور أعراض مرضية (Wernery *et al.* ,1999 ; Ramadan ,1994).

تمتاز كريات الدم الحمر بصغر حجمها و زيادة عددها و ارتفاع نسبة خضاب الدم بالمقارنة مع الكثير من الثديات حيث يبلغ عددها ما بين 7.5 _17.0 مليون خلية / ملم ^{3} من الدم . أما متوسط حجم كرية الدم الحمراء Mean Corpuscular Volume (MCV) ٢٨.٥مايكرون مكعب . والى انخفاض حجم الخلايا المرصوص Packed Cell Volume (PCV) البالغة 25-36 % . أما تركيز خضاب الدم لكريات الدم الحمراء(Hb) Hemoglobin فتتراوح ما بين 8.4 _ 15.1 غم / ديسيليتر (Haroun *et al.* ,1996). يعتبر المعدل الخلوي لخضاب الدم لكريات الدم الحمر للإبل Mean Corpuscular Hemoglobin(MCH) منخفضاً نسبياً نظراً لكثرة كريات الدم صغيرة الحجم و زيادة معدل تركيز خضاب الدم للخلية Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) .و قابلية عالية للإتحاد بالأوكسجين حيث بلغت 11MCH_ 20 بيكو غرام وMCHC ٥٤.٥ % و على التوالي (Mohamed & Hussein ,1999). أما الإبل العراقية فقد بلغت عدد كريات الدم الحمراء 4.46_ 7 مليون خلية/ملم ^{3} و تركيز Hb 10.67_ 12.8 غم / ديسيليتر و حجم الخلايا المرصوصة PCV 17.3_ 26 % (حسن ، 2005) .

تميزت الصفيحات الدموية في الإبل بكونها بيضوية الشكل حيث شوهدت أعداد كبيرة منها في طحال الإبل صغيرة العمر ألا أن عددها يقل كلما تقدمت بالعمر (Zidan *et al.* 2000) . و قد بلغ عددها في دم الإبل العراقية ما بين 309—112 إلف/ملم^{3} من الدم (حسن ،2005).

١_٤_٥_٢ بلازما الدم Blood plasma

يتكون البلازما بشكل أساسي من مزيج من المصل و الفايبرنوجين . و هو عبارة عن وسط ناقل لخلايا الدم المختلفة ، نواتج الأيض فضلا عن بعض المواد الغذائية الذائبة مثل البروتينات ، الأحماض الأمينية ، الكاربوهيدرات ، الشحوم و الأملاح . و تقوم البلازما كذلك بنقل

الأضداد Antibodies ، الخمائر Enzymes ، الهرمونات Hormones و الفيتامينات Vitamines. (Stevens & Lowe, 1991). أن كمية الماء الموجودة في بلازما دم الإبل تمثل 16 % من كمية الماء الكلية الموجودة في الجسم و هي مماثلة لما هو موجود في الإنسان. و تنخفض هذه الكمية بنسبة العشر عندما يفقد الإبل حوالي 23 % من كمية الماء الموجودة في جسمه و بنسبة الثلث في الإنسان (زايد و جماعته ، 1991).

أن أكثر من بروتين بلازمي تمت دراسته و وصفه و قياسه في الإنسان و الحيوانات الأخرى و يشمل حوالي 5- 7 % أي 50_ 70 غم / لتر من البلازما ; (Jennifer ,2000 ; Kaneko ,1997).و بسبب تصنيع البروتين في الفرد أو النوع الذي يتم تحت سيطرة جينية لذلك يتوقع الاختلاف ما بين الأفراد و الأنواع (Keay & Doxey ,1982) . و قد تمت دراسة هذه البر وتينات بكثرة في الحيوانات ، ألا أن قليلاً من الدراسات اهتمت ببروتينات بلازما الإبل (Chaudhary *et al.* ,2003 ; حسن ، 2005) . سجلت في الإبل نسبة عالية من البروتين الكلي Total protein مقارنة بجميع الحيوانات الحقلية (Salman & Afzal ,2004) . كما تتميز بلازما الإبل باحتوائها على تركيز عالٍ من الألبومين كما لوحظ بأن تركيز الألبومين / كلوبيولين Globulin / Albumin في الإبل ذات السنامين أعلى بكثير من المجترات (Lui ,2003) . كما سجل ارتفاع مماثل في الإبل ذات السنام الواحد في دراسة قام بها Chaudary عام 2003 ،كما وجد بأن نسبة البروتين الكلي و الألبومين و كاما – كلوبيولين Gamma –globulin في الحيوانات البالغة Adult أكثر من صغار الإبل Calves.

يلاحظ من الدراسات في الإبل أن مستوى الكلكوز Glucose في الدم مرتفع مقارنة ببقية الحيوانات (Al-Sultan, 2003، . Wensvoort *et al.* ,2004). و لاحظ كل من (Nazifi *et al.* ,2000 ;. Mohamed & Hussien ,1999;Manefield &Tinson1996) ارتفاع نسبة الكوليسترول Cholesterol و الكليسيردات الثلاثية Triglycerid مع تقدم عمر الحيوان .

لاحظ الباحث حسن (2005) عدداً من القيم الكيموحيوية (Biochemical Value)النسبة للإبل العراقية البالغة منها

البروتين الكلي	Total protein	49.8 – 72 غم/لتر
الكلكوز	Glucose	880 – 1560 ملغم/لتر
اليوريا	Urea	33.6 – 47.5 ملغم/ديسيليتر
حامض اليوريك	Uric acid	0.33 – 4.2 ملغم/ديسيليتر
كرياتين	Creatinine	5 – 11 ملغم/لتر
البوتاسيوم	K^+	4.5 – 5.36 ملي مكافئ/لتر
الصوديوم	Na^+	138 – 162 ملي مكافئ/ لتر

و لقلة الدراسات المنجزة في العراق حول نسب و قيم مكونات بلازما دم الإبل ، يوضح الملحق(4) تلك المكونات في بلازما الإبل ذي السنام الواحد البالغ.

١_٥ الوراثة الخلوية Cytogenetic

علم الوراثة الخلوية ، هو علم دراسة الكروموسومات Chromosomes بمستوى خلوي Cellular level (Roony & Czepulkowski,1992) . جميع المواد الجينية الدنا DNA و المنتظمة بتركيب يدعى بالكر وموسوم Chromosome توجد داخل وحدة صغيرة يمكن مشاهدتها بالمجهر الضوئي تدعى بالنواة Nucleus . الخلايا الكبيرة في جسم الإنسان تتصف بكونها خلايا متخصصة Specialized cells لعدم قدرتها على الانقسام ، لذا لا يمكن مشاهدة كروموسوماتها عند تصبيغ نويّاتها بالطرق الروتينية .هناك عدد قليل من الأنسجة (خلاياها لها دورة انقسام نشطة) مثل خلايا الطبقة الطلائية الجرثومية

Germinal cell epithelium ، نخاع العظم Bone marrow ، الطحال Spleen و العقد اللمفاوية Lymph node و التي يمكن مشاهدة كروموسوماتها باستخدام تقنية الزرع النسيجي المباشر Direct tissue culture technique. أن معظم العينات المستخدمة في دراسة الوراثة الخلوية لا تمتلك العدد الكافي لخلايا في مرحلة الانقسام الخيطي Mitotic division لأجراء الدراسات الكروموسومية ما لم تتم زراعتها مسبقاً و باستخدام تقنية الزرع النسيجي غير المباشر Indirect tissue culture technique . لذا أصبحت تقنية الزرع النسيجي Tissue culture technique أداة مكملة للأبحاث الكروموسومية Hamerton , (1971 ؛ Verma & Babu ,1989 ؛ Roony & Czepulkowski,1992) . حيث أن العدد الصحيح لكروموسومات الإنسان لم يعرف ألا بعد أستخدام تقنيات الزرع النسيجي .فقد كان الاعتقاد سائداً بأن عدد كروموسومات المضاعفة Diploid chromosome في الخلايا الجسمية للإنسان Somatic cells ما بين (37-48) كروموسوم . وقد ظهر هذا الاعتقاد نتيجة للدراسات التي قام بها (Painter, 1923). ألا أن الدراسة التي قاما بها الباحثان Tjio &Levan سنة 1956 من خلال زرع خلايا الأورمات الليفية Fibroblasts و المأخوذة من رئة جنين الإنسان

Human embryonic lung fibroblasts وجدا بأن عدد الكروموسومات الصحيح هو 46 كروموسوم . كما استخدما الكولجسين Colchicine و هو عقار مستخرج من نبات زعفران الخريف (autumn corcus) *Colchicum autumnale* لإيقاف الخلايا المنقسمة عند الطور الاستوائي Metaphase (Tjio & Levan ,1956) . وفي السنة نفسها ، وبصورة مستقلة توصل الباحثان Ford & Hamerton إلى أن الكروموسومات في خلايا الانقسام الاختزالي Meiotic cells و المأخوذة من نسيج الخصية Testicular biopsy هي 23 كروموسوم (Ford & Hamerton ,1956) .كان لهذه الدراسات دور في بداية علم الوراثة الخلوية الحديثة في الإنسان (Jorge & Yunis ,1974 ؛ Verma &Babu ,1989 ; Yaseen *et al* ,1999) هناك عدة اكتشافات لها أهمية خاصة في تطور تقنية الوراثة الخلوية في الإنسان . ففي عام 1952 أستخدم محلول واطئ التوتر Hypotonic solution للحصول على انتشار أفضل

للخلايا في الطور الاستوائي من قبل الباحث Hsu (1952, Hsu). و في عام 1960وجد أن للمادة (PHA) Phytohemoagglutnin المستخرجة من بذور الفاصوليا الحمراء *Phaseolus vulgaris* تأثيراً مشطراً Mitogenic effect على الخلايا اللمفاوية Lymphocytes للدم المحيطي لتحفيزها على الانقسام (Nowell, 1960) . وهاتان التقنيتان أعطتا دفعة قوية للتطور في مجال تقنية الوراثة الخلوية للأنسان حيث أمكن الحصول على عدد كبير من الخلايا في الطور الاستوائي خلال 69-72 ساعة (1989, Verma & Babu). أن المحاولة الأولى لدراسة الكروموسومات باستخدام مستنبتات لكريات الدم البيض Leuckocytes من الدم المحيطي Peripheral blood كانت من قبل الباحث كرستشكوف Chrustschoof و زملائه سنة 1931 . و في سنة 1935 نشروا تفاصيل تقنية الزرع النسيجي لكريات الدم البيض للأنسان (1971, Hamerton) . و يعد تحليل كروموسومات الخلايا اللمفاوية من الدم المحيطي الحجر الأساس لتشخيص الكثير من المتلازمات و الأمراض الوراثية كون الدم المحيطي اكثر الأنسجة استخداماً لسهولة الحصول عليه و لعدم تسببه في مشاكل غير مرغوب فيها في المتطوعين لمثل هذه التجارب (1992, Rooney & Czepulkowski) .

أن أستخدام طريقة معتمدة للزرع النسيجي قصير الأمد Short –term culturing (Moorhead *et al.*, 1960) ،و استخدام مادة الـ PHA كمشطر للخلايا اللمفاوية(Nowell, 1960) أحدثا تطوراً في مجال الوراثة الخلوية السريرية و السرطانية . حيث أصبحت قواعد الوراثة الخلوية أداة أساسية في تشخيص الأمراض بعد اكتشاف الكر وموسوم الإضافي Chromosome 21 (trisomy 21) في سنة 1959 من قبل العالم Lejeune و هي صفة مميزة للهيئة الكروموسومية للمنغوليين Mangol patients ، حيث تعتبر أول ظاهرة في بشر اكتشفت علاقتها بالأختلالات الكروموسومية (Lejeune, 1959) . كما أن أول و أهم اكتشاف في حقل الوراثة الخلوية السرطانية كانت في سنة 1960 عند Philadelphia (Ph) chromosome في شخص مصاب بسرطان الدم النخاعيني المزمن Chronic Myelocytic Leukemia (CML)من قبل الباحثين Nowell & Hungerford (1960). و في سنة 1972 طوّر مختبر Casperssons laboratory طريقة لتصبيغ الكروموسومات أطلق عليها التحزيم

Banding حيث تميز الكروموسومات إلى مناطق فاتحة و غامقة تدعى بالحزم Band مما زاد في دقة الدراسات الكروموسومية (Caspersson *et al.*,1972) وفي الوقت الحاضر أصبحت قواعد الوراثة الخلوية تطبق على نطاق واسع في الكثير من الدراسات، لاسيما في حقل الوراثة الخلوية السرطانية (جعفر، ١٩٩٩؛ الجشعمي، ٢٠٠٠ ؛ منهوب؛ ٢٠٠١ ؛ الطائي، ٢٠٠٣ ؛حامد، ٢٠٠٣)

٢- المواد و طرائق العمل

1-2 المواد

٢-١-١ الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة

أسم الجهاز	الشركة المجهزة	المنشأ
الأليزا ELISA	Organon techniqua	Germany
حمام مائي Water bath	Percisterm	Germany
ميزان حساس Sensitive balance	Precisa	Switzerland
حاضنة مبردة Cooling incubator	GallenKamp	U.K
كابينة معقمة Laminar air flow safety cabinat	Gelaire class gelman instrument	U.K
جهاز نبذ مركزي مبرد Cooling centrifuge	Chilipson	U.K
جهاز نبذ مركزي Centerifuge	Universal 16A	U.K
مجهر ضوئي مقلوب Inverted Microscope	Opton	Germany
مجهر ضوئي مركب	Olympus	Japan

		Compound Light microscope
Germany	Retsch	مازج Mixer
England	Arnold & Sorics	جهاز تعقيم(موصدة) Autoclave
U.K	GallenKamp	مقياس الرقم الهيدروجيني -pH Meter
U.K	Stanton	ميزان حساس Sensitive balance
U.K	GallenKamp	فرن Oven
U.S.A	Nalgene	مرشحات نبيذة Disp.filters
	السوق المحلية	صندوق مبرد Cooling box
U.K	Gallenkamp	محرك مغناطسي Magnetic stirrer
Germany	Karlkolb scientific tech.supp.	جهاز تفريغ Vacum pump
Germany	Kottermann	جهاز تقطير Distiller
Chine	Hamilton	محاقن طبية ومحاقن دقيقة Syringes & Microsyringes
Germany	Assistant	شريحة العد التفريقي

		Improved double Neubauer ruling
U.K	Beliver Industrial	أنابيب زجاجية حجم 10مل Siliconized tube
U.K	Flow Lab.,Irvine	أطباق الزرع النسيجي متعدد الحفر ذو 96 حفرة مسطحة Microtitter plate for tissue culture with 96 flat bottom
U.S.A	Falcon	قناني بلاستيكية للزرع النسيجي حجم 25 سم^{2} Plate bottles for tissue culture

٢_١_٢ المحاليل الكيميائية المستخدمة في الدراسة

أسم المادة	الشركة المجهزة	المنشأ
الراصة الدموية النباتية Phytohemagglutinin	المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية	Iraq
مصل دم البقري Bovine serum	المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية	Iraq
ستربتومايسين Streptomycine	مصنع أدوية سامراء	Iraq
جنتامايسين Gentamycine	مصنع ادوية سامراء	Iraq
بلازما الدم البشري Human plasma	مصرف الدم-بغداد	Iraq
بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate	BDH chemical	England
الوسط الزرعي RPMI-1640 Media	Sigma	U.S.A
كولجسين Colchicine	شركة القاهرة للأدوية و الصناعات الكيميائية	Eygpt
الكحول المثيلي المطلق Absolute Methanol	BDH chemical	England
حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic Acid	BDH chemical	England
صبغة الكمزا	BDH chemical	England

		Giemsa stain
U.S.A	Sigma	تربسين Trypsin
England	BDH chemical	الفرسين Versene
U.S.A	Sigma	كلوتامين L-glutamin
Germany	Serva	الكولسيمايد Colcemid
England	BDH chemical	كلوريد البوتاسيوم KCL
England	BDH chemical	فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين $NaHPO_4$
England	BDH chemical	صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet
Scotland	Irvine, Flow lab.	محلول هانكس الملحي المتوازن Hank's Blaance Salt Solution(HBSS)
Sweden	Phamacia fine chemical	صبغة التريبان الزرقاء Trypan blue stain
U.K	Flow lab.	محلول الهيبس Hepes solution
U.S.A	Sigma	فورملديهايد ٣٧% Formaldehid

٢_١_٣ تحضير الأدوات المختبرية General Laboratuies Equipments

جميع الأدوات المستخدمة في تحليلات الزراعة النسيجية (Tissue Culture) يجب ان تكون نظيفة ومعقمة .

٢-١-٣-١ الأدوات البلاستيكية Plastic Ware

الأدوات البلاستيكية المستخدمة تكون من النوع النبيذ (Disposable)،توجد داخل أكياس بلاستيكية ومعقمة بواسطة الأشعاع (Radiation).

٢-١-٣-٢ الأدوات الزجاجية Glass ware

جميع الأدوات الزجاجية المستخدمة من نوع بايركس Pyrex حيث يتم غسلها جيدا بالماء و مساحيق الغسيل ،بعدها تغسل بالماء المقطر Distilled Waterو تجفف جيداً وتعقم بجهاز الموصدة autoclave بدرجة حرارة 121ْم لمدة نصف ساعة ويحفظ لحين الاستعمال .

٢-١-٣-٣ تحضير الشرائح الزجاجية Slide Making

حضرت الشرائح الزجاجية الجديدة المغطاة بمادة زيتية حافظة من التخدش ،بغمرها بمحلول الكرومك (Chromic) لمدة ٧٢ ساعة ،بعدها غسلت تلك الشرائح جيداً بالماء الحار ومن ثم بالماء المقطر ، و وضعت في وعاء زجاجي حاوٍ على الماء المقطر في درجة حرارة -٢٠ْ م لغاية ما قبل التجميد من ثم تنقل للثلاجة و تستخدم في نفس اليوم.

2-1-4 المواد والمحاليل المستخدمة في الدراسة

2-1-4-1 المحاليل الخاصة بالزرع النسيجيStock solutions for tissue culture

حضرت جميع المحاليل المستخدمة في تجارب الزراعة النسيجية في المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية ووفقاً لطريقة (Freshney,2000) الخاصة بالزرع النسيجي.

٢-١-٤-١-١ مصل الإبل

تم تحضير عينات مصل ذكور الإبل من نوع *Comelus dromedaris* بعد تخثر الدم في أوعية خاصة و نظيفة لمدة 24 ساعة حيث يفصل المصل ثم يسحب ويطرد بواسطة جهاز

النبذ المركزي المبرد (Freshney,2000) بواقع 4500 دورة /دقيقة لمدة نصف ساعة. يؤخذ الراشح المتمثل بالمصل و يترك الراسب، بعدها تجري عملية تثبيط للمتمم Complement factor inhibition بوضعها في حمام مائي بدرجة حرارة 56ْ م لمدة نصف ساعة و يحفظ مجمداً بدرجة حرارة 20–ْ م.

٢–١–٤–١–٢ المصل البقري

أستخدم المصل البقري المحضر في المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية بعد أجراء عملية تثبيط للمتمم بنفس الطريقة أعلاه، و تحفظ بدرجة حرارة -20ْ م.

٢–١–٤–١–٣ المضادات الحيوية

1.محلول ستربتومايسين Streptomycine

حضر بإذابة عبوة من الستربتومايسين 1غم في 5مل من الماء المقطر ليصبح تركيزه 200ملغم / مل. يؤخذ منه 0.5 مل لكل لتر من الوسط الزرعي.

2.محلول الجنتامايسين Gentamycin Solution

يوجد بشكل محلول تركيزه 80 ملغم/ 2مل يؤخذ منه 0.25 مل لكل لترمن الوسط الزرعي.

٢–١–٤–١–٤ بيكابونات الصوديوم Sodium bicarbonate

NaHCO3	4.4 غم
ماء مقطر	100 مل

يحفظ بدرجة حرارة 4ْ م.

٢–١–٤–١–٥ الوسط الزرعي

Rosswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) free serum medium

أضيف إلى لتر من الوسط الزراعي RPMI_1640 المواد التالية :

10.4.1 غم من مسحوق RPMI-1640 مع دارىء هيبس مع ١٥ مل من لـكلوتامين.
2.أضيف ١٥ مل من بيكاربونات الصوديوم Na_2HCO_3.

٣. Streptomycin ٠.٥ مل

٤. Gentamycine ٠.٢٥ مل

٥. أضافة المصل .

أضيفت المواد المذكورة اعلاه و مزجت ، ثم اكمل الحجم النهائي الى لتر واحد بأضافة الماء المقطر و عقم بالترشيح بأستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكرون.

٢-١-٤-١-٦ محلول دارئ الفوسفات الملحي (pH=7.2) Phosphate Buffer Saline (PBS)

تألف من المواد التالية ...

NaCl	8 غرام
KCl	0.2 غرام
Na_2HPO_4	0.15 غرام
KH_2PO_4	0.20 غرام
ماء مقطر	1000 مل

يحفظ في درجة حرارة 4ْ م.

٢-١-٤-١-٧محلول هانكس الملحي المتوازن Hanks Balance Salt Solution (HBSS)

محلول X ١٠ جاهز من شركة.Flow lab، Irvine،Scotland .

٢-١-٤-١-٨ محلول التربسين فرسين Trypsin-versene Solution

تم إذابة 0.2 غرام من مادة التربسين Trypsine بـ20 مل من محلول دارىء الفوسفات الملحي (PBS) ، ويذوب 0.1 غم من مادة الفرسين (Versen) Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) في ١٠مل من الماء المقطر، ثم تخلط

جميعا ويكمل الحجم بـ(PBS) الى 400 مل. يعقم بالترشيح باستخدام Millipore Filter ذي ثقوب بقطر0.22 مايكرون ويحفظ مجمدا لحين الاستعمال .

٢-١-٤-١-٩ صبغة الكريستال البنفسجي Crystal vilot

حضرت حسب طريقة (Mather and Roberts 1998) وكالاتي :

يضاف 5 غم من مسحوق الصبغة الى 200 مل من الميثانول المطلق ويرشح باستخدام ورق الترشيح (Whatman No.1) ثم يضاف اليه 50 مل من فورملديهايد 37% ويكمل الحجم بالماء المقطر إلى اللتر. يحفظ في قناني معتمة لحين الاستعمال .

٢-١-٤-١-١٠ صبغة التريبان الزرقاء Trypan Blue Stain

اذيب ١ غم من مسحوق الصبغة في ١٠٠ مل من محلول هانكس ثم رشح باستعمال ورق ترشيح واتمان رقم (١) ، و حفظ في درجة حرارة ٤ْم الى حين الأستعمال . وحينها خفف بنسبة ١-١٠ بأستعمال محلول هانكس مباشرة.

2-4-1-2 المحاليل الخاصة بالوراثية الخلوية Stock solution for cytogenetic study

حضرت المحاليل وأجريت طرائق العمل وفقاً (Yaseen *et al.*1998 ; Yaseen,1990)

٢-١-٤-٢-١ تحضير الوسط الزرعي الحاوي على تراكيزمختلفة من مصل الإبل والبقري و البلازما البشري

The preparation of medium with camel serum, bovine serum and human plasma in different concentrations

٢-١-٤-٢-١-١ مصل الإبل

قد حضر وفق الفقرة (٢-١-٤-١-١)

٢-١-٤-٢-١-٢ المصل البقري

حضر حسب الفقرة(٢-١-٤-١-٢)

٢-١-٤-٢-١-٣ بلازما الدم البشري

أستخدم بلازما الدم البشري من مجموعة +AB و المثبط حرارياً (سخن بدرجة 56ْ م لمدة 30 دقيقة) بعدها يحفظ بالتجميد.

٢-١-٤-٢-١-٤ الوسط الزرعي

تم تحضير الوسط الزرعي RPMI-1640 حسب الفقرة (2-1-4-1-٥) .كما تم أضافة مصل الإبل و بواقع أربعة تراكيز (5%، 10%،15%و 20%) و قورن مع نفس التراكيز للمصل البقري وبتركيز واحد 20% للبلازما البشري.يرشح الوسط الزرعي مع أحد نوعي المصل و بمختلف التراكيز أو مع البلازما البشري بـ Millipore filter قطر الثقوب فيها 0.22 مايكرون داخل كابينة معقمة.

٢-١-٤-٢-٢ محفز النمو Phytohemagglutinin (PHA)

استعملت العبوات المحضرة في المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية، حيث يحفظ بدرجة الأنجماد لحين الأستعمال.

٢-١-٤-٢-٣ الكولجسين Colchicine

تم بإذابة حبة بوزن ٥..ملغم بـ1مل ماء مقطر للحصول على تركيز ٥..ملغم /مل يوضع في جهاز النبذ المركزي Centrifuge 1500 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق . يؤخذ الراشح Supernatant و يهمل الراسب. يحفظ في درجة حرارة 4ْ م لحين الأستعمال و يستعمل بحالة دافئة.

٢-١-٤-٢-٤ الكولسمايد

أذيب١ غم من مسحوق الكولسمايد في ١٠٠ مل من الماء المقطر و حفظ بدرجة حرارة ٤ْ م لحين الأستعمال.

٢-١-٤-٢-٥ المحلول الواطئ التوتر Hypotonic solution (0.075*M* KCL مولر)

تم بإذابة 5.587 غرام من كلوريد البوتاسيوم KCL في لتر واحد من الماء المقطر للحصول على تركيز 0.075 *M* KCL مولر . يحفظ بدرجة 4ْ م لحين الأستعمال، و يستعمل بصورة دافئة.

٢-١-٤-٢-٦ المثبت Fiaxtive

حضر بالمزج الفوري للميثانول المطلق مع حامض الخليك الثلجي (Glacial Acetic Acid) بنسبة ١:٣ (حجم \ حجم).

٢-١-٤-٢-٧ محلول التربسين Trypsin solution

أذيب ٠.٢٥ غم من مسحوق التربسين في ١٠٠ مل من دارىء الفوسفات (PBS) المحضر في الفقرة (٢-١-٤-١-٦) مع المزج الجيد بوساطة الهزاز المغناطيسي ثم وزع في أنابيب زجاجية سعة ١ مل و حفظ مجمدا لحين الأستعمال.

٢-١-٤-٢-٨ المحلول دارئ سورنسن Sorenson s buffer (pH=6.8)

تم تحضيره بإذابة 7.08 غرام من مادة Na_2HPO_4 و 6.74 غرام من مادة KH_2PO_4 في 1000 مل ماء مقطر وحفظ بدرجة حرارة 4ْ م لحين الاستعمال.

٢-١-٤-٢-٩ صبغة كمزا Giemsa Stain

حضرت بأذابة 2 غرام من مسحوق صبغة الكمزا في 100 مل من الميثانول مع المزج المستمر في قنينة زجاجية معتمة محكمة الغلق لمدة ثلاثة أيام. و هذا ما يطلق عليه بالمحلول المركز Stock solutionوعند الاستعمال خفف محلول الصبغة المركز بمزج ١ مل من الصبغة مع ٤ مل من دارىء سورنسن الدافىء المحضر في الفقرة (2-1-4-2-8) .

٢-١-٥ الخطوط الخلوية Cell Lines

2-1-5-1 الخط الخلوي لسرطان الحنجرة البشري (Hep-2)

Human epidermoid Laynx carcinoma(Hep-2)

استعمل خط خلايا سرطان الحنجرة البشري المأخوذة من رجل يبلغ من العمر57 سنة (Moor *et al.*,1955;Toolan, 1954) و النامي على وسط RPMI-1640 المجهز بـ10% من مصل العجل البقري في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية عند التمريرة (240). وعند تكون الطبقة الاحادية الكاملة Conflunet Monolayer، يتم معاملة الخلايا بمحلول التربسين –فرسين وذلك لتهيئة المزرعة الثانوية Subculture.

2-1-5-2 الخط الخلوي لسرطان الغدد اللبنية الفأري (AMN-3)

Ahmed-Mohammed-Nahi-2003 (AMN-3)

وهو عبارة عن سرطان الغدد اللبنية Mammary adeno carcinoma لأناث الفئران نوع Balb\C المصابة بسرطان الغدد اللبنية التلقائي *In vivo* Spontaneous Mammary adenocarcinoma . لقد تم استحداث هذا الخط الخلوي من قبل الباحث الشمري (2003) في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية . استعمل هذا الخط عند التمريرة(40)و المنمعلى وسط RPMI-1640 مجهز بـ 10%مصل عجل البقري ،وعند تكون الطبقة الاحادية الكاملة Confluent Monolayer، تعامل الخلايا بمحلول التربسين –فرسين لتقسيمها الى مزرعة ثانوية أخرى.

2-1-5-3 الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (REF)

Rat Embryo Fibroblast (REF) Cell line

أستعملت خلايا REF عند التمريرة (١٥) و المأخوذة من المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية ، أذ جرى أستحداث هذا الخط الخلوي خارج الجسم الحي.

٢-٢ طرائق العمل

٢-٢-١ مخطط التجربة

2-2-2 جمع عينات دم الإبل Collection of camel blood

جمعت عينات دم (ما يقارب ٢.٥لتر)من دم ذكور الإبل من مجزرة النجف و بأعمار (خمسة أشهر ،سنتين و خمس سنوات) من شهر تشرين الثاني إلى شهر آيار في أوعية بلاستيكية خاصة ونظيفة حيث اعتمدت أعمار الحيوان من خلال الأسنان.وضعت بعد جمعها في صناديق مبردة Cooling box من ثم تركت العينة لكي تتخثر Clotting لمدة ٢٤ ساعة بعدها فصل المصل حسب ما وصف في الفقرة(2-1-4-1-١).

2-2-٣ دراسة تأثير مصل الإبل في تنمية الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية

Study the effect of camel serum on growth of cancer and normal cell lines

٢-٢-٣-١ تهيئة الوسط الزرعي والخطوط الخلوية

Preparation media and cell lines

حضر الوسط الزرعي وفقا لطريقة (Freshney,2000)،حيث خلطت مكوناته مع بعضها حسب الفقرة(٢-١-٤-١-٥).وزع الوسط الزرعي في قناني زجاجية معقمة سعتها 200 مل ، حفظت بعدها في قناني محكمة الغلق بدرجة حرارة -20ْم لحين الأستعمال .

تم الحصول على خطين خلويين سرطانيين (Hep-2,AMN-3)وخط خلوي طبيعي (REF) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/بغداد .وأجريت عليه الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي وتحت ظروف معقمة وكما يلي:

- اضيف 1 مل من محلول التربسين –فرسين المحضر حسب الفقرة(٢-١-٤-١-٨) الى قناني الزرع النسيجي حجمها 25 سم^3 الحاوية على أحد الأنواع الثلاثة من خلايا الخطوط الخلوية المستخدمة في الدراسة بعد التخلص من الوسط الزرعي القديم .تحرك القنينة برفق وتحضن بدرجة حرارة 37ْم لحين نزع الخلايا الملتصقة وخلخلة التصاقها بجدار القنينة للحصول على خلايا مفردة.
- أضيف الى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة 10مل من وسط زرعي جديد RPMI-1460 والحاوي على5%من المصل البقري والمحضر حسب الفقرة

(2-1-4-1-5)ومن ثم تحريك القنينة جيدا وبعدها نقل نصف محتوياتها (الوسط الغذائي الجديد و الخلايا) الى قنينة أخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساو بين القنينتين وتسمى هذه العملية بالمزرعة الثانوية (Sub culture).

- حضنت القنينتان بدرجة حرارة 37ْم لمدة يومين بالنسبة للـ(Hep-2) وخمسة أيام للـ(AMN-3) وثمانية أيام للـ(REF) .تم متابعة القنينتين يوميا للتأكد من خلوها من أي تلوث وأن الخلايا بحالة جيدة من خلال فحصها بواسطة المجهر المقلوب ، وعندما يصبح النمو داخل القنينة جيداً بحيث يصبح النمو بشكل طبقة كاملة Confluent Monolayer بذلك تكون الخلايا جاهزة للاستعمال.

٢-٢-٣-٢ عد الخلايا الحية Viable cell count

تم عدّ الخلايا الحية وفق(Freshney ,2000)، لكل نوع من الخلايا باستعمال صبغة أزرق التريبان (Trypan blue) المحضرة حسب الفقرة (٢-١-٤-١-١٠) ، اذ تاخذ الخلايا الميتة الصبغة ببضع ثواني مما يجعلها سهلة التميز عن الخلايا الحية ويتم ذلك بمزج ٠.٢ مل من عالق الخلايا بـ٠.٢ مل من الصبغة مع ١.٦ مل من (PBS)المحضر وفق الفقرة (٢-١-٤-١-٦) .ثم تم حساب الخلايا الحية والغير حية باستعمال شريحة العد التفريقي.

٢-٢-٣-٣ تأثير مصل الإبل بتراكيز وأعمار مختلفة على نمو الخطوط الخلوية

The camel serum effact on growth of cell lines

اتبعت طريقة (Al-shemary *et al*., 2005) و كالأتي:

تم تحضير الأوساط الحاوية على التراكيز الثلاثة من مصل الإبل لكل عمر من الأعمار المستخدمة في الدراسة و تركيز ٥%من مصل البقري حسب الفقرة (٢-١-٤-١-٥) .جهز عالق الخلايا لكل نوع من الأنواع الثلاثة من الخطوط الخلوية عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم ٢٥سم^{٣} بمحلول التربسين-فرسين المحضر وفق الطريقة(٢-١-٤-١-٨) .بعدها أضيف ٠.٠٥ مل من عالق الخلايا الى ٥مل من الوسط الزرعي الحاوي على أحد تراكيز مصل الإبل بأحد الأعمار أو على تركيز ٥% من مصل البقري . تم نقل ٠.٢ مل بعد كل مزجة جيدة الى حفر طبق معايرة الزرع

النسيجي ذي القعر المسطح بأستعمال ماصة أوتوماتيكية دقيقة،حيث أحتوت كل حفرة على عدد معلوم من الخلايا الحية (٤×١٠^٤ خلية\حفرة) و بواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة فيها، بعد أن تم عد الخلايا الحية من الميتة بواسطة صبغة (Trypan blue) المحضرة في الفقرة(٢-١-٤-١٠-١).ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٦ ساعات بعدها تم التخلص من الوسط الزرعي بواسط الماصة الأوتوماتيكية من حفر الطبق ويضاف وسط زرعي جديد حاوٍ على أحد تراكيز مصل الإبل فضلا عن مصل البقري عدا الخط الأول من حفر الطبق فيضاف اليه صبغة (Crystal vilot) المحضر ة في الفقرة (٢-١-٤-١-٩) .أعيد الطبق الى الحاضنة لمدة٢٠ دقيقة بعدها تم التخلص من الصبغة و غسله بماء الحنفية بواسطة الماصة الأوتوماتيكية ثم يعاد الى الحاضنة و تثبت على أنها فترة الصفر . تعاد العملية الأخيرةبعد ٢٤ ساعة ثم تكرر كل ٢٤ ساعة لمدة ٦ أيام. أيام تقرأ بعدها بجهاز الأليزا على أمتصاصية ٤٩٢ نانوميتر.

٢-٢-٣-٤ الفحص المجهري

تمّ فحص الخلايا المنماة في أوساط زرعية مزودة بأحد تراكيز مصل الإبل وبأحد أعماره الثلاثة بأستخدام المجهر المقلوب.حيث تكون هذه الخلايا مصبوغة بصبغة (Crystal vilot) المحضر في الفقرة (٢-١-٤-١-٩) وثم تم مقارنتها مع السيطرة.

٢-٢-٣-٥ منحنى نمو الخلايا Growth curve

تمّ فيه قياس أطوار منحنيات النمو (طور السكون Lag و طور اللوغارتمي Log و طور الأنحدار Decline)و كذلك فترة التضاعف PDT عند طور Log لكل تركيز من التراكيز الثلاث من مصل الإبل وللأعمار الثلاثة وقورنت مع السيطرة وحسب طريقة (Freshney,2000) .و الذي يمكن أستخراجها عن طريق رسم منحنيات النمو حيث ‘عد طور Lag أبتداءا من فترة الصفر الى بداية الزيادة الأسية لنمو الخلايا والتي تعد الأخيرة بداية طور Log المنتهية عند بداية طور Decline . كما تم حساب فترة PDF ضمن طور Log وذلك وفقاً للقانون التالي

: (Zhang *et al*.2005)

$$PDT=0.693(t-t_0)/In(Nt/N_0)$$

حيث أن:

t =الوقت الذي تنتهي فيه فترة Log

t_0 =الوقت الذي يبتدأ عنده فترة Log

Nt=عدد الخلايا عند الفترة t

N_0=عدد الخلايا عند الفترة t_0

2-2- ٥ الإدامة والمحافظة على الخطوط الخلوية Maintenance of cell lines

تمت المحافظة والأدامة لهذه الخطوط من خلال المتابعة اليومية للخلايا وملاحظة تكوينها لطبقة أحادية كاملة Confluent monolayer عندها يتم أجراء المزرعة الثانوية Sub culture و ذلك من خلال التخلص من الوسط الزرعي القديم وإضافة التربسين –فرسين بمقدار 1 مل وتحضن بحاضنة درجة حرارتها 37ْم لحين انفصال الخلايا من القنينة ، وأضيف الوسط الزرعي الجديد وأعيد توزيعها في قنينتين زرع خاصة و حفظ بدرجة حرارة 37ْ م.

٢–٢–٦ دراسة وراثية خلوية للخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية بعد معاملتها بمصل الإبل

Cytogenetic study on cancer and normal cell lines after treatment with camel serum

أجري هذا الأختبار على كل من الخط الخلوي السرطاني Hep-2 و الخط السرطاني AMN-3 و الخط الخلوي الطبيعي REF بأستخدام وسط زرعي حاوٍ على أحد التراكيز الثلاثة من مصل الإبل (٥%،١٠% و ١٥%) و المحضر في الفقرة (٢-١-٤-٢-١)لعمر خمسة أشهر و قورنت مع السيطرة و كالآتي

٢–٢–6–١ الحضن و الحصاد Incubation and Harvesting

أضيفت الأوساط الحاوية على أحد التراكيز الثلاثة من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر على اعتباره أفضل الأعمار المستخدمة إلى قناني الزرع النسيجي الحاوية على أحد أنواع الخلايا المستخدمة في الدراسة . و اعيدت القناني الى الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ْم لمدة٧٢ ساعة . و بعد ذلك تم أضافة الكولسمايد بمقدار ٠.١ مل للقنينية الواحدة ، و اعيدت القناني الى الحاضنة و تركت لمدة ١٥ دقيقة . وبعدها افرغت القنينة من الوسط الزرعي ثم أضيف التربسين / فرسين لمدة ١-٢ دقيقة ومن ثم أعيد الوسط الزرعي السابق الى القنينة مع المزج الجيد للخلايا المفككة و نقلت الى أنابيب زجاجية نظيفة.

٢-٢-٦-٢ المعاملة بالمحلول واطىء التوتر Hypotonic solution

نبذت الخلايا بجهاز النبذ المركزي بسرعة ١٥٠٠ دورة / دقيقة و لمدة ١٠ دقائق .ثم أزيل الرائق وعلق الراسب بمحلول واطىء التوتر من كلوريد الكالسيوم ٠.٠٧٥ مولر مع الرج المستمر ، ووضعت بعد ذلك في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٢٠ دقيقة . بعدها نقلت الأنبوبة الى جهاز النبذ المركزي على سرعة ١٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق.

٢-٢-٥-٣ التثبيت Fixation

أهمل الرائق المتكون و أضيف الى الراسب الخلوي المحلول المثبت و المحضر آنيا حسب الفقرة (٢-١-٤-٢-٦) قطرة فقطرة مع الرج المستمر لحد ٥ مل . بعدها يترك العالق الخلوي لمدة ٣٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة ، ثم اعيدت عملية النبذ المركزي على سرعة ١٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق مرتان مع تبديل المثبت ثلاث مرات ، و في المرة الثالثة أعيد تعليق الخلايا مع ٣ مل من المثبت و خزن في درجة حرارة —٢٠ْ م لمدة ساعتين على الأقل قبل تحضير الشريحة الزجاجية.

٢-٢-٦-٤ تحضير الشرائح الزجاجية Slid making

حضرت الشرائح الزجاجية حسب الفقرة (٢-١-٣-٣)

٢-٢-٦-٥ التقطير Dropping

استعملت ماصة باستور لتقطير ٢-٣ قطرات من عالق الخلايا على الشريحة الزجاجية الرطبة وعلى مسافة ٥٠ سم و تركت لتجف في الهواء.

٢-٢-٦-٦ التصبيغ Staining

صبغت الشريحة المحضرة بالخطوات السابقة بواسطة صبغة كمزا المحضرة في الفقرة (٢-١-٤-٩) أذ غطت الشريحة بالصبغة لمدة ٣ دقائق ثم غسلت بمحلول السورنسن المحضر في الفقرة (٢-١-٤-٢-٨) و تركت الشريحة لتجف في الهواء.

٢-٢-٢-٦-٧ الفحص المجهري Screening

فحصت الشريحة جيدا بواسطة المجهر الضوئي لغرض عد الخلايا المنقسمة و ملاحظة الفروق العددية و التركيبية إن وجدت بين كروموسومات الخلايا المعاملة بالأعمار الثلاثة و بالتراكيز المختلفة من مصل الإبل و السيطرة(ISCN,1995).

2-2- ٧ تأثير مصل الإبل على نمو الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي

Effect of camel serum *in vitro* human lymphocyte growth

٢-٢-٧-١ عينة الدم Blood sample

جرى سحب 5 مل من الدم الوريدي Venous blood بصورة معقمة بواسطة محقنة بلاستيكية نبيذة مرطبة من الداخل بمادة الهيبارين Lithium heparin ومحاولة زرع الدم بأسرع وقت ممكن بحيث لا تتعدى 24 ساعة وفي حالة تأخر الزرع تحفظ العينة في درجة حرارة 4ْم لفترة لاتتعدى 7 أيام.

٢-٢-٧-٢ زرع الدم Blood culture :

زرعت عينات الدم بظروف معقمة جدا وداخل كابينة معقمة حيث تم إضافة 0.3 مل من الدم الى أنابيب معقمة حاوية على 5مل من الوسط الزرعي RPMI-1640 Medium وأحدى التراكيز الاربعة لمصل الإبل وأنابيب أخرى حاوية على نفس التراكيز للمصل البقري وبتركيز 20% للبلازما البشري صنف AB يضاف الى تلك الأنابيب 0.3 مل من المادة المحفزة للنمو PHA وانابيب أخرى لاتضاف اليها .بعدها تغلق الأنابيب بصورة

محكمة وتخلط محتويات الانبوبة جيدا وبهدوء .ثبت على الأنبوبة تركيز المصل ،عمر الحيوان وساعة وتاريخ الزرع،وتحضن بحاضنة درجة حرارتها 37ْم بوضع أفقي ولمدة 72 ساعة ، تم رج الأنابيب بهدوء مرتين كل 24ساعة في أثناء فترة الحضن .و قبل نهاية فترة الحضن بعشر دقائق تم إضافة 0.1 مل من مادة الكولجسين لكل أنبوبة (لغرض أيقاف أنقسام الخلايا في الطور الأستوائي (Metaphase) ، ترج الأنابيب بهدوء وتعاد إلى الحاضنة بدرجة حرارة37ْم لأكمال فترة الحضن.

٢-٢-٧-٣ حصاد الخلايا Harvesting

1.في نهاية فترة الحضن البالغة 72ساعة توضع جميع أنابيب الزرع في جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة1500 دورة /دقيقة لمدة 10دقائق.

٢.يهمل الرائق Supernatant بواسطة ماصة باستور Pasteur pipettes ويترك الراسب Pellet مع قليل من الوسط الزرعي في قعر الأنبوبة .

٣.مزج المتبقي من الراسب جيدا بأستخدام المازج الكهربائي Vortex ويضاف اليه 2مل من محلول كلوريد البوتاسيوم 0.075 مولر المحضر في الفقرة(٢-١-٤-٢-٥) الدافئ قطرة فقطرة مع التحريك والرج المستمر ومن ثم يكمل الحجم إلى 10مل من المحلول السابق لكل انبوبة بصورة تدريجية .

٤.حضنت الأنابيب في الحاضنة لمدة 30دقيقة وبدرجة حرارة 37ْم .

٥.عند نهاية فترة الحضن ،تخرج الأنابيب من الحاضنة وتوضع في جهاز الطرد المركزي Centrifuge 1500دورة/دقيقة لمدة 10دقائق . أزيل الرائق وترك الراسب.

٢-٢-٧-٤ التثبيت Fixation

تم تثبيت الخلايا حسب الخطوات الآتية:

١. خلط الراسب جيدا بالخلاط الكهربائي ويضاف 5 مل من المثبت المحضر آنيا حسب الفقرة (2-1-4-2-٦) على جدار الأنبوبة بصورة تدريجية قطرة فقطرة مع الرج المستمر.

٢. و ضعت العينة بجهاز الطرد المركزي1500 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق ،ثم أزيل الرائق وترك الراسب.

٣. أعيدت الخطوة رقم1 و3 لعدة مرات للحصول على رائق عديم اللون.

٤. أعيدت الخطوة 3 مع بقاء القليل من المثبت للحصول على عالق ضبابي.

٢-٢-٧-٥ تحضير الشرائح المجهرية The slides preparation

لتحضير الشرائح الزجاجية تتبع الخطوات الآتية :

1.مسكت الشريحة الزجاجية الرطبة والباردة بوضع مائل وبدرجة 45ْ ويقطر عليها من 5-7 قطرات من كل عينة (العالق الخلوي) بوضع عمودي وعلى أرتفاع يقارب 50سم ويحضر لكل عينة 2-3شريحة.

2.تركت الشرائح الزجاجية لتجف بدرجة حرارة الغرفة وبوضع مائل ولفترة زمنية معينة.

٢-٢-٧-٦ التحزيم Banding

بعد عملية التقطير لعالق الخلايا على الشرائح الزجاجية يفضل ان تترك الشرائح لمدة يوم كامل(Over night) ثم توضع في فرن درجة حرارته ٦٥ْم لمدة ساعة ، و تعامل بعدها بمحلول التربسين لمدة ٨-١٢ ثانية . تغسل بعدها الشريحة مباشرة بمحلول دارىء الفوسفات (PBS) لأيقاف عمل التربسين.

٢-٢-٧-٧ تصبيغ الشرائح المجهرية Slides staining

صبغت الشرائح بمحلول صبغة كمزا المحضر آنياحسب الفقرة (2-1-4-2-٩) حيث تم تغطية الشرائح الزجاجية بالصبغة وتركت لمدة 3دقائق بعدها تغسل مباشرة بدارئ سورنسن الدافئ ،تترك

الشرائح لتجف بدرجة حرارة الغرفة وبوضع مائل عندها تكون جاهزة للفحص المجهري .

٢-٢-٧-٨ فحص الشرائح المجهرية Screening

فحصت الشرائح المجهرية بأستخدام المجهر الضوئي بأستخدام العدسة الشيئية (10X)حيث تم حساب عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة وغير المنقسمة بعدها حسب معامل الأنقسام (MI) Mitotic Index من خلال حساب النسبة المئوية لعدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة الى عدد الخلايا اللمفاوية الكلي (المنقسمة وغير المنقسمة 1000خلية) × ١٠٠ كما تم حساب معامل التحسس الخلوي (BI) Blasotcyte Index من خلال حساب النسبة المئوية لعدد الخلايا اللمفاوية المتحسسة الى الف خلية لمفاوية (المتحسسة وغير المتحسسة)×١٠٠ (Shubber&Al-Allak., 1989)

وتطبق المعادلات الآتية :

معامل الأنقسام (MI)=عدد الخلايا المنقسمة /عدد الخلايا المنقسمة و غيرالمنقسمة (1000خلية) ×100

معامل التحسس(BI) =عدد الخلايا المتحسسة/ عدد الخلايا الكلية(المتحسسة وغير المتحسسة 1000خلية) × 100

كما تم ملاحظة الفروق العددية و التركيبية بين لخلايا المعاملة و السيطرة أن وجدت.

٢-٢-٨ التحليل الإحصائي

- خضعت نتائج الدراسة الى التحليل الأحصائي لغرض معرفة الفروق المعنوية بين معدلات تراكيز الأعمار الثلاث من مصل الإبل و تأثيرها على خلايا الخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية من جهة و الخلايا الطبيعية من جهة أخرى و مقارنتها بالسيطرة.و عدت الفروق مهمة أحصائياً على مستوى (٥%) لأحتمال الخطأ . وأجريت الأختبارات التالية بأستخدام البرنامج الأحصائي (SPSS) و على النحو التالي:

- أختبار تي Student T-test
- تحليل التباين الثنائي Two Way Analysis
- المقارنة المتعددة Multiple Comparision

االنتائج

3-1مصل الإبل

أستخدم مصل ذكر الإبل العراقي من نوع(*Cameules dromedaries*) و بثلاث أعمار (خمسة أشهر ، سنتين و خمس سنوات) و حُضر بأربع تراكيز (5%، 10%،15% و20%) أستخدمت ثلاث منها (5%،10%و15%) في أنماء الخطوط الخلوية(خلايا خط سرطان الحنجرة البشري Hep-2، خط خلايا سرطان الغدد اللبنية AMN-3 و خط خلايا الخط الطبيعي لجنين الجرذ REF) و قورنت مع التركيز5% لمصل البقري. كما أستخدمت التراكيز الأربعة المذكورة أعلاه من مصل الإبل للمقارنة مع التراكيز نفسها من مصل البقري و تركيز واحد (20%) للبلازما البشري في تجارب زراعة الخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية.

3-1-1 الفحص المجهري

3-1-1-1 الخط الخلوي السرطاني Hep-2

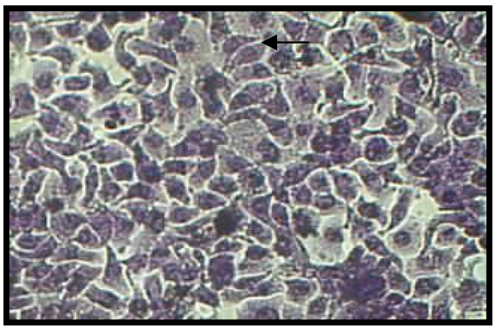
لوحظ من الفحص المجهري لخلايا هذا الخط السرطاني والمعامل بتراكيز و الأعمار المستخدمة من مصل الإبل بأنها مشابة لخلايا السيطرة حيث تظهر تلك الخلايا متعددة الأضلاع ذات انوية متميزة (الصورة 3-1 و3-2).

3-1-1-2 الخط الخلوي السرطانيAMN-3

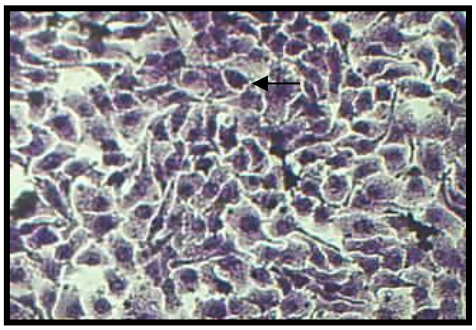
لم يطرأ أي تغير يذكر على شكل خلايا هذا الخط و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل و بأعماره المستخدمة كافة عند فحصها مجهريا مقارنة بالسيطرةحيث تأخذ أشكالا متعددة لكن الشكل الطلائي و الشبيه بالمغزلي هو السائد (الصورة 3-3و 3-4).

3-1-1-3 الخط الخلوي الطبيعي REF

من خلال الفحص المجهري لوحظ بأن خلايا خط الطبيعي REF لجنين الجرذ لم يطرأ عليها أي تغير في شكلها عند معاملتها بالتراكيز الثلاثة من مصل الإبل و بأعماره الثلاث المستخدمة في الدراسة مقارنة بالسيطرة و التي تكون فيها الخلايا مغزلية الشكل (الصورة رقم 3-5 و 3-6).

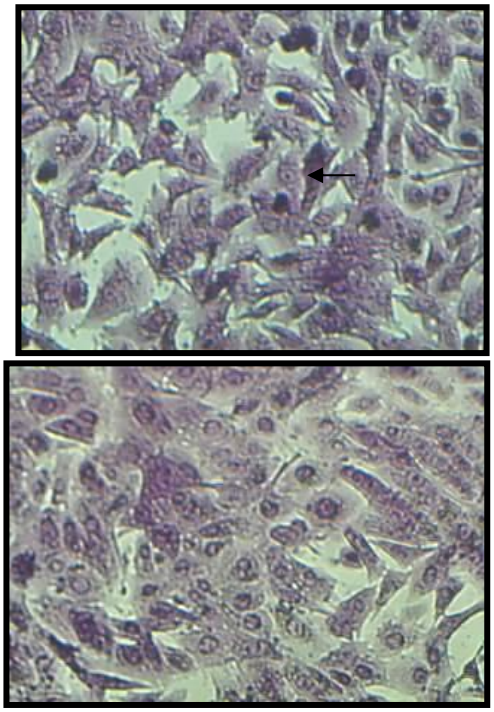


الصورة (3-1) خلايا الخط السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري و المعاملة بالتركيز 15% من مصل الإبل (السيطرة) (CV) بعمر خمسة أشهر (CV) (X100).



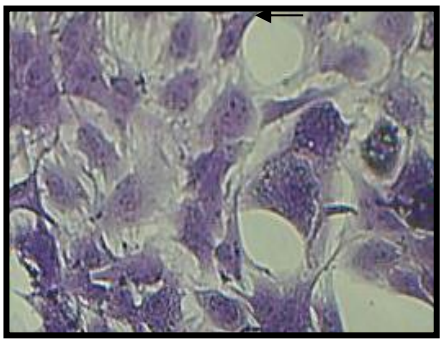
الصورة (3-2) خلايا الخط السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري

(X 100)

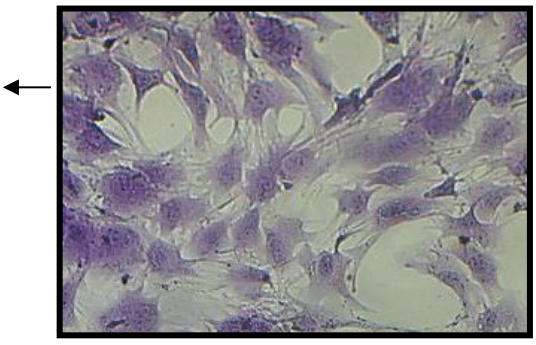


الصورة (3-3) خلايا الخط السرطاني AMN-3 لسرطان AMN-3 لسرطان
الغدد اللبنية الفأري المعامل بالتركيز 15% من مصل الإبل (CV)
بعمر خمسة أشهر (CV) (X100)

الصورة(3-4) خلايا الخط السرطاني
الغدد اللبنية الفأري(السيطرة)
(X100)



الصورة (3-5) خلايا الخط الطبيعي REF لجنين REF لجنين الجر
الجرذ المعامل بالتركيز 15% من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر(CV) (X400) .



الصورة (3-6) خلايا الخط الطبيعي
(السيطرة) (CV) (X400).

3-1-2 منحنيات النمو للخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية النامية في الأوساط الحاوية على تراكيز و أعمار مختلفة من مصل الإبل

تم قياس اطوار منحنيات النمو للخطوط الخلوية الثلاث المعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل و لأعماره جميعا و المتمثلة بالأطوار (Lag و Log وطور Decline)و كذلك فترة التضاعف PDT ثم قورنت بالسيطرة فلوحظ فيها ان طور Lag كانت أطول من السيطرة و أقصر منها في طور Log فضلا عن طول فترة PDT مقارنة بالسيطرة . ووجد أيضا ان تلك الفترات للخطوط الخلوية تأثرت كثيرا بعمر و تركيز المصل طور Lag تقصر و تطول طور Log و تقصر فترة PDT كلما زاد تركيز وقل عمر المصل المستخدم و لاسيماعند الخطوط الخلوية المعاملة بمصل الإبل بعمر خمسة أشهر و بتركيز 15% وكما هي موضحة في ادناه:

3-1-2-1خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2

تبين الأشكال(3-1) (3-2) لعمر خمسة أشهر و (3-3) (3-4) لعمر سنتين و (3-5) (3-6) لعمر خمسة سنوات اطوار وفترة التضاعف لمنحنى نمو لخلايا هذا الخط:

3-1-2-1-1طور السكون Lag phase

وجد أن هذا الطور بلغ في التركيزين 5% و 10% للعمر خمسة أشهر 6 ساعات و التركيز15% 5 ساعات مقارنة بالسيطرة البالغة 4 ساعات .أما مصل الإبل بعمر سنتين فقد بلغت عند التركيزين 5% و10% 6ساعات و 5 ساعات عند التركيز 15% مقارنة بالسيطرة البالغة 3.5 ساعة . اما مصل الإبل بعمر خمس سنوات فبلغت عند التركيز 5% 38 ساعة و التركيز 10% 10 ساعات و 7.5ساعة عند التركيز 15% مقارنة بالسيطرة البالغة 5.5 ساعة.

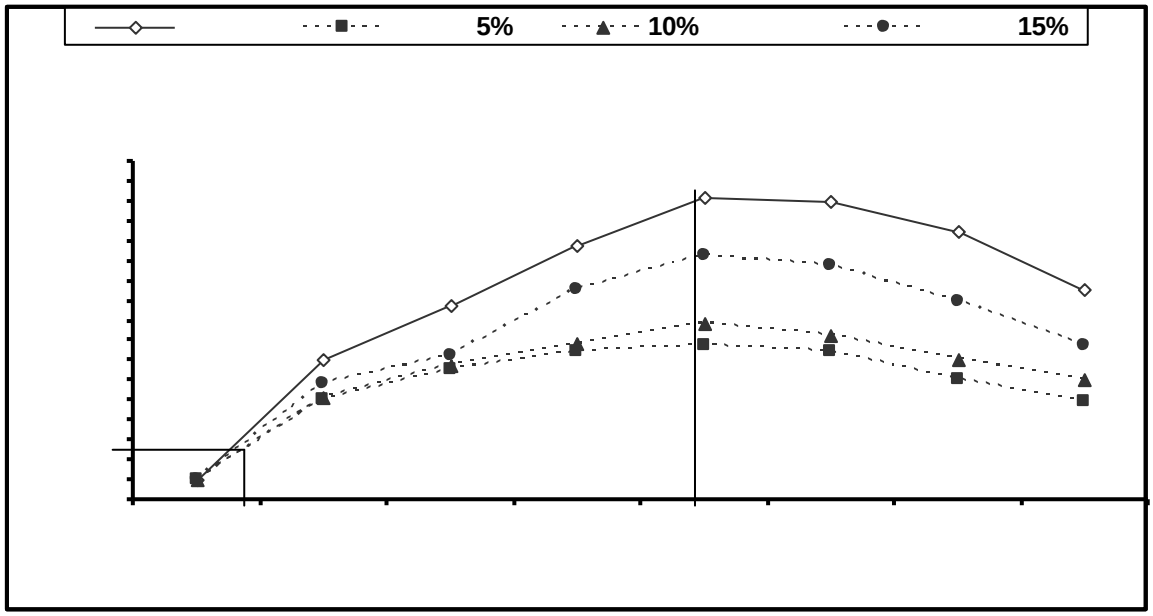
3-1-2-1-2طور اللوغارتمي Log phase

بلغ هذا الطور عند مصل الإبل بعمر خمسة أشهر 90 ساعة عند التركيزين 5%و 10% و الذي بلغ فيهما فترة التضاعف PDT 47 ساعة عند التركيز 5%و 42 ساعة عند التركيز10% كما بلغ طور Log 91 ساعة عند التركيز 15% و الذي كانت فيه فترة التضاعف35 ساعة مقارنة بالسيطرة البالغة 92

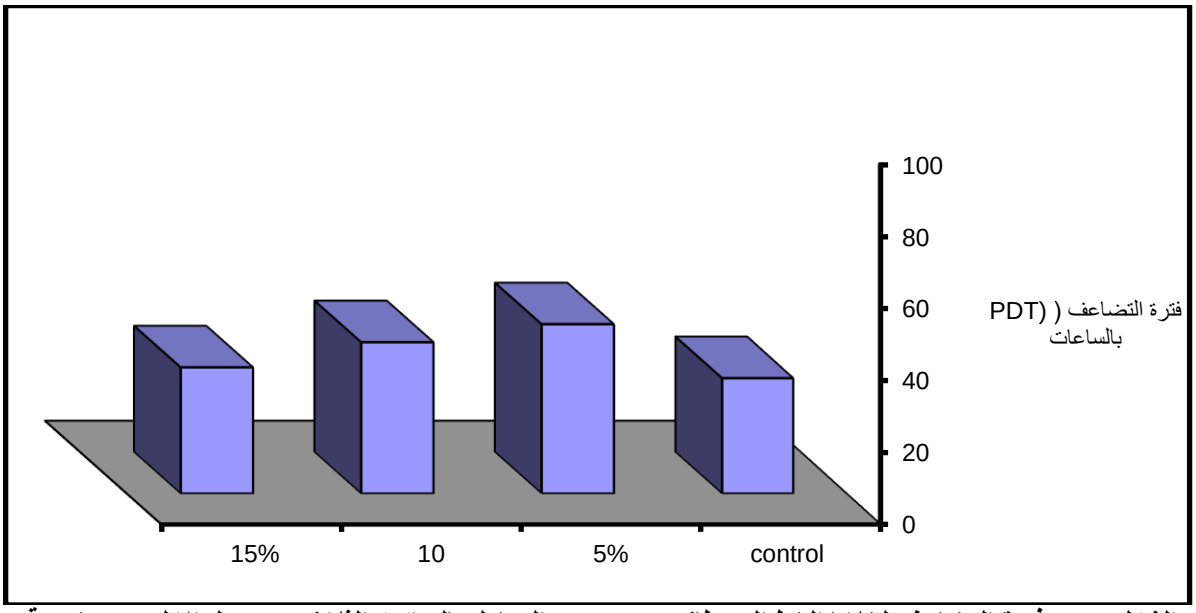
ساعة عند طور Log و 32 ساعة عند فترةPDT .أما العمر سنتين من مصل الإبل فقد بلغ طور Log عند التركيزين 5% و 10% 90 ساعة و 91 ساعة عند التركيز15% مقارنة بالسيطرة البالغة 92.5ساعة. كما بلغت فترة التضاعف لديهم 49 ساعة عند التركيز 5% و 42 ساعة عند التركيز 10% و 36 ساعة عند التركيز 15% مقارنة بالسيطرة البالغة30 ساعة .كما بلغ طور Log عند التركيز 5% 10% و 15% من مصل الإبل بعمر خمس سنوات 58 ساعة ، 86ساعات و 88.5 ساعة على التوالي مقارنة بالسيطرة البالغة 90.5 ساعة .أما فترة التضاعف فبلغت عند التركيز 5% من هذا العمر 69ساعة .أما التركيز 10%فبلغت فترة التضاعف فيها 68 ساعة و التركيز 15% كانت 44 ساعة مقارنة بالسيطرة البالغة 37 ساعة .

3-1-2-1-3طور الأنحدار Decline phase

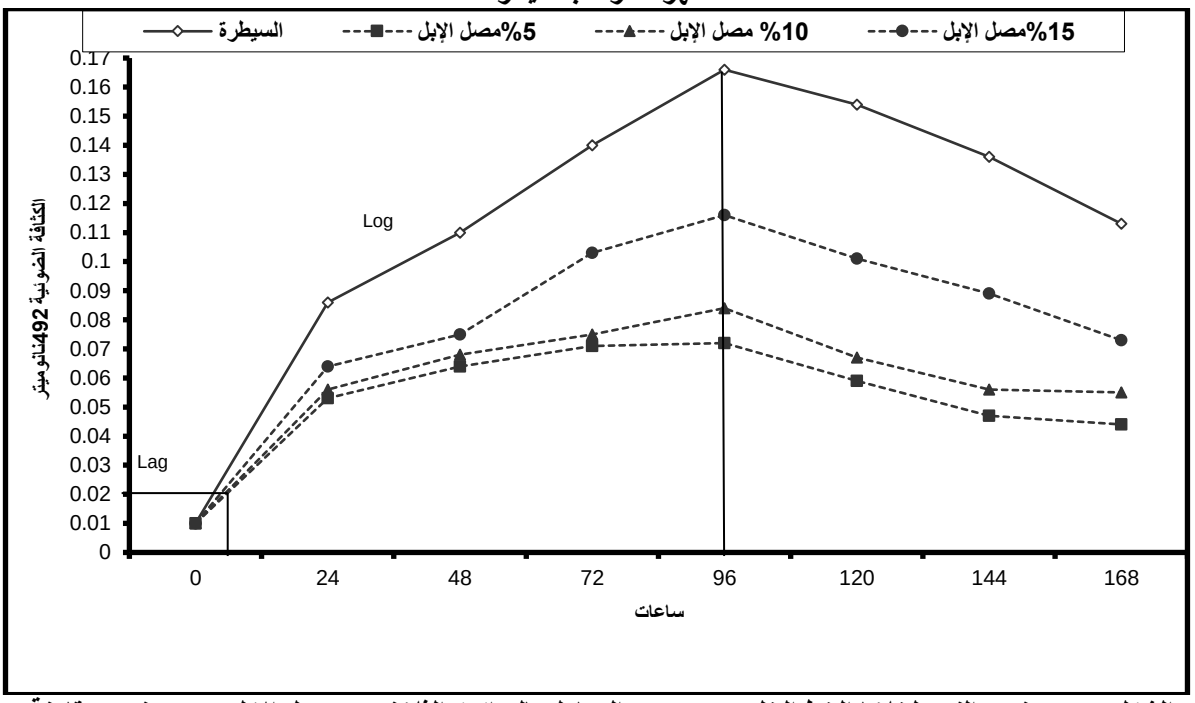
لوحظ أن جميع التراكيز الثلاث من مصل الإبل المستخدمة في الدراسة و بأعماره كافة فضلا عن السيطرة كانت طور Decline لديهم متماثلة عند اليوم الرابع.



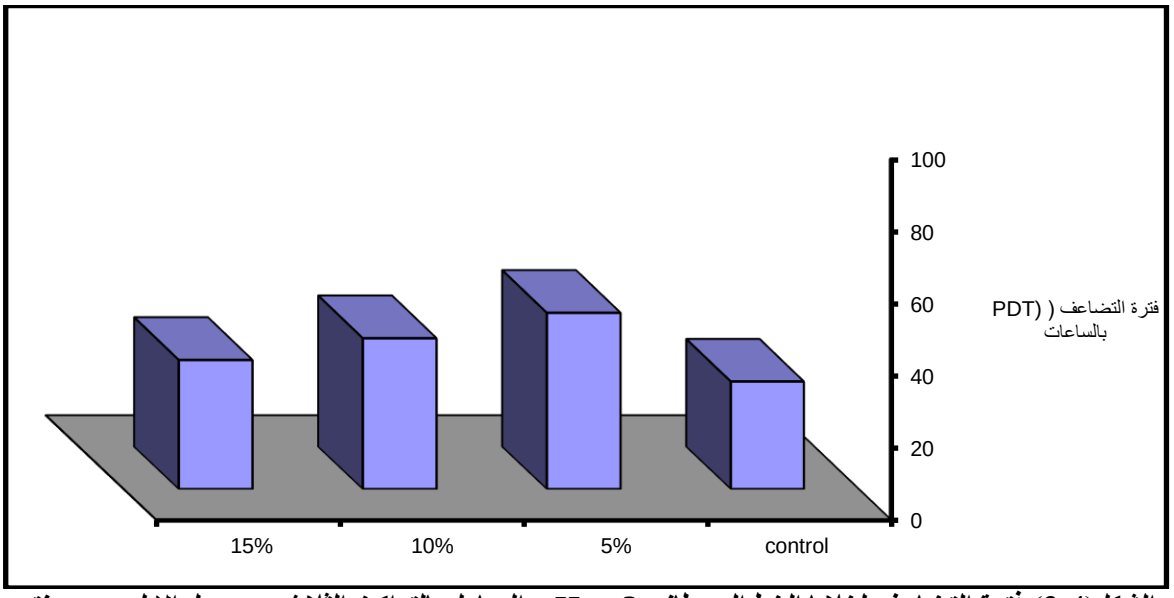
الشكل(3-1) منحى النمو لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة



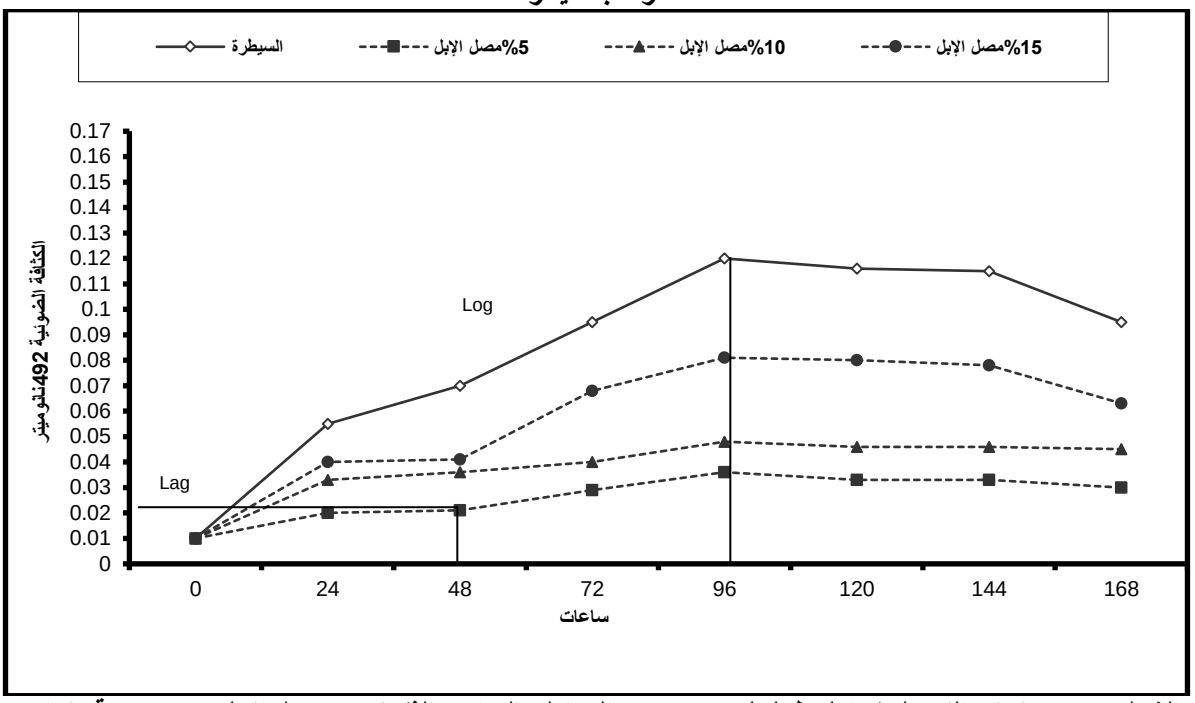
الشكل(3-2) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة



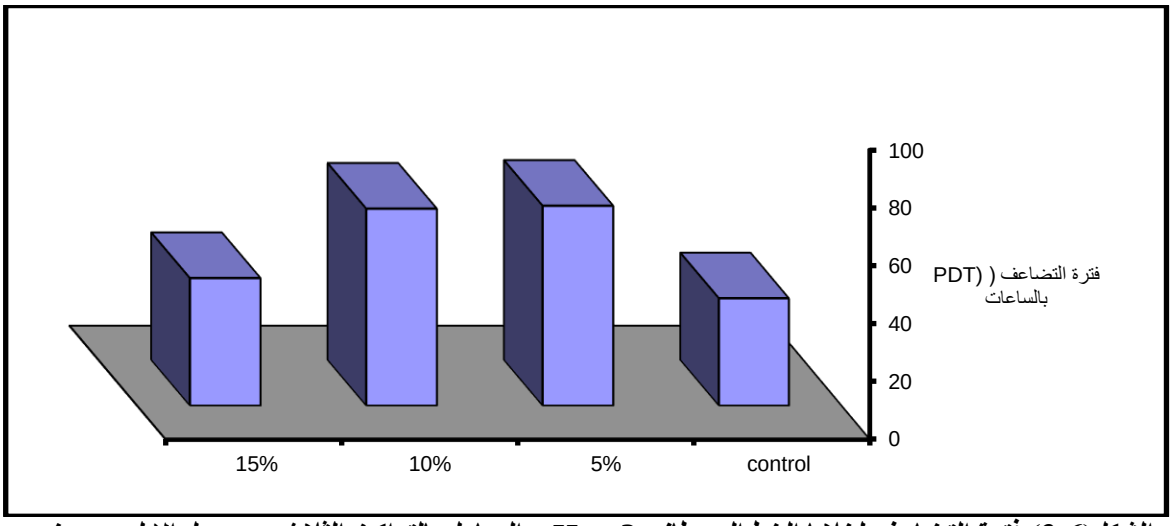
الشكل(3-3) منحى النمو لخلايا الخط الخلوي Hep-2 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة



الشكل(4-3) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة



الشكل(5-3) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي Hep-2 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسةسنوات مقارنة بالسيطرة



الشكل(6-3) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة

3-1-2-2 خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3

وضحت أطوار منحنيات هذا الخط في الأشكال(3-7) (3-8) لعمر خمسة أشهر و (3-9) (3-10) لعمر سنتين و (3-11) (3-12) لعمر خمس سنوات حيث لوحظ تأثر خلايا هذا الخط كثيرا بعمر مصل الإبل المستخدم أكثر من بقية الخطوط الخلوية الأخرى المستخدمة في الدراسةفكانت كالآتي :

3-1-2-2-1طور السكون Lag phase

بلغ هذا الطور عند العمر خمس أشهر من مصل الإبل 5.5 ساعة عند التركيز 5% ، 5 ساعة عند التركيز 10% و4 ساعات عند التركيز 15% مقارنة بالسيطرة البالغة 2.5 ساعة. و بلغت عند العمر سنتين 13 ساعة ، 9 ساعات و 7.5 ساعة للتراكيز 5% و 10% و 15% على التوالي مقارنة بالسيطرة البالغة 4 ساعات. اما العمر خمس سنوات فقد بلغت 14 ساعة عند التركيز 5% و 11 ساعة عند التركيز 10% و 9ساعات عند التركيز 15% مقارنة بـ 3.5 ساعة من السيطرة.

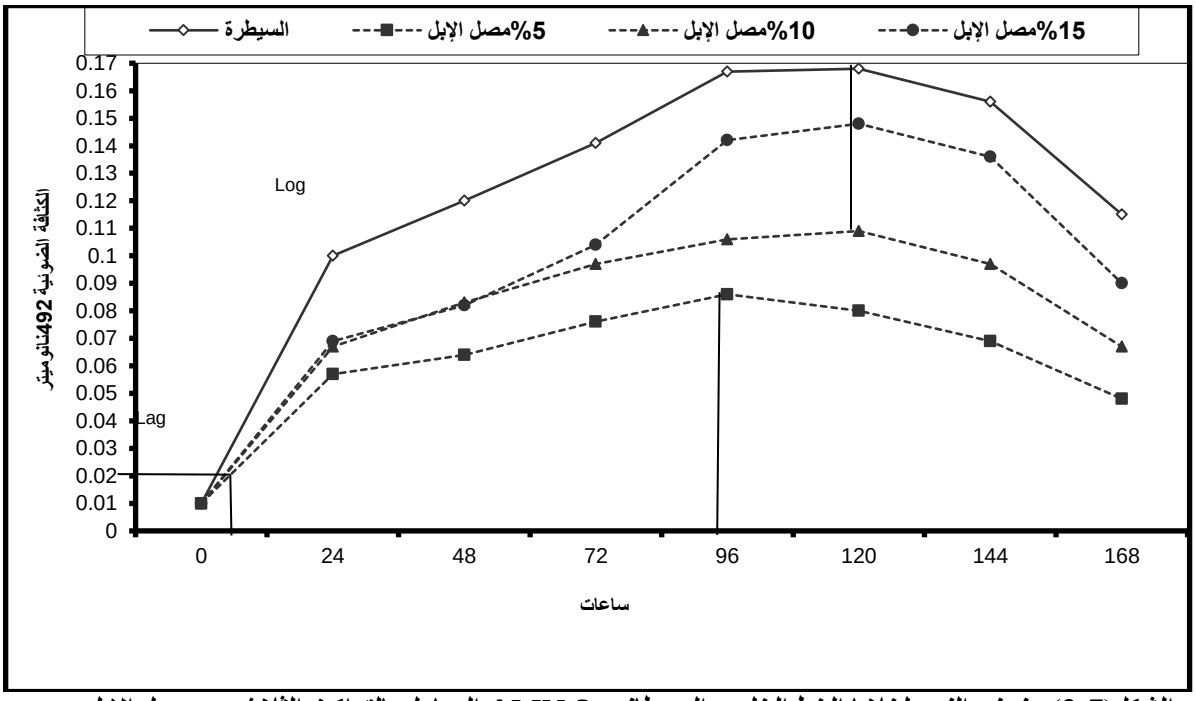
3-1-2-2-2طور اللوغارتمي Log

لوحظ ان فترة هذا الطور طويلة مقارنة ببقية الخطوط الخلوية الأخرى، بالأضافة الى تاثر فترة التضاعف كثيرا بعمر مصل الإبل المستخدم . فبلغ طور Log عند العمر خمسة أشهر 90.5 ساعة عند التركيز 5%،115.5 ساعة عند التركيز 10% و 116ساعة

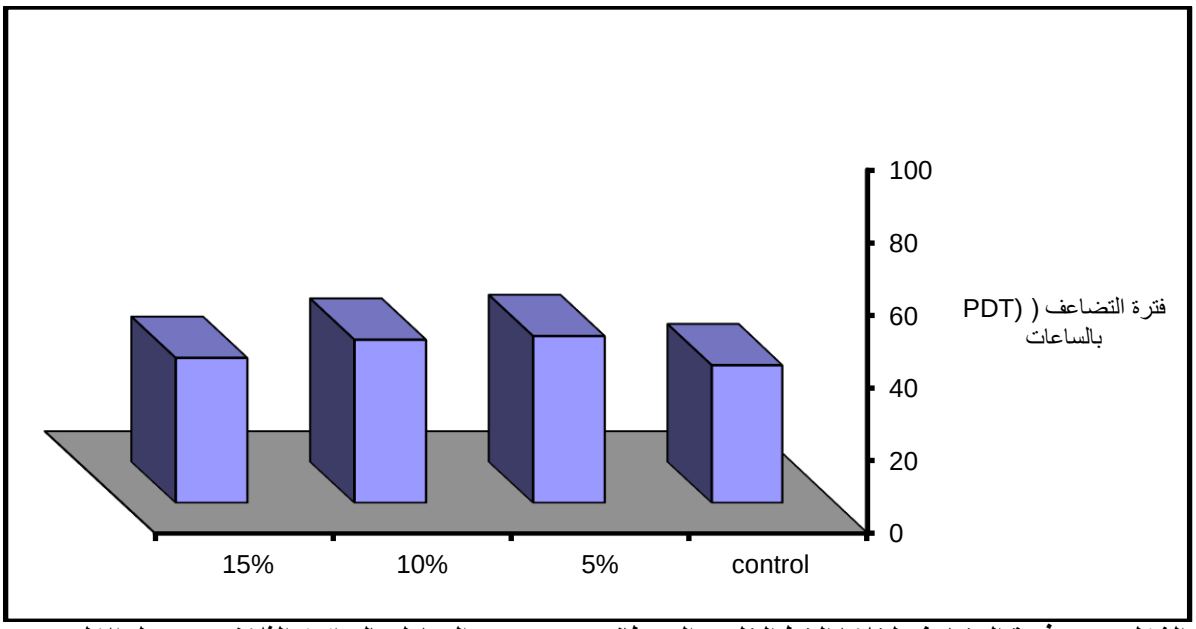
عند التركيز 15% وقد بلغت في السيطرة 5.117 ساعة .كما بلغت فيهم فترة التضاعف 46 ساعة عند التركيز 5% و 45ساعة عند التركيز 10%و40 ساعة عند التركيز 15%مقارنة بالسيطرة و التي تبلغ فيها فترة التضاعف 38 ساعة . أما العمر سنتين فبلغ طور Log عند التركيز 5% 83ساعة و التركيز 10% 111 ساعة في حين بلغت عند التركيز 15% 5.112ساعة مقارنة بالسيطرة و التي تبلغ 116ساعة. كما تباينت فيها فترة التضاعف فبلغت هذه الفترة بأتجاه التراكيز العالية فبلغت 54ساعة عند التركيزين5% و 10% و44 ساعة عند التركيز15% مقارنة بـ41 ساعة في السيطرة .كما بلغ طور Log عند تراكيز مصل الإبل بعمر خمس سنوات 82ساعة ، 109 ساعة و 111 ساعة عند التراكيز 5% و 10% و 15% على التوالي مقارنة بالسيطرة و البالغة 116.5ساعة . اما فترة التضاعف فقد بلغت عند التركيز 5% 82 ساعة و التركيز 10% 65 ساعة و 50 ساعة عند التركيز 15% مقارنة بالسيطرة و التي تبلغ فيها هذه الفترة 42 ساعة .

3-1-2-2-3 طور الأنحدار Decline phase

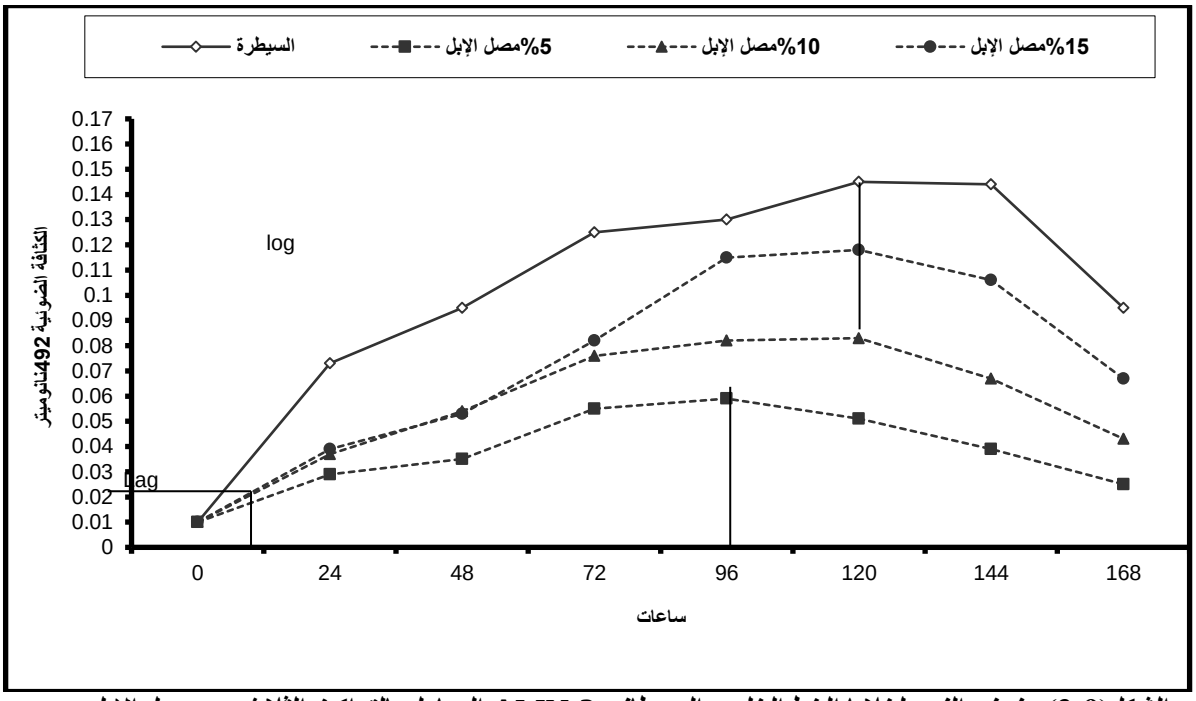
كانت هذه الفترة متماثلة عند جميع التراكيز و الأعمار لمصل الإبل مع السيطرة عند اليوم الخامس عدا التركيز 5% فكان في اليوم الرابع عند جميع الأعمار المستخدمة من مصل الإبل.



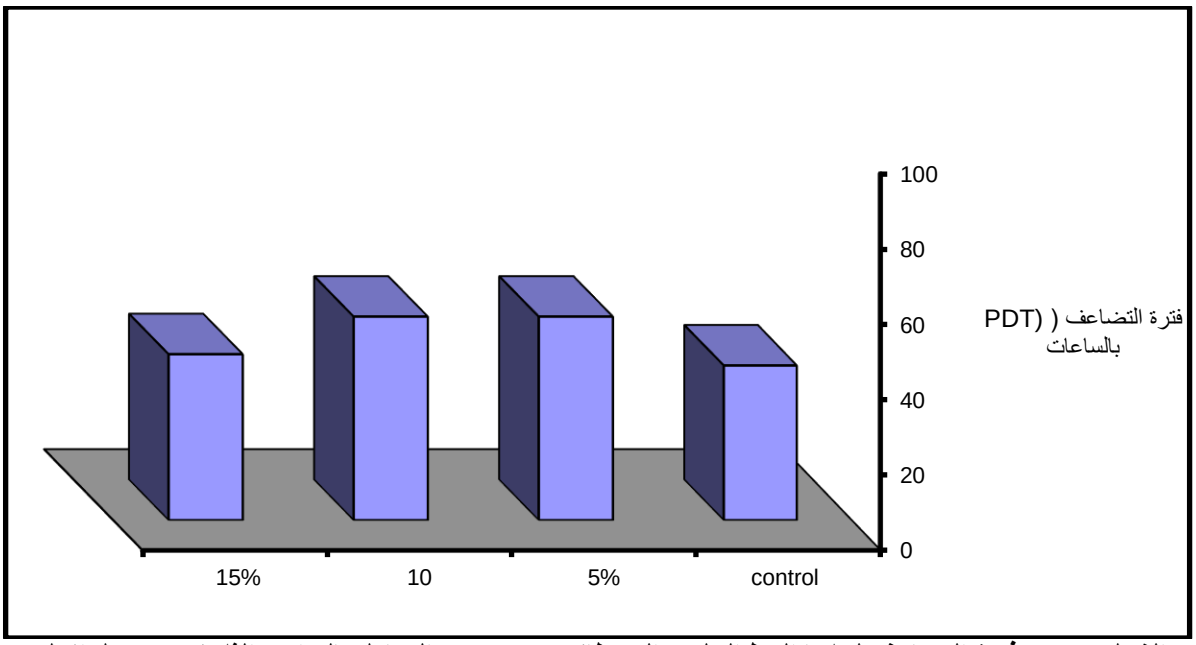
الشكل(7-3) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة



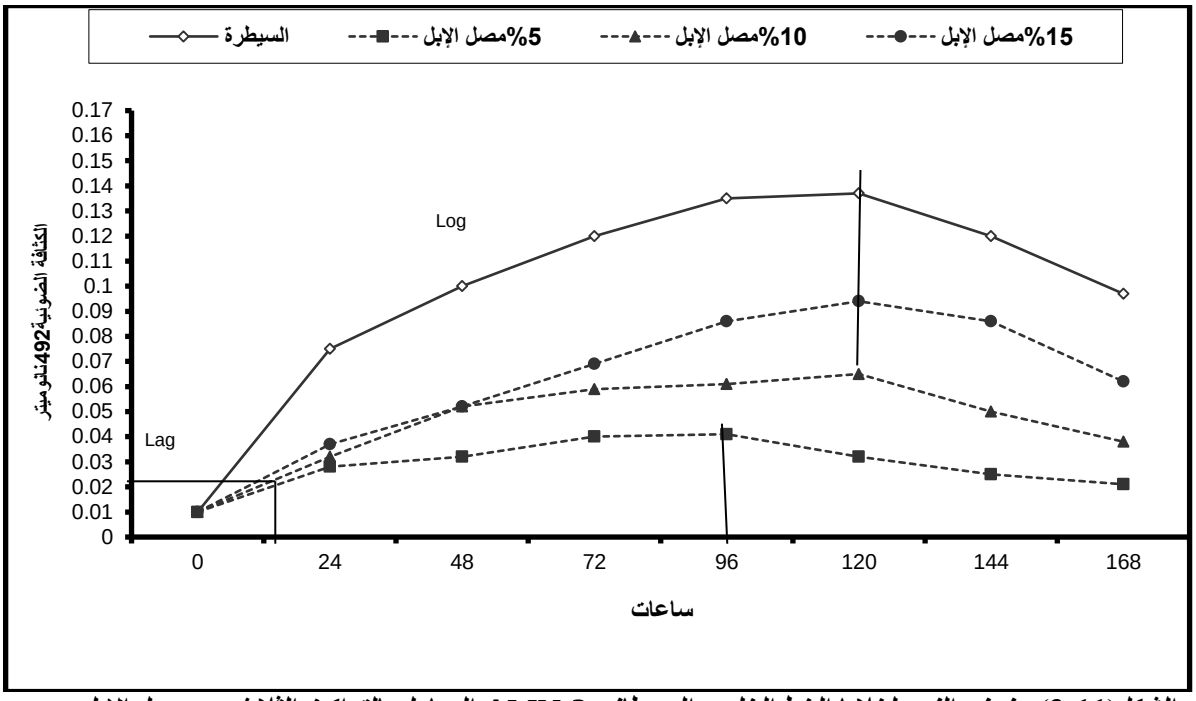
الشكل(8-3) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة



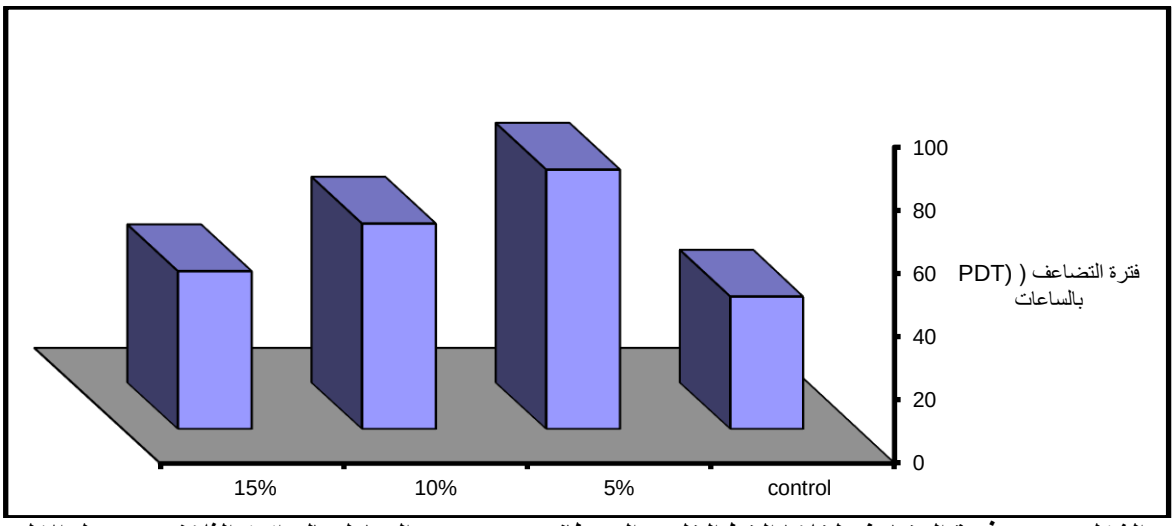
الشكل(3-9) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة



الشكل(3-10) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمرسنتين مقارنة بالسيطرة



الشكل(3-11) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة



الشكل(3-12) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمرخمس سنوات مقارنة بالسيطرة

3-2-1-3 خط خلايا الطبيعي لجنين الجرذ REF

كما مبين في الأشكال (3-13) (3-14) لعمر خمسة أشهر و(3-15) (3-16) لعمر سنتين و(3-17) (3-18) لعمر خمس سنوات أن فترات أطوار منحنيات هذا الخط متباينة حيث كانت أكثر الخطوط الخلوية تأثرا بتركيز المصل

المستخدم فضلا عن أن الخلايا هذا الخط كان لها أطول فترة من الطور Lag و أقصر فترة من الطور Log و أطول فترة تضاعف مقارنة ببقية الخطوط الخلوية الأخرى المستخدمة في الدراسة و كما هو موضح في أدناه :

3-1-2-3 -1طور السكون Lag phase

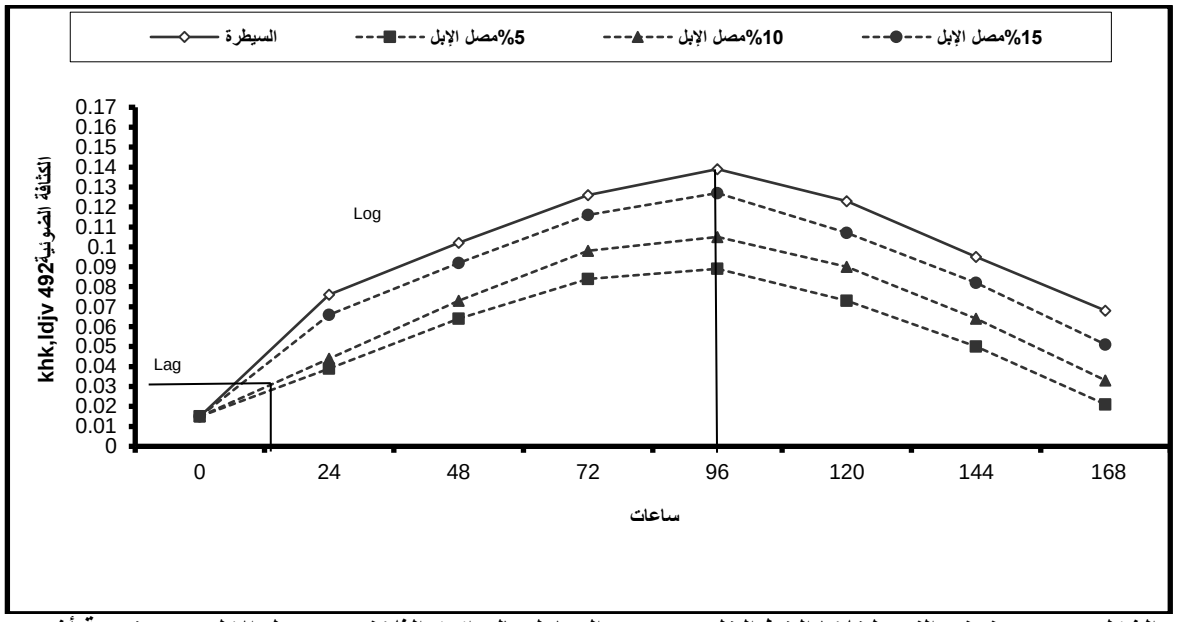
بلغ هذا الطور ابتدأ من أوطأ تركيز إلى أعلى تركيز عند العمر خمسة أشهر 5.15 ساعة و 12.5ساعة و 8 ساعات مقارنة بـ 6 ساعات في السيطرة. أما العمر سنتين فكانت 27 ساعة و 5.19 ساعة و 11 ساعة مقارنة بالسيطرة و التي بلغ فيها 7 ساعات. كما بلغت عند العمر خمس سنوات 26.5 ساعة و 19.5 ساعة و 11.5 ساعة مقارنة بالسيطرة البالغة 7 ساعات .

3-1-2-3 -2طور اللوغارتمي Log phase

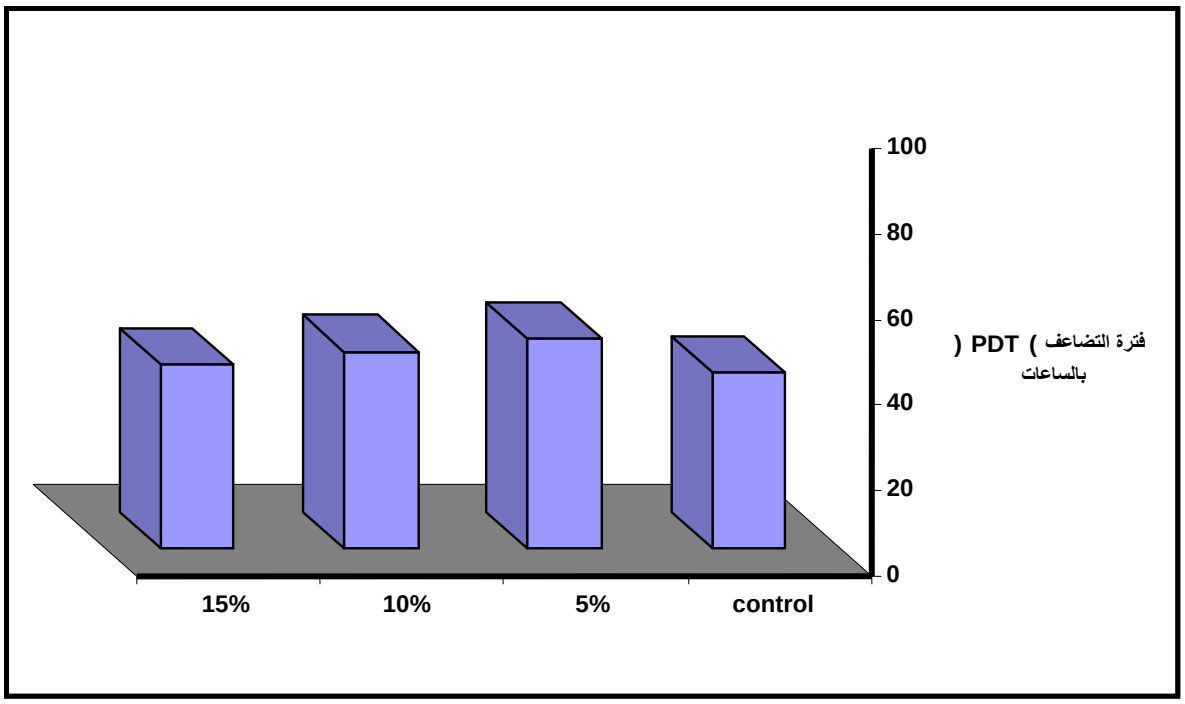
تباينت هذه الفترة عند التراكيز 5% و 10% و 15% من مصل الإبل حسب العمر فكانت عند العمر خمسة أشهر 5.80 ساعة و 83.5 ساعة و 88 ساعة على التوالي مقارنة 90 ساعة في السيطرة . كما بلغت فترة التضاعف لديها 49ساعة و 46 ساعة و 43 ساعة على التوالي مقارنة بالسيطرة و التي تبلغ فيها فترة التضاعف 41 ساعة . أما العمر سنتين فقد بلغ هذا الطور عند التراكيز 5% و 10% و15% 45 ساعة ، 5.76 ساعة و 85ساعة على التوالي مقارنة بالسيطرة و التي تبلغ 89 ساعة. أما فترة التضاعف فقد بلغت لديهم مقارنة بـ 43ساعة في السيطرة 53ساعة عند التركيز 5% و49 ساعة عند التركيز 10% و 45ساعة عند التركيز 15% . كما بلغ طور Log عند العمر خمس سنوات من مصل الإبل 45.5 ساعة و 52ساعة و 84.5 ساعة حسب التراكيز المذكورة أعلاه مقارنة بالسيطرة البالغة 89 ساعة . كما بلغت فترة التضاعف في هذا العمر عند التركيز 5% 60 ساعة و 57 ساعة عند التركيز 10% و 47 ساعة عند التركيز 15% مقارنة بالسيطرة و التي تبلغ 45 ساعة .

3-1-2-3 -3طور الأنحدار Decline phase

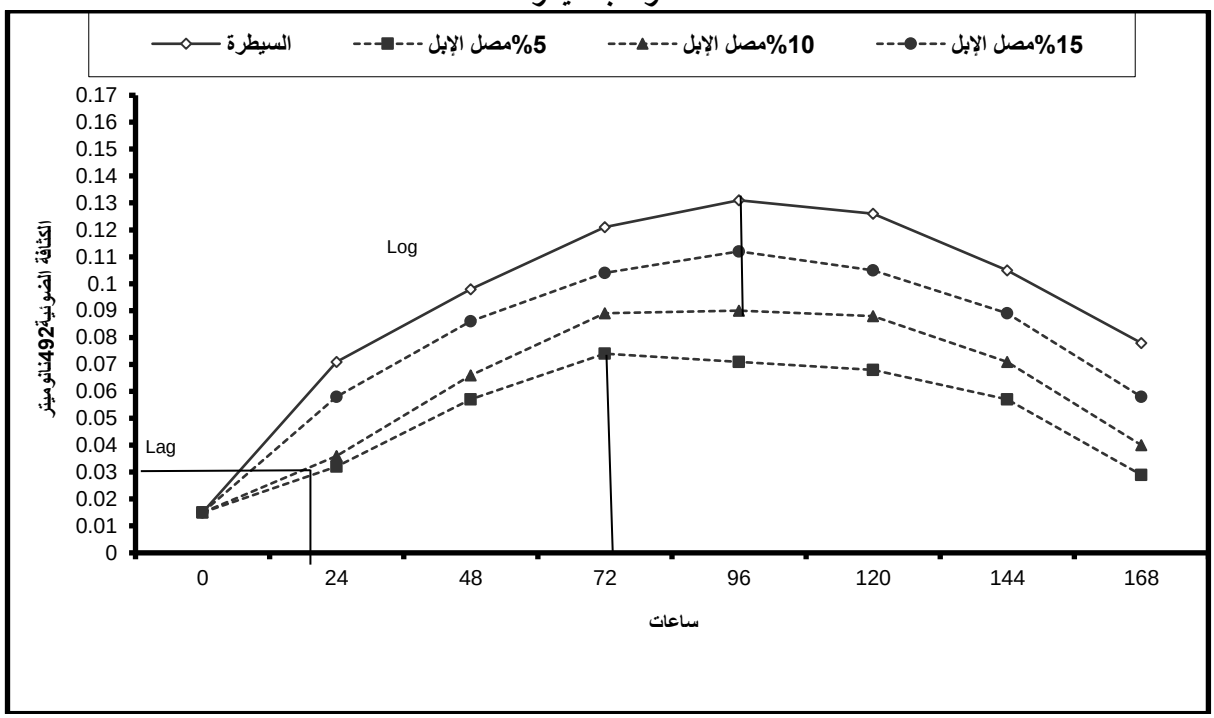
تباين هذا الطور حسب التركيز و العمر المستخدم من مصل الإبل حيث بلغت في السيطرة وجميع تراكيز مصل الإبل بعمر خمسة أشهر وتركيز 15% عند العمرين سنتين و خمس سنوات عند اليوم الرابع . أما عند التركيز 5% للعمرين سنتين و خمس سنوات و التركيز 10% عند العمر خمس سنوات فكانت عند اليوم الثالث .



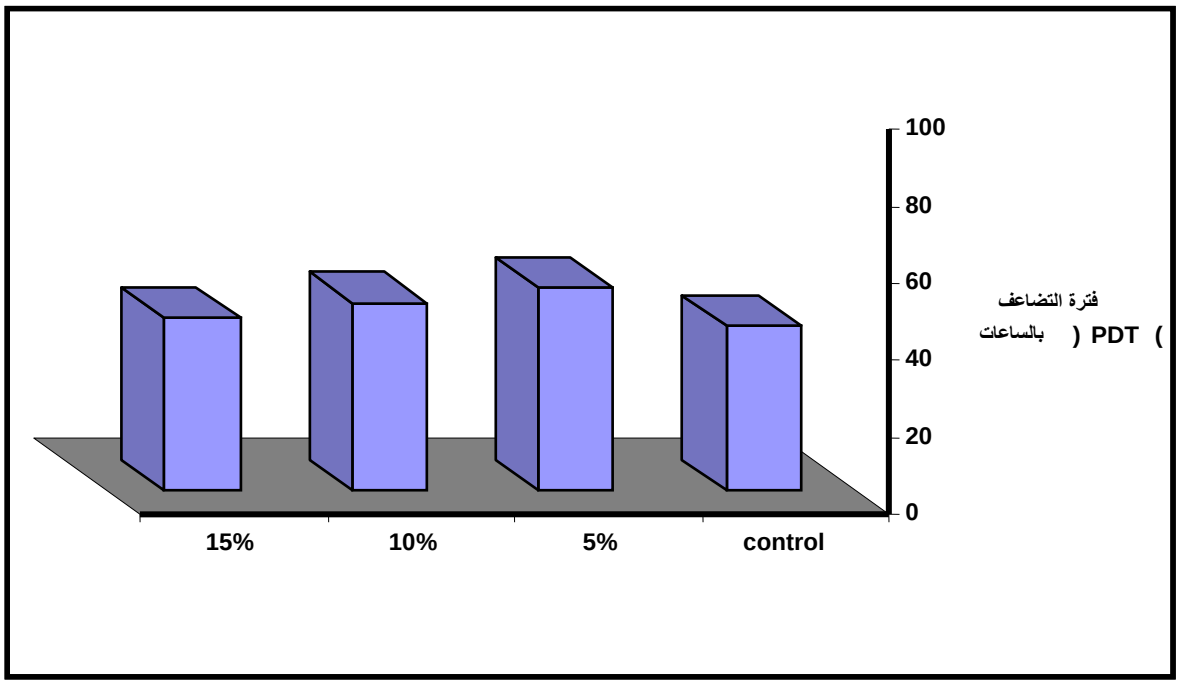
الشكل(13-3) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة



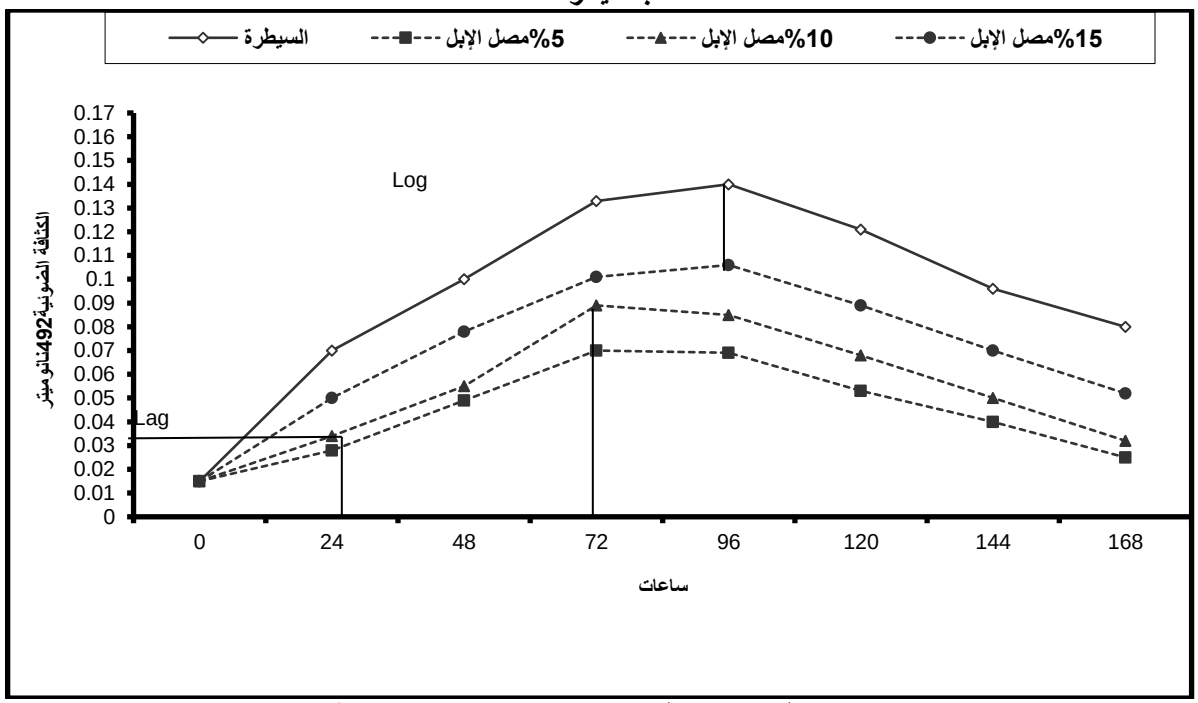
الشكل(3-14) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة



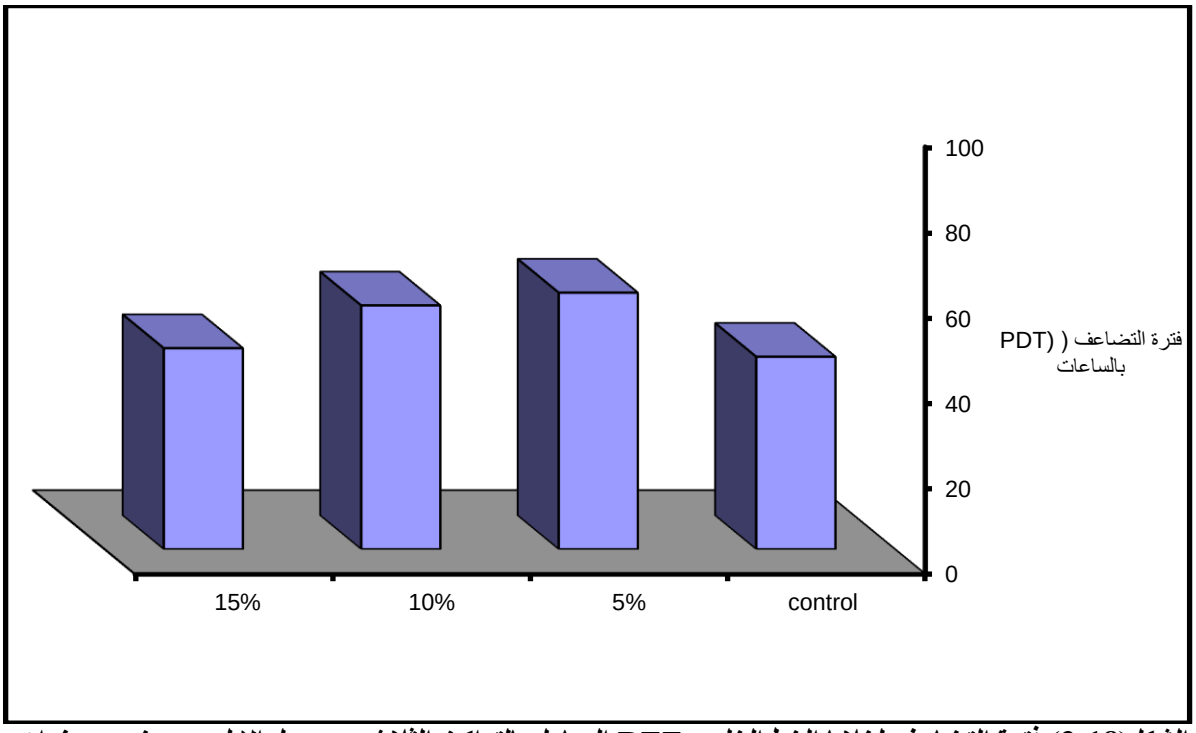
الشكل(3- 15) منحنى لخلايا الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة



الشكل(3-16) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة



الشكل(3-17) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة



الشكل(3-18) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة

لوحظت من النتائج السابقة ان أطول طور ,Log و أقل فترة تضاعف لوحظ عند خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 كما وجد أن أطول فترة من طور Lag و أقصر فترة من طور Log و أطول فترة تضاعف عند الخط الخلوي الطبيعي REF.ووجد أيضا أن اقصر فترة من طور Lag و أطول فترة من طور Log و اقل فترة تضاعف لوحظت عند التركيز 15% من مصل الإبل و لمختلف الخطوط الخلوية و لا سيما عند العمر خمسة أشهر و كما هو موضح في الجداول(3-1) ، (3-2) و (3-3).

جدول(3-1) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة

الخط الخلوي	مصل الإبل 5%	مصل الإبل 10%	مصل الإبل 15%	المصل البقري 5%
خط Hep-2	47	42	35	32
خط AMN-3	46	45	40	38
خط REF	49	46	43	41

جدول(3-2) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة

الخط الخلوي	مصل الإبل 5%	مصل الإبل 10%	مصل الإبل 15%	المصل البقري 5%
خط Hep-2	49	42	36	30
خط AMN-3	54	54	44	41
خط REF	53	49	45	43

جدول(3-3) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة سنوات مقارنة بالسيطرة

الخط الخلوي	مصل الإبل 5%	مصل الإبل 10%	مصل الإبل 15%	المصل البقري 5%
خط Hep-2	69	68	44	37
خط AMN-3	82	65	50	42
خط REF	60	57	47	45

3-1-3 تأثير أستخدام مصل الإبل العراقية بتراكيز مختلفة لحيوانات مختلفة الأعمار في تنمية خطوط الخلايا السرطانية والطبيعية

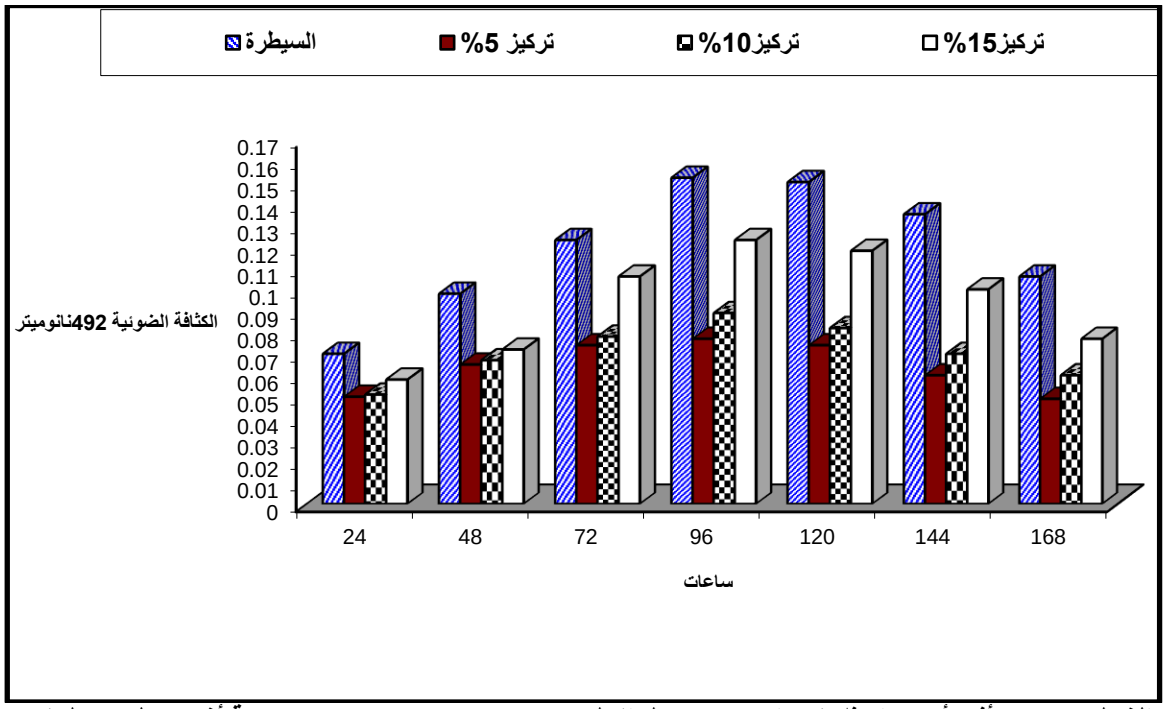
Effect of use camel serum in different ages & concentration on growth of cancer & normal cell lines

عُوملت جميع الخطوط السرطانية و الطبيعية بثلاث تراكيز من مصل الإبل العراقي(5% ، 10%و 15%) وللأعمار المستخدمة في الدراسة جميعها و التي هي (5أشهر ،سنتين و 5سنوات) ولمدة سبعة أيام، ثم تمت مقارنتها مع معاملة السيطرة (تركيز 5% من المصل البقري) ، فكانت النتائج كالآتي :

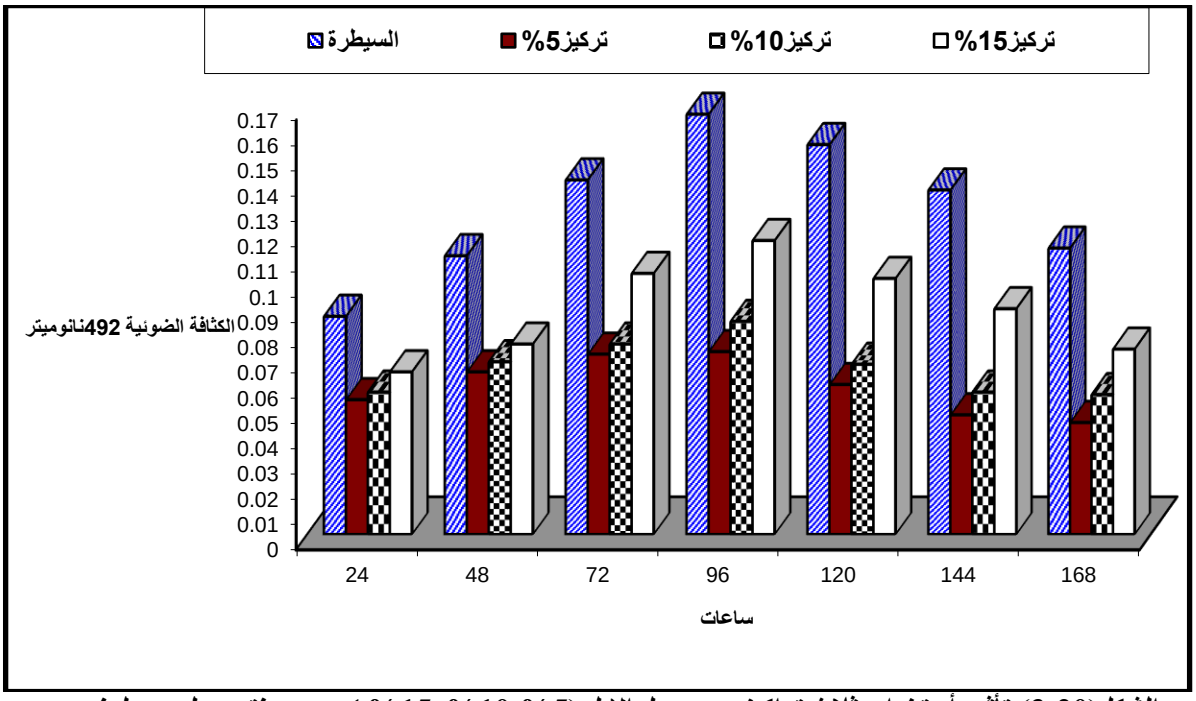
3-1-3-1 خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2

وجد أن الوسط الزرعي RPMI-1640 المزود بمصل الإبل وبتراكيزه جميعها ولكل عمر مستخدم القدرة على تنمية خلايا هذا الخط ولكن بصورة أقل معنويا من السيطرة . فقد أظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود انخفاض معنوي $p<0.05$ في معدل نمو و أنقسام خلايا Hep-2 عند معاملتها بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل وبأعماره الثلاث مقارنة بالسيطرة ألا أنه كلما أزداد التركيز و قل عمر الحيوان الذي أخذ منه المصل كلما كان أكثر قربا من السيطرة و كما هو

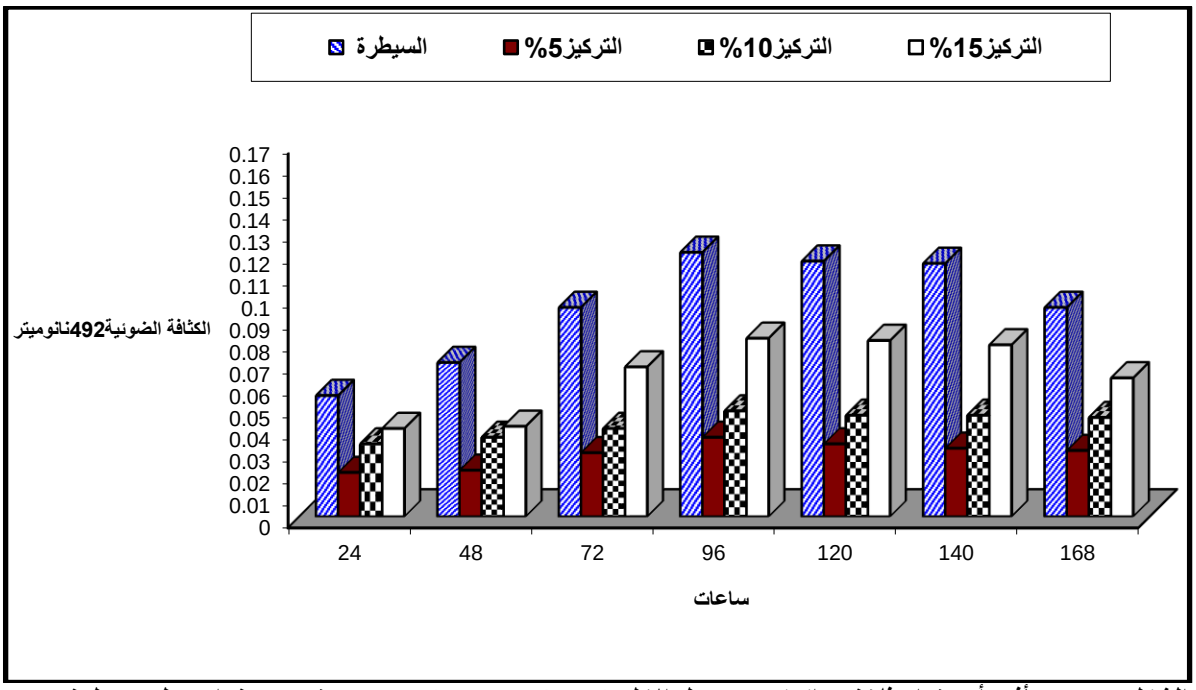
موضح في الأشكال (3-19) ،(3-20)، (3-21).كما لوحظ أن هناك فروقا في تأثير تلك التراكيز وتحت مستوى$p<0.05$ من جهة والأعمار من جهة أخربعند مستوى $p<0.01$ على معدل نمو وأنقسام خلايا هذا الخط السرطاني عند المقارنة الأحصائية بينهما. فوجد أن تركيز 15% المستخدم من مصل الإبل أفضل التراكيز المستخدمة في تنمية الخلايا و أن العمر خمسة اشهر كان افضل الأعمار كما هو موضح في الشكل (3-22).



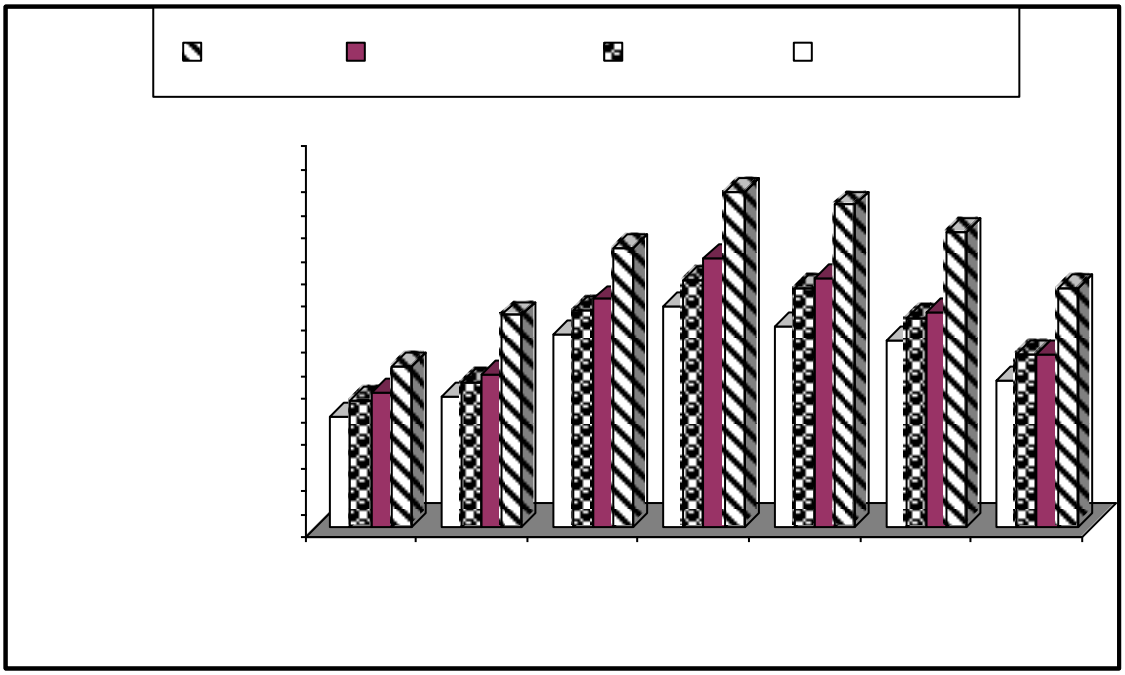
الشكل(3-19) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل(5%،10%و 15%) بعمر خمسة أشهر على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة



الشكل(20-3) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل (5%،10%و15%) بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة



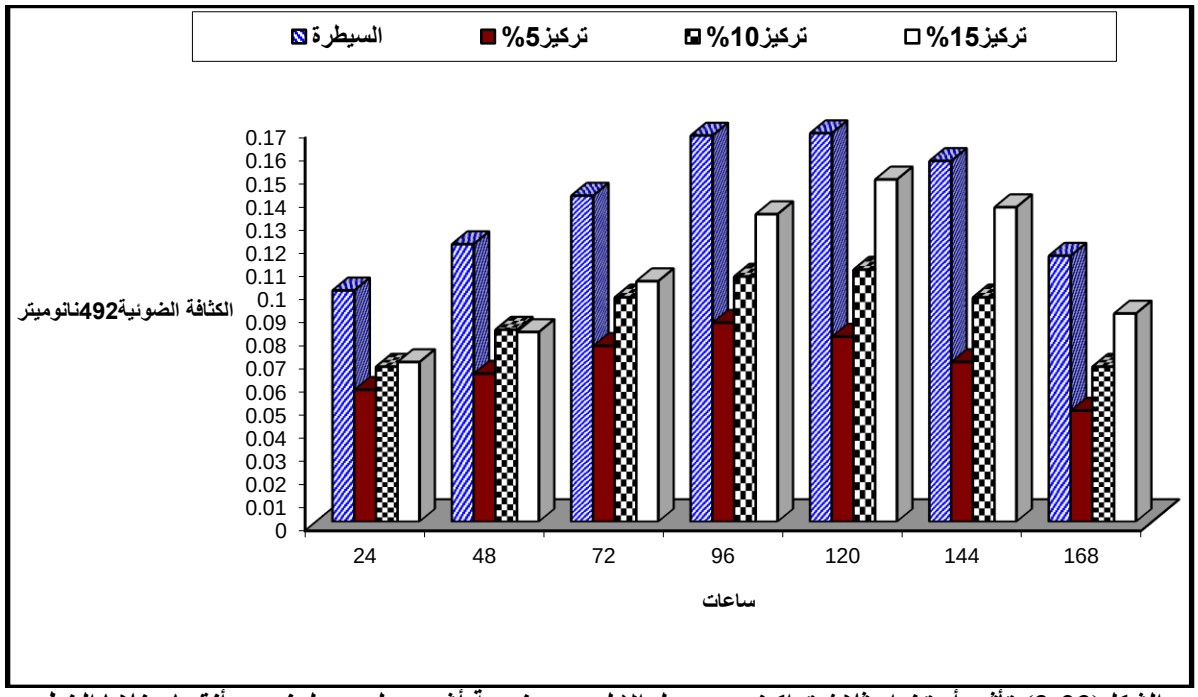
الشكل(21-3) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل(5%،10%و15%) بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي Hep-2 مقارنة بالسيطرة



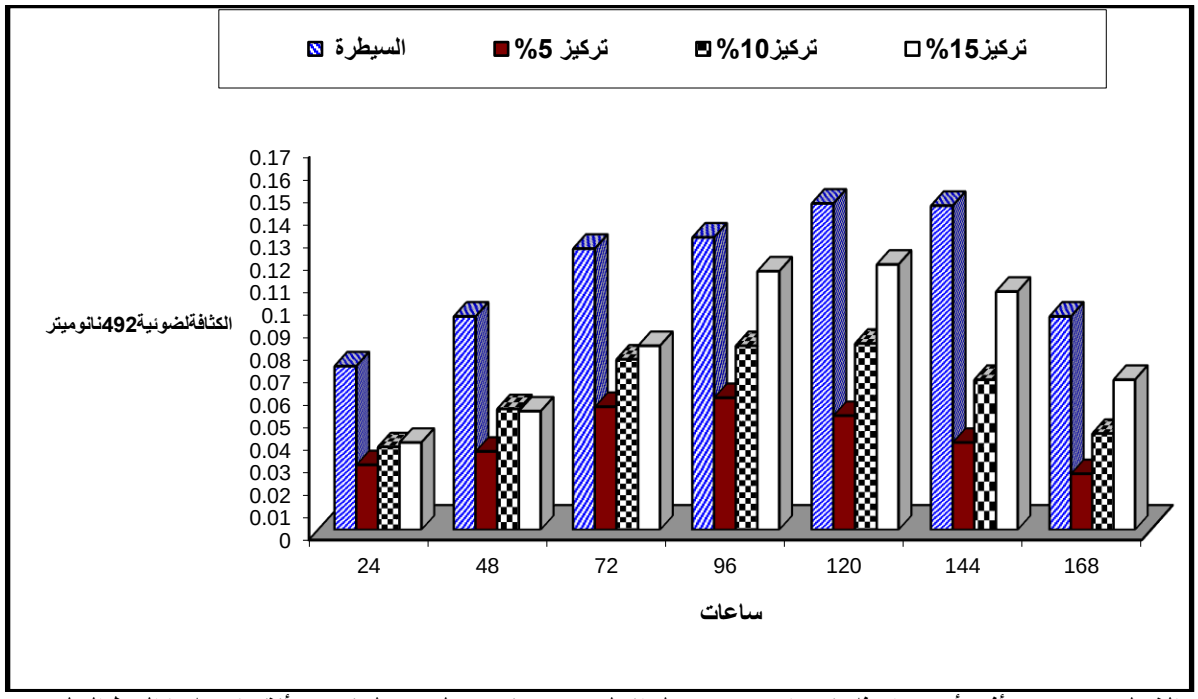
الشكل(22-3) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز 15% على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة

3-1-3-2 خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3

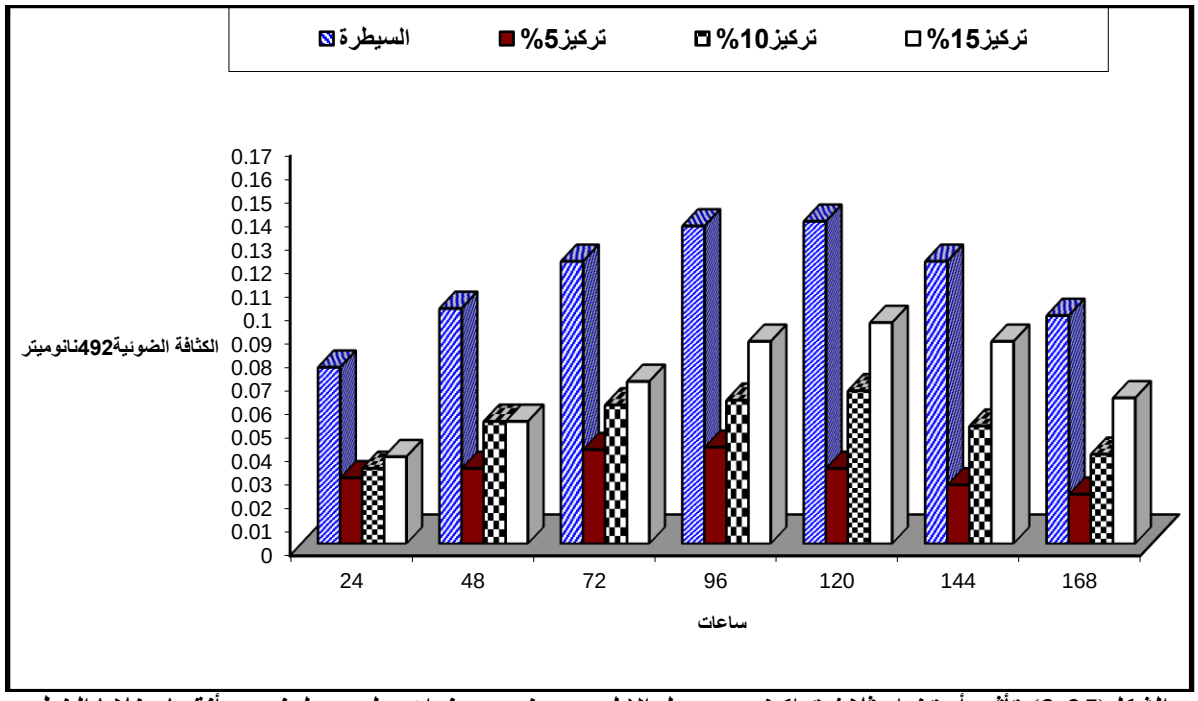
أظهرت نتائج التحليل الأحصائي و كما هي موضحة في الأشكال (3-23)، (3-24)، (3-25) الى وجود أنخفاض معنوي $p<0.05$ في معدل نمو و أنقسام خلايا سرطان AMN-3 المنماة في الوسط الزرعي RPMI الحاوي على التراكيز الثلاث من مصل الإبل و بأعماره المستخدمة في الدراسة مقارنة بالسيطرة على الرغم من قدرتها على تنمية هذه الخلايا فقد وجد من النتائج انه كلما قل عمر الحيوان و ازداد تركيز المصل كلما ازداد قربا من السيطرة.كما وجد ان هذه التراكيز تظهر فروقا فيما بينها عند مستوى معنوية $p<0.05$ فضلا عن الفروق التي ظهرت بين الأعمار المستخدمة من مصل الإبل عند المقارنة الأحصائية بينهم تحت مستوى معنوية $p<0.01$ فكان افضل تلك التراكيز المستخدمة 15% و أفضل تلك الأعمار العمر خمسة أشهر الشكل(3-26)



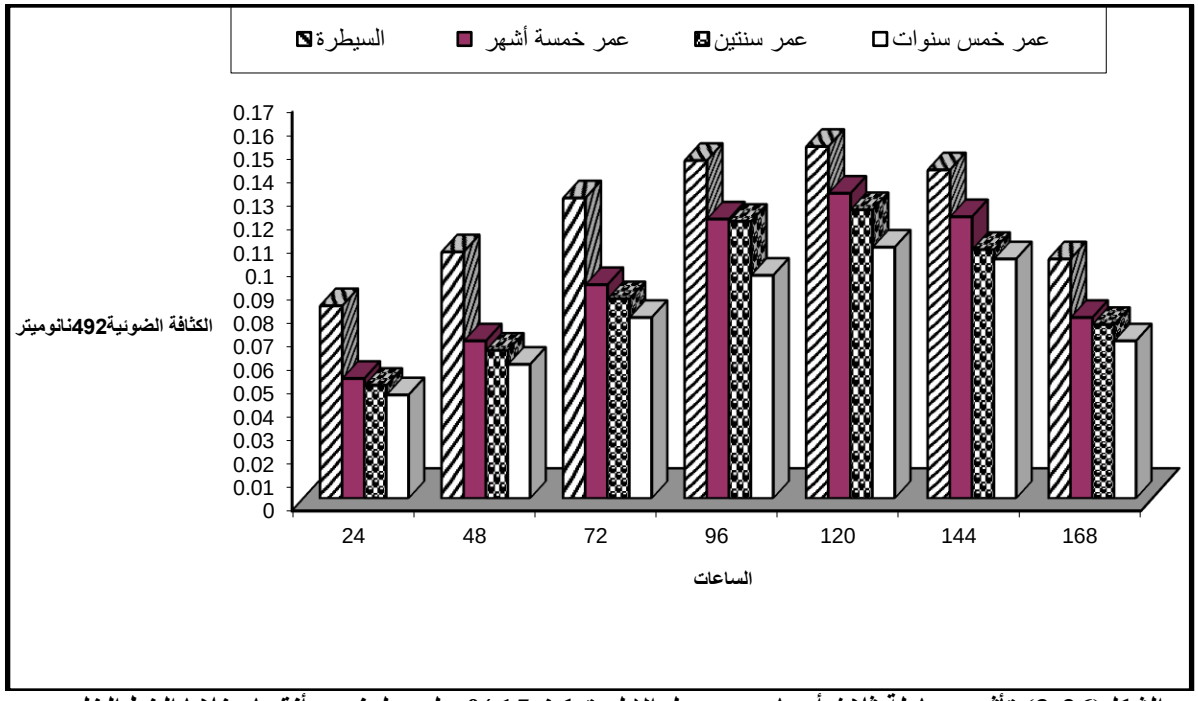
الشكل(23-3) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة



الشكل(24-3) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة



الشكل(25-3) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بالمقارنة مع السيطرة.

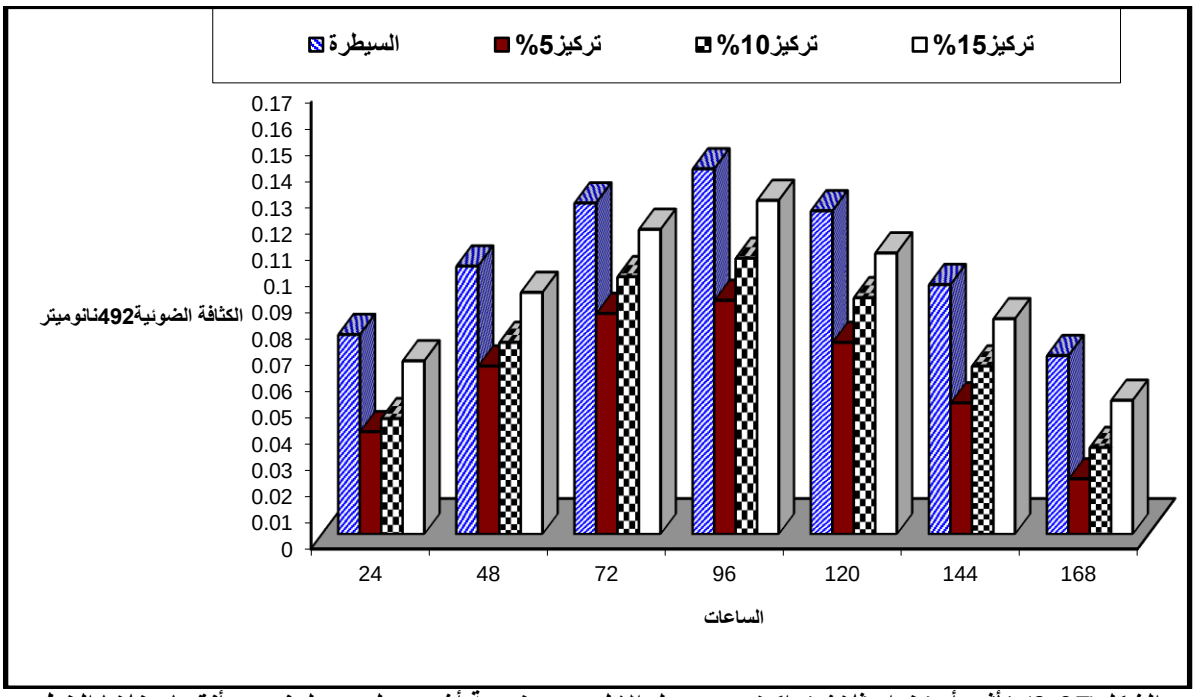


الشكل(26-3) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز 15% علىمعدل نمو وأنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة

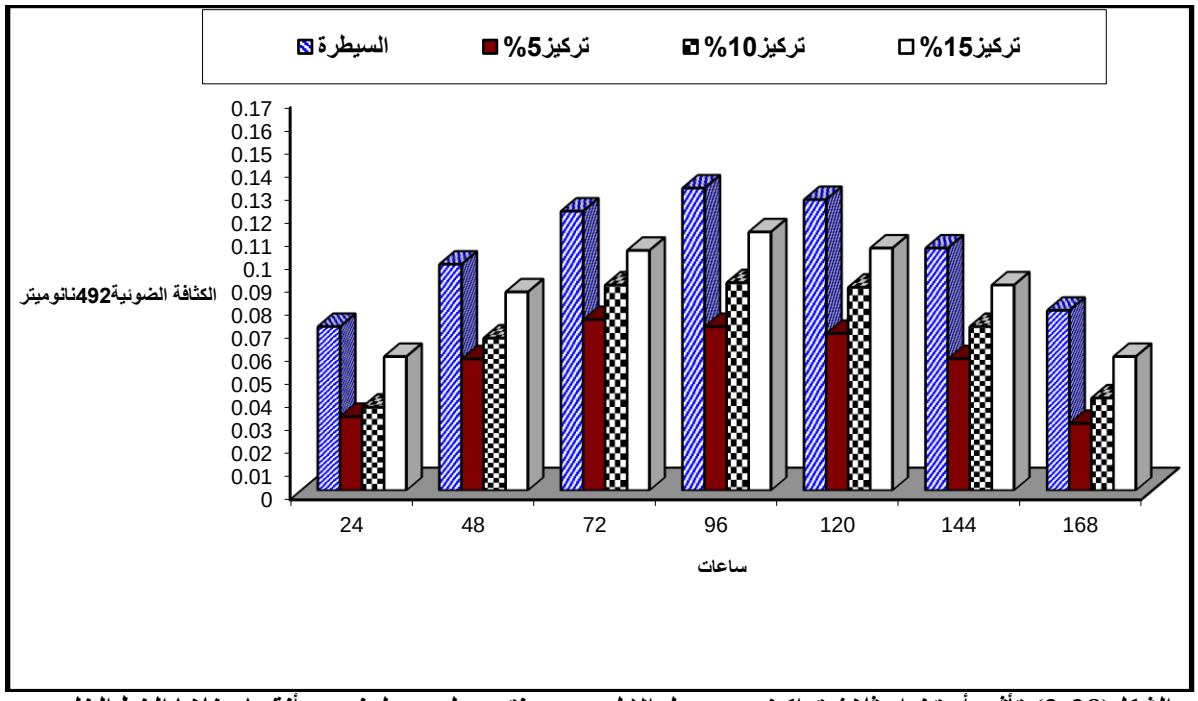
3-3-1-3 خط خلايا الطبيعي لجنين الجرذ REF

على الرغم من امكانية تنمية الخلايا الطبيعية لهذا الخط بأوساط مزودة بتراكيز مصل الإبل الثلاث وباعماره جميعا (المستخدمة في الدراسة) الى ان تلك الخلايا أظهرت انخفاضا معنويا $P<0.05$ في معدلات نموها و أنقسامها عند

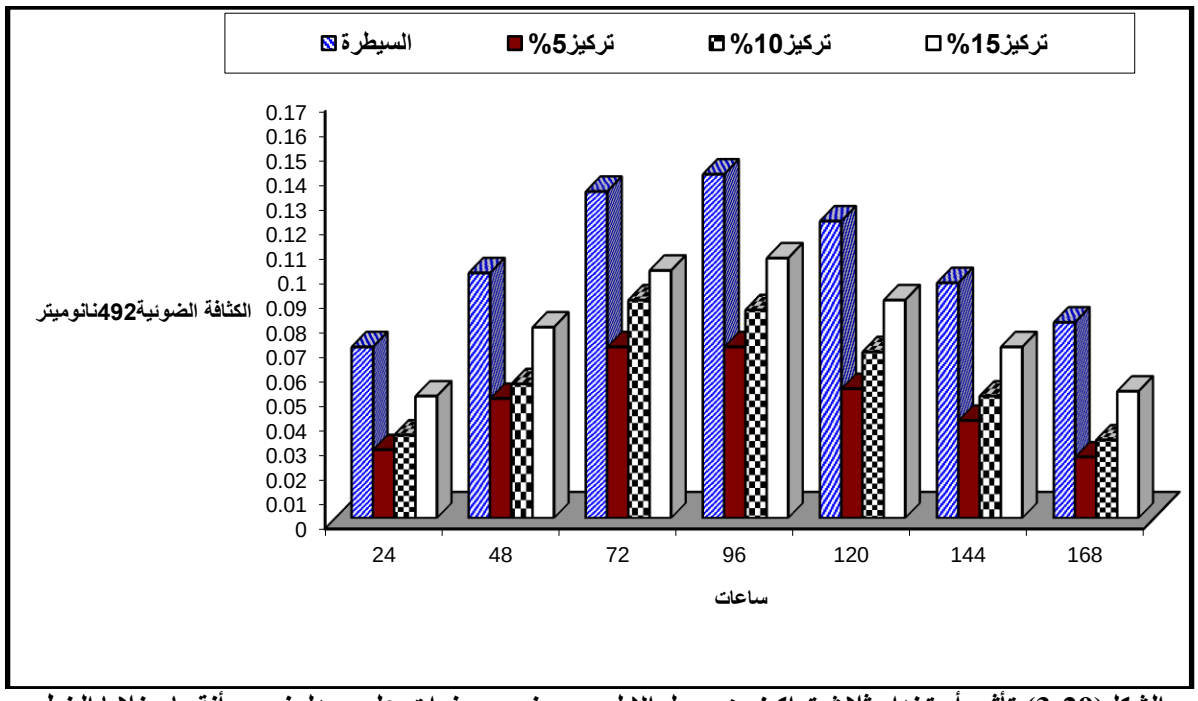
مقارنتها بالسيطرة و على طول فترة التجربة وكما هوموضح في الأشكال(3-27) ،(3-28) ، (3-29) الا ان هذا الأنخفاض يقل كلما ازداد تركيز مصل الإبل وقل عمر الحيوان الذي أخذ منه المصل . وعند أجراء المقارنة الأحصائية بين هذه التراكيز الثلاث من مصل الإبل تحت مستوى معنوية $p<0.05$ و كذلك بين أعماره الثلاث تحت مستوى معنوية $p<0.01$ لوحظ ان أفضل التراكيز المستخدمة في الدراسة في تنمية الخلايا 15% و أفضل الأعمار العمر خمسة اشهر كما موضح في الشكل (3-30).



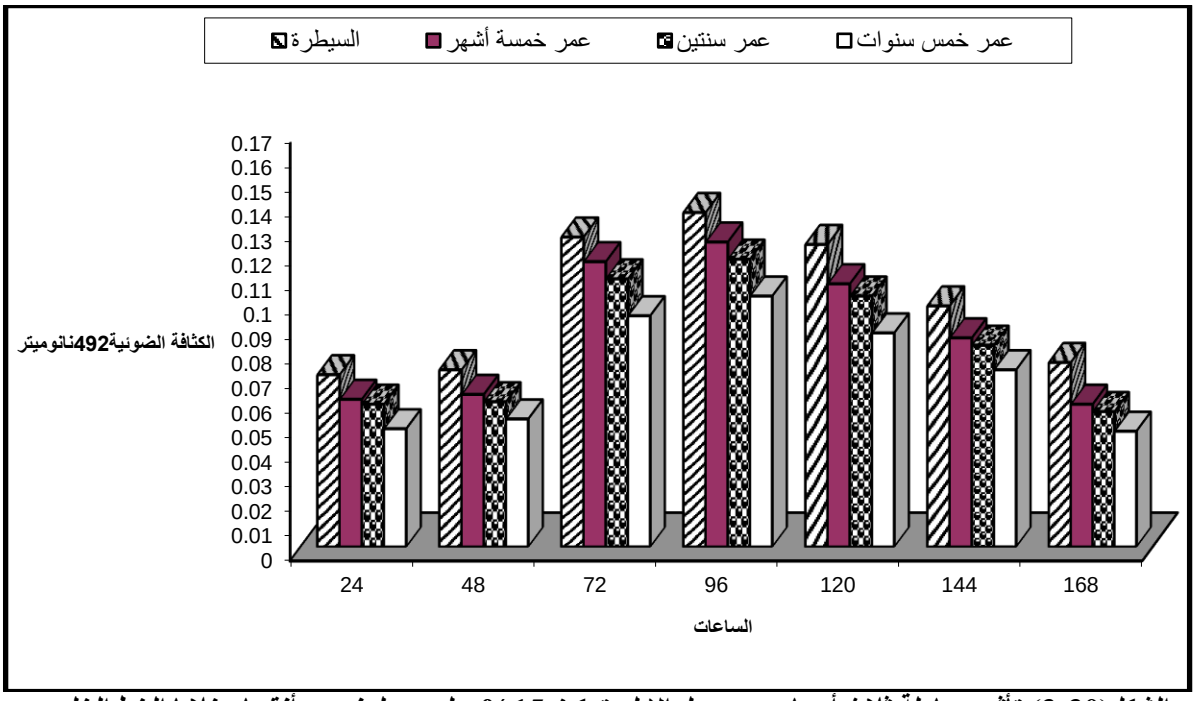
الشكل(3-27) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة



الشكل(28-3) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعيREF مقارنة بالسيطرة



الشكل(29-3) تأثير أستخدام ثلاث تراكيزمن مصل الإبل بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة



الشكل(30-3) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز 15% على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة

وبما أن افضل تراكيز مصل الإبل المستخدمة في تنمية خلايا الخطوط الخلوية (الخطين الخلويين السرطانين Hep-2 و AMN-3 وخط الخلايا الطبيعي REF)كان عند التركيز 15% .لذا تمت المقارنة الأحصائية تحت مستوى معنوية $p<0.05$ عند هذا التركيز بين تلك الخطوط الخلوية عند العمر خمسة أشهر و التي أظهرت فروقاً معنوية فيما بينها فكانت أفضل خلايا تلك الخطوط أستجابة للمصل خلايا الخط الطبيعي REF عند جميع أيام التجربة ثم الخط الخلوي السرطاني Hep-2 من اليوم الأول حتى اليوم الرابع من التجربة مقارنة بالخط الخلويAMN-3 .

3-1- 4 دراسة وراثية خلوية للخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF و المعاملة بالأوساط الحاوية على مصل الإبل

Cytogenetic study of cancer & normal cell line that treatment with camel serum

3-1-4-1 الخط الخلوي السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري

أجري التحليل الكروموسومي للخط الخلوي السرطاني Hep-2 عند التمريرة (262)و عده السيطرة للمقارنة بين الهيئة الكروموسومية لذلك الخط بعد المعاملة بمصل الإبل و عند التمريرة نفسها بأضافة التراكيز الثلاثة منه بعمر خمسة أشهر و مقارنتها بالسيطرة.لوحظ وجود ظاهرة tripolidy عند كل من السيطرة و الخلايا المعاملة بالتراكيز الثلاثة من مصل الإبل.

3-1-4-2 الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لسرطان الغدد اللبنية الفأري

أستخدمت خلايا هذا الخط عند التمريرة (50) و تم أجراء التحليل الكروموسومي للسيطرة و الخلايا المعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل للعمر خمسة أشهر و عند التمريرة نفسها في السيطرة .فلوحظ وجود ظاهرة تعدد الكروموسومات Polyploid Chromosomes عند كل من السيطرة و الخلايا المعاملة.

3-1-4-3 الخط الخلوي الطبيعي REF لجنين الجرذ

أظهرت خلايا هذا الخط عند التمريرة (20) في السيطرة و كذلك في الخلايا المعاملة بالتراكيز الثلاثة من مصل الإبل للعمر خمسة أشهر عدم وجود أختلاف في الهيئة الكروموسومية بين كل من السيطرة و المعاملات .حيث لوحظ وجود الكروموسومات الطبيعية المضاعفة Normal diploid chromosom عند كل منهما.

3-1-4-4 حساب معامل الأنقسام (MI)

حُسب دليل الأنقسام الخلوي Mitotic Index (MI) لكل من الخطوط الخلوية السرطانية(Hep-2 و AMN-3) و الخط الطبيعي (REF) و المعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل عند العمر خمسة أشهر و قورنت مع السيطرة.فلوحظ وجود أنخفاض معنوي $p<0.05$في عدد الخلايا المنقسمة المعاملة بمصل الإبل عند تراكيزه الثلاثة مقارنة بالسيطرة كما هو موضح في الجداول(3-4) و (3-5) و (3-6). و عند المقارنة بين التراكيز عند مستوى معنوية $P<0.05$ وجد ان التركيز 15% أفضل التراكيز المستخدمة .

جدول (3-4) معامل الأنقسام الخلوي لخلايا الخط الخلوي Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة

التراكيز%	عمر خمسة أشهر	السيطرة
%5	12.2 c*	37.8
%10	17.4 b*	
%15	27.8 a*	

جدول (3-5) معامل الأنقسام الخلوي للخط الخلوي السرطاني AMN-3 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة

التراكيز%	عمر خمسة أشهر	السيطرة
%5	5.6 c*	37.6
%10	13.6 b*	
%15	20.8 a*	

جدول (3-6) معامل الأنقسام الخلوي لخلايا الخط الطبيعي REF و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل عند العمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة

التراكيز %	عمر خمسة أشهر	السيطرة
%5	1.02 c*	4.72
%10	1.57 b*	
%15	2.2 a*	

* تعني وجود فروق معنوية بمستوى $p<0.05$ بين مجموعة السيطرة و تراكيز مصل الإبل.
الحروف المختلفة تعني وجود فروق معنوية بمستوى $p<0.05$ بين التراكيز الثلاثة من مصل الإبل.

3-1-5 دراسة وراثية خلوية لتأثير تراكيز مختلفة من مصل الإبل العراقية ، لحيوانات مختلفة الأعمار على الخلايا اللمفاوية البشرية

Effect of different ages & concentration of camel serum on division of human lymphocytes with & without mitogen (PHA)

3-1-5-1 دليل الأنقسام الخلوي Mitotic Index (MI) و التحسس الخلوي Blastocyte Index(BI) للخلايا اللمفاوية بإضافة العامل المشطر (PHA) وبدون أضافته

تم دراسة تأثير ثلاث أعمار (خمسة أشهر ، سنتين وخمس سنوات)من مصل الإبل و بواقع أربع تراكيز (5%،10%،15% و 20%) في أنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية بأضافة العامل المشطر PHA و بدونه ثم قورنت بالتراكيز نفسها من المصل البقري و تركيز (20%) من البلازما البشرية و ‘عدا السيطرة، وبثلاث مكررات لكل معاملة منها. أ‘عيد هذا الأختبار ثلاث مرات لضمان تقليل نسبة الخطأ ،ثم تم حساب دليل الأنقسام الخلوي MI ودليل الخلايا الأرومية BI .

3-1-5-1 –1 بأضافة العامل المشطر (PHA)

لوحظ من النتائج الأحصائية أن تلك التراكيز لها تأثير مرتفع المعنوية $p<0.01$ في أعداد الخلايا اللمفاوية المنقسمة و المتحسسة مقارنة بالسيطرة وكما هو موضح في الجدولين (3-7)و (3-8).الا أن تلك التراكيز أظهرت تباينا من ناحية تأثيرها من جهة و بين الأعمار المستخدمة من جهة أخرى.

3-1-5-1-1-1 عمر خمسة أشهر

أظهرت النتائج أن هناك ارتفاع معنوي $p<0.01$ في أعداد الخلايا اللمفاوية المنقسمة MI والمتحسسة BI المعاملة بالتراكيز الأربعة لمصل الإبل مقارنة بالسيطرة (بتركيز 20% من البلازما البشري) والتي تبلغ فيها (السيطرة) نسبة MI (1.77%) و BI (3.3%) .

كما وجد ان التركيز 20% لمصل الإبل أفضل هذه التراكيز تأثيراً والتي تبلغ نسبة MI (3.83%) و BI (5.83%) يليه التراكيز 15% ، 10% و 5% والتي تبلغ نسب MI فيها (3.2) (2.73%) (2.27%) على التوالي ونسب BI (5.5%) (5.43%) (4.7%) على التوالي.

أما عند مقارنة كل تركيز من التراكيز الأربعة من مصل الإبل بالتراكيز الأربعة للمصل البقري (السيطرة) .لوحظ أن هناك ارتفاع معنوي$p<0.01$ في عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة و المتحسسة الا ان ذلك الأرتفاع كان متباينا حسب التركيز المستخدم من مصل الإبل . فعند مقارنة التركيز 5% لمصل الإبل بالتراكيز الأربعة للمصل البقري وجد أن هناك ارتفاع معنوي $p<0.01$ في عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة MI و المتحسسة BI بالمقارنة مع التركيز 5% من مصل البقري و التي بلغ نسبة MI فيها (1.53%) و نسبة BI (3.16%) .كما لوحظ عدم وجود فروق معنوية في عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة MI للتركيز 5% من مصل الإبل بالمقارنة مع التركيز10% للمصل البقري و الذي يبلغ نسبته (2.2%) و أرتفاع معنوي$p<0.01$ في عدد الخلايا اللمفاوية المتحسسة BI لتركيز مصل الإبل السابق بالمقارنة مع (3.66%) من التركيز 10% من السيطرة، الا أنه لوحظ عند المقارنة مع التركيزان 15% و 20% للمصل البقري وجود أنخفاض معنوي $p<0.01$ في عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة و المتحسسة للتركيز 5% من مصل الإبل والتي بلغ فيهما نسبة MI (2.6%) للتركيز 15% و (3.17%) للتركيز 20% أما نسبة BI فقد بلغت (5.06%) ،(5.4%) للتركيزين السابقين من مصل البقري على التوالي.

بالنسبة للتركيز 10% لمصل الإبل لوحظ عند المقارنة الأحصائية مع التراكيز الأربعة للمصل البقري أرتفاعاً معنوياً $p<0.01$ في MI و BI مقارنة

بـالتراكيز 5% و 10% للمصـل البقـري و عـدم وجـود فـروق معنويـة مـع التركيز15% في MI وأرتفاع معنوي $p<0.01$ في BI مع التركيز 15% للمصل البقري وانخفاض معنوي $p<0.01$ في MI وعدم وجود فروق معنوية في BI مقارنة بـ 20% للمصل البقري .

وعند التركيز 15% لمصل الإبل لوحظ أن MI وBI له مرتفع معنوياً $p<0.01$عند مقارنته بالتراكيز 5% ، 10% و 15% لمصل البقري و عدم وجود فروق معنوية عند مقارنته بالتركيز 20%.

أما التركيز 20%من مصل الإبل فقد وجد أن نسبة MI وBI مرتفعاً معنوياً $p<0.01$ عند مقارنته بجميع تراكيز مصل البقري .

أما عند المقارنة بين التراكيز الأربعة من مصل الإبل لوحظ وجود فروق معنوية حيث أظهر التركيز 20% تفوقاً معنوياً $p<0.01$ على بقية التراكيز في MI وBI يليه التركيز 15% ، 10% و 5% في MI وعدم وجود فروق معنوية بين التركيز 10% و 15% و أنخفاض معنوي في التركيز 5% مقارنة ببقية التراكيز في BI.

3-1-5-1-1-2 عمر السنتين

لوحظ أن التراكيز الأربعة من مصل الإبل عند هذا العمر أظهرت فروقا معنوية في MIو BI بالمقارنة مع التركيز 20% للبلازما البشري و تحت مستوى معنوية $P<0.01$ فلم تظهر أعداد الخلايا المنقسمة MI و التي بلغ نسبتها في التركيز 5% من مصل الإبل (1.63%) فروقا معنوية مع MI للسيطرة(البلازما البشري) ، أما BI والذي تبلغ نسبته عند هذا التركيز من مصل الإبل (3.23%) فقد أظهر ارتفاعا معنوياً مقارنة بالبلازما البشري، أما بقية التراكيز من مصل الإبل فقد أظهر MIو BI أرتفاعاً معنوياً $P<0.01$ مقارنة بالسيطرة (البلازما البشري) حيث بلغ نسب MI في تلك التراكيز(1.93%) عند التركيز10% و (2.27%) عند التركيز 15% و (2.63%) عند التركيز 20% أما BI فقد بلغت عند التركيز 10% (3.66%) ، (4.4%) عند التركيز 15% أما التركيز 20% فقد بلغت النسبة فيه(4.96%).

وعند مقارنة كل تركيز من التراكيز الأربعة لمصل الإبل بتراكيز المتناظرة من مصل البقري ، لوحظ من النتائج الأحصائية أن هناك تبايناً في أظهارها للفروق المعنوية .فعند التركيز 5% لمصل الإبل لوحظ عدم وجود فروق معنوية في MI في BI عند مقارنتها بـ 5% من مصل البقري و أنخفاض معنوي $p<0.01$مع بقية التراكيز الأخرى من مصل البقري .

وعند المقارنة الأحصائية بين التراكيز الأربعة أظهر التركيز 20% أرتفاعاً معنوياً p<0.01 مقارنة مع بية التراكيز في MI و BI تلية التراكيز 15% و 10% و 5% في MIو BI . بالنسبة للتركيز 10% لوحظ وجود ارتفاع معنوي في MIوBI مع التركيز 5% لمصل البقري و أنخفاض معنوي P<0.01 في عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمةMI وعدم وجود فروق معنوية في عدد الخلايا اللمفاوية المتحسسة BI عند مقارنتها مع التركيز 10% من مصل البقري و أنخفاض معنوي P<0.01في MI و BI مع بقية التراكيز الأخرى من المصل البقري(15% و20%) .

التركيز 15% لمصل الإبل أظهر أرتفاع معنوي p<0.01مع التركيز 5% في MIو BIوعدم وجود فروق معنوية في MI وأرتفاع معنوي p<0.01في BI مقارنة بـ 10% لمصل البقري و أنخفاض معنوي p<0.01 في MI و BI مع بقية التراكيز مصل البقري . وقد اظهر التركيز 20% لمصل الإبل وجود ارتفاع معنوي p<0.01 بالمقارنة مع التراكيز 5% و 10%من مصل البقري في MI و BI و عدم وجود فروق معنوية مع التركيز 15% من مصل البقري في MI و BI و أنخفاض معنوي p<0.01 مع التركيز 20% من مصل البقري في كل من MI و BI.

3-1-1-5-1-3عمر خمس سنوات

عند مقارنة تراكيز مصل الإبل عند هذا العمر مع التركيز 20% للبلازما البشري (السيطرة) لوحظ أن هناك أنخفاض معنوي p<0.01 في MI عند التركيزين 5% و 10% لمصل الإبل الذي يبلغ نسبة MI فيهما (1.2%) و (1.53%) على التوالي مقارنة بالسيطرة وارتفاع معنوي p<0.01 في بقية التراكيز مصل الإبل فكان MI عند التركيز 15% (1.87%) و التركيز20% (2.23%).كما لوحظ عدم وجود فروق معنوية في BI عند التركيز 5% و الذي تبلغ النسبة فيه (2.9%)و أرتفاع معنوي p<0.01 في بقية التراكيز مصل الإبل فكانت عند التركيز 10% (3.26%) و التركيز 15% (3.56%) و (3.9%) عند التركيز 20%مقارنة بالسيطرة.

اما عند المقارنة مع التراكيز الأربعة المتناظرة من مصل البقري فلوحظ أنخفاض معنوي في MI و BI عند التركيز 5% لمصل الإبل عند المقارنة مع جميع تراكيز مصل البقري وعدم وجود فروق معنوية في MIو BI بين التركيز 10% لمصلالإبل وبين التركيز 5% لمصل البقري وأنخفاض معنوي p<0.01 مع بقية التراكيز مصل البقري في MI و BI كما لوحظ أرتفاع معنوي p<0.01 في أعداد الخلايا اللمفاوية المنقسمة MI و المتحسسة BI

عند التركيز 15% من مصل الإبل بالمقارنة مع التركيز 5% لمصل البقري و أرتفاع معنوي في MI عدم وجود فروق معنوية في BI بالمقارنة مع التركيز 10% لمصل البقري وانخفاض معنوي في MI و BI مع بقية التراكيز مصل البقري . أما التركيز 20% أظهر أرتفاع معنوي $p<0.01$ مع التركيز 5% للمصل البقري في MI و BI و عدم وجود فروق معنوية مع التركيز 10% في MI وأرتفاع معنوي$p<0.01$ في BI . كما لوحظ وجود أنخفاض معنوي $p<0.01$ في MI و BI مع بقية التراكيز لمصل البقري .

و عند المقارنة ما بين تراكيز مصل الإبل وبأعماره المستخدمة في الدراسة لوحظ أن التركيز 20% كان أفضل تلك التراكيز المستخدمة في MI و BI مقارنة ببقية التراكيز الأخرى من مصل الإبل.

أما عند المقارنة مابين الأعمار المستخدمة من مصل الإبل فقد وجد ان العمر خمسة اشهر كان افضل الأعمار المستخدمة حيث كان له تأثيرا مرتفع المعنوية $p<0.01$ على أعداد الخلايا اللمفاوية المنقسمة و المتحسسة مقارنة ببقية الأعمار.

كما وجد أنه كلما قل عمر الحيوان و أزداد التركيز كلما أزدادت النسب المئوية للـ MIو BI للخلايا اللمفاوية.

الجدول (7-3) دليل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بأضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة

التركيز	عمر خمسة أشهر	عمر السنتين	عمر الخمسة سنوات	مصل البقري	البلازما البشري
%5	2.27 ba*	1.63 b	1.2 be*	1.53 b	
%10	2.73 bc*	1.93 c*	1.53 b*	2.2 ba	
%15	3.2 bd*	2.27ba*	1.87 bf*	2.6 bc	
%20	**3.83** a*	2.63 bc*	2.23 ba*	3.17 bd	1.77

الجدول(8-3) دليل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بأضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة

التراكيز	عمر خمسة أشهر	عمر السنتين	عمرالخمسة سنوات	مصل البقري	بلازماالبشري
%5	4.7 ba*	3.23 b*	2.9 e	3.16 b	
%10	5.43be*	3.66bc*	3.26 b*	3.66 bc	
%15	5.5 be*	4.4 c*	3.56 bc*	5.06 bd	
%20	**5.83** a*	4.96 bd*	3.9 f*	5.4 be	3.3

* تعني وجود فروق معنوية بمستوى $p<0.01$ بين مجموعة السيطرة(البلازما البشري) و تراكيز مصل الإبل.
الحروف المختلفة تعني وجود فروق معنوية بمستوى $p<0.01$ بين التراكيز الثلاثة من مصل الإبل و السيطرة (مصل البقري).

3-1-4-1-2 بدون أضافة العامل المشطر PHA

اظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية في أعداد الخلايا اللمفاوية المنقسمة MI و أعداد الخلايا اللمفاوية المتحسسة BI مقارنة بالسيطرة (التراكيز الأربعة لمصل البقري و تركيز 20% للبلازما البشري) ، الجدولين(9-3) و(10-3)

الجدول(9-3) دليل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بدون إضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة

التراكيز	عمر خمسة أشهر	عمر سنتين	عمر خمس سنوات	مصل البقري	البلازما البشري
%5	\	\	\	\	\
%10	\	\	\	\	\
%15	0.06	\	\	0.03	\

%20	0.10	0.03	\	0.10	\

الجدول(10-3) دليل التحسس الخلوي(BI) للخلايا اللمفاويةالنامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بدون إضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة

التراكيز %	عمر خمسة أشهر	عمر سنتين	عمر خمسة سنوات	مصل البقري	البلازما البشري
%5	0.10	0.10	0.03	0.10	
%10	0.13	0.10	0.06	0.13	
%15	0.13	0.13	0.06	0.13	
%20	0.16	0.13	0.10	0.16	0.03

3-1-4-2 التغيرات الكروموسومية

درست التغيرات الكروموسومية العددية و التركيبية لكروموسومات الخلايا اللمفاوية المعاملة بأوساط حاوية على تراكيز الثلاث من مصل الإبل و بأعماره الثلاث و تم مقارنتها مع السيطرة من خلال فحص الوراثي لـ 30 خلية منقسمة فلم يلاحظ وجود أي تغيرات كروموسومية عددية أو تركيبية تذكر عند كل من التراكيز الثلاث من مصل الإبل و بأعماره جميعا.

المناقشة

أن عملية تنمية الأنسجة الحيوانية خارج الجسم الحي *In vitro*، تتطلب توافر جميع المتطلبات الغذائية مع عوامل النمو Growth factor التي تساعدها على الاستمرار بالانقسام و النمو كما لو كانت داخل الجسم الحي *In vivo* (Butler,1996).ونجاح هذه التقنية يخدم كثيرا في إكثار الخطوط الخلوية و التي تمثل أنظمة اختبارية جيدة ، لاسيما في مجال دراسة و فهم حيوية و سلوك الخلية السرطانية من جوانب عدة ،فضلاً عن أمكانية السيطرة على هذه الأنظمة (Kotecki *et al*. 1999).و تعد الأوساط الزرعية الحجر الأساس للزرع النسيجي والذي يعد المصل فيه احد مكوناته الأساسية و لاسيما ُ مصل جنين البقري (Carlo *et al*. 2004) . و لصعوبة الحصول على مصل جنين البقري في العراق لكلفته العالية و لعدم وصوله إلى كامل فعاليته بسبب ظروف الخزن فكانت هناك محاولات لأستخدام بدائل محلية متوفرة فجاءت منها التخطيط لهذا المشروع و اختيار مصل الإبل العراقية.

وقد تم أختيار ذكور الإبل فقط لتحديد الجنس و لتجنب التغيرات الوظيفية عند الإناث في الأعمار الكبيرة (البالغة) .فضلا عن أن أعداد الحيوانات المذبوحة في المجازرو التي تراوحت أعمارها ما بين (خمسة أشهر الى خمس سنوات) أغلبها من الذكور.

٤-١ دراسة تأثير معاملة خلايا الخط السرطاني Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF بتراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة .

تمثل أطوار منحنيات النمو طريقة لمعرفة مدى أستجابة الخلايا للتغيرات في الظروف المحيطة بها فتمثل طور Lag في منحنى النمو طور تكيف Adptation period للخلايا من حيث التصاقها وأنتشارها و تكوين شريط جديد من دنا DNA كما تتكون الكثير من البروتينات التركيبية خلال هذه الفترة (Freshney , 2000) . فيلاحظ من النتائج ان هذا الطور تطول كلما قل تركيز المصل المستخدم في جميع الخطوط الخلوية و لاسيما عند خط الخلايا الطبيعي REF و هذه يتفق مع ما توصل اليه(Ali,2000) عندما لاحظ طول فترة طور Lag في الخلايا الطبيعية المأخوذة من رئة حيوان الهامستر الصيني Chinese Hamster Lung(CHL) تزداد كلما قل تركيز المصل المستخدم.و قد يعزى سبب ذلك الى كون تلك الخطوط سواء كانت سرطانية أو طبيعية تعتمد كثيرا في بداية نموها على نسب مكونات المصل من البروتينات مثل البروتينات المسؤولة عن

الألتصاق (كبروتين الفايبرونكتين و الفالين و الامنين و الثرمبوسبودين)أي بروتينات ECM فضلا عن الهرمونات(مثل هرمون الأنسولين و هرمونات القشرية السكرية و هرمونات الغدة الدرقية وغيرها من الهرمونات)و عوامل النمو (مثلPDGF ، TGF-*B*، IGF-I ، IGF-2 ...الخ) و الدهون و المعادن و العناصر النادرة فضلا عن الأحماض الأمينيةو الكلكوز. فخلايا الخطوط الخلوية مثلاً ليس لها القابلية على تكوين بروتينات ECM بعد كل عملية زرع ثانوي بذلك فتعتمد بذلك على بروتينات المصل المسؤولة عن الألتصاق (Freshney,2000). كما توصل الباحث (Ali, 2000) بأن قوة التصاق الخلايا الطبيعية يزداد مع أزدياد تركيز المصل و الذي يكون بداية لأنتشار و أتصال و نمو الخلايا و تكاثرها فكلما كان الألتصاق قليل كلما كان معدل نموها قليل. وهذا ما لوحظ ايضا في خلايا خط AMN-3 السرطاني (كونه من الغدد اللبنيةو التي تعتمد بطبيعتها على بروتينات المصل عند الألتصاق(Vincent *et al*. 1982)) حيث تكون أحتياجاته المثالية من المصل ١٠% وعند عدم أستخدام المصل تبقى اغلب خلاياه طافية كعالق خلوي حيث يحصل التصاق قليل(الشمري ،٢٠٠٣) مما يؤثر على نموها فكان طور Decline في هذه الدراسة عند خلايا هذا الخط و المعاملة بتركيز 5% من مصل الإبل و بجميع أعماره المستخدمة مبكرة مقارنة بالتراكيز الأخرى و كما هو موضح في الأشكال(٣-٧، ٣-٩و ٣-١١). و هذا يقترح ان لهذا الخط أحتياجات الى المصل يدعم المادة الأساس الخاصة بالألتصاق على سطح الوعاء الخاص بالزرع ومن ثم النمو كما اشار الى ذلك(Yaseen, 1990) .

أما طور Log (و التي تعد قياسا لمدى كفاءة المصل المستخدم و مدى استجابة الخلايا الى العوامل الموجودة فيه) فقد لوحظ تأثر هذه الفترة في الخطوط الخلوية المعاملة بالتراكيز و الأعمار المختلفة من مصل الإبل كثيرا بتركيز المصل المستخدم حيث تزداد هذه الفترة بزيادة تركيز المصل المستخدم فكان للتركيز ١٥% أطول فترة Log . و قد يعزى سبب ذلك إلى أن معدل نمو خلايا الخطوط تعتمد كثيرا على التصاق الخلايا و التي بدورها تعتمد على عوامل الألتصاق التي ذكرت اعلاه و التي تختلف نسبها حسب تركيز المصل(Ali,2000 ; الشمري ، 2003) . أو قد يكون بسبب أعتماد تلك الخلايا على عوامل النمو المذكورة سابقاً الموجودة في المصل كما في خلايا الأورمات الليفية في الخط الطبيعي REF و التي تعتمد كثيرا على

عامل النمو PDGF (Heldin & Westermark, 2000) . او قد يعزى السبب الى أن النمو يكون بطيء جدا كلما قل تركيز المصل بسبب أن التراكيز الواطئة تؤثر على طور Lag لدورة الخلية الواحدة و المتمثلة بالفترة G1 من دورة الخلية مما سبب في طول هذه الفترة و التي تكون حساسة للتغير الذي يحصل في الظروف المحيطة بالخلية (Vincent *et al*. 1982) .لذا فقد لوحظ ان فترة التضاعف الواقعة ضمن طور Log للخلايا النامية بالأوساط الحاوية على التركيز ١٥% من مصل الإبل وبأعماره جميعها كانت أقصر من بقية التراكيز الأخرى المستخدمة في الدراسة عند مقارنتها بالسيطرة . مما أثر على طور Decline للخلايا النامية في التراكيز الواطئة من مصل الإبل فبدأت مبكرة عند التركيز ٥%في خلايا الخط السرطاني AMN-3 و عند جميع أعمار مصل الإبل المستخدمة .و أيضاً عند خلايا الخط الطبيعي REF و المعاملة بالتركيز ٥% للأعمار السنتين و الخمس سنوات و تركيز ١٠% للعمر خمس سنوات.

كما وجد ايضا من النتائج عند المقارنة بين الخطوط الخلوية المستخدمة في الدراسة الى ان خلايا REF كانت لها اطول فترة لطور Lag و اقصر فترة لطور Log .حيث تعد خلايا خط REF خلايا طبيعية بطيئة النمو فقد أشار (Benvenuti *et al*.,2002) إلى أن الخلايا الطبيعية تعاني عدد قليل من الأنقسامات عند زرعها في المستنبت قبل ان تتوقف عن النمو . فضلا عن ذلك فأن التمريرة(١٦) المستخدمة في هذه الدراسة عند خط الخلايا REF عالية (كونها من الخلايا الطبيعية) مما أثر على معدل نمو الخلايا. فقد اشار الباحث (Al-Shemary *et al*., 2005) الى أن الخلايا الجنينية للجرذ تكون نشطة في الأنقسام عند التمريرات الأولى من المزرعة الثانوية .فضلا عن ان معدل النمو لخلايا الأورمات الليفية الطبيعية ممكن أن تستمر بالتكاثر و النمو في المستنبت لعدد محدود من الأجيال(نقلات) (فبعد حوالي 30جيل يحدث تغير مفاجيء للخلايا مما يؤدي الى توقف نموها في المستنبت(Powell *et al*.,١٩٩٩) .كما اشار (Freshney , 2000) أن فترة PDT تزداد كلما كانت المزرعة النسيجية بطيئة في النمو . و هذا ما اكدته نتائج الدراسة حيث وجد ان فترة التضاعف PDT عند خلايا الخط الطبيعي REF أطول من بقية الخطوط المستخدمة في الدراسة عند السيطرة وجميع أعمار مصل الإبل بتراكيزها الثلاثة .وقد

اتفقت هذه النتيجة مع (Michael *et al.*,2001) حيث وجد ان فترة التضاعف للخلايا الأرومية الطبيعية للجرذ في الخطTGR-1طويلة.

ووجد من النتائج ان خلايا الخط السرطاني AMN-3 كان لها اطول فترة لطور Log قد يكون ذلك بسبب كون خط خلايا AMN-3 خط سرطاني حديث التكوين ، عدد تمريراته قليلة مقارنة بالخط السرطاني Hep-2.

لوحظ من النتائج ان أطوار Lagو Log قد تأثرت كثيراً بعمر الحيوان الذي أخذ منه المصل وعند جميع الخطوط الخلوية المستخدمة في الدراسة حيث لوحظ قصر طور Lag و طول طور Log كلما قل عمر الحيوان الذي أخذ منه المصل . و قد يعزى سبب ذلك الى اعتماد خلايا الخطوط الخلوية على عوامل النمو(مثل PDGF،EGF،FGF ...الخ من عوامل النمو) التي لها تأثير مشطر في الخلايا فمثلا عامل النمو PDGF له تأثير مشطر على خلايا الأورمات الليفية الطبيعية (Heldin &Westermark,2000) لذا فأن له تأثير على خلايا الخط الخلوي الطبيعي المستخدم في هذه الدراسة REF حيث تكون نسبة هذا العامل في صغار الإبل أعلى منه في البالغ بسبب ان عدد الصفيحات الدموية الحاوية على عدد كبير من حبيبات ألفا المتخصصة في تحرير هذا العامل في صغار الإبل أعلى منه في الكبار (Zaidan et al., 2000 ; Yashwat, 2000)

وبذلك كانت لخلايا جميع الخطوط الخلوية المستخدمة في الدراسة و النامية في مصل الإبل بعمر خمسة أشهر لها أقصر فترة لطور Lag و أطول فترة لطور Log كما لها أقصر فترة تضاعف مقارنة بالأعمار الأخرى. كما توصل الباحث (الشمري ، ٢٠٠٣) إلى أن خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ينمو بصورة بطيئة في الأوساط الحاوية على تركيز ١٥% من البلازما البشرية و الذي عادة لا يحوي على عامل النمو المذكور أعلاه كما أشار الى ذلك (Freshney, 1995) . فضلا عن ذلك فأن نسبة هرمون الثايروكسين يكون عاليا في صغار الإبل مقارنة بالكبار (Bengoumi *et al.* , 1999) ،وكما هو معروف فأن هذا الهرمون يعمل على زيادة العمليات الأيضية للخلايا . كما يعمل هذا الهرمون بصورة متزامنة مع هرمون النمو(Growth hormon) الذي يكون نسبته عالية عند النمو المبكر ومنها صغار الإبل (McDonald , 2003;Orbera *et al.* 2001)

.لذا وجد من النتائج ان هذه فترة التضاعف PDT قصيرة كلما قل عمر الحيوان.لذا فأن معدل النمو للخلايا النامية في مصل الإبل يكون أفضل كلما قل عمر الحيوان الذي أخذ منه المصل .
لوحظ أيضا إن أطوار Lag عند جميع تراكيز و الأعمار المستخدمة من مصل الإبل أطول من السيطرة و كذلك قصر طور Log قد يعزى سبب ذلك الى ان خطوط الخلايا المستخدمة في الدراسة ذات تمريرات عالية (مثل التمريرة ٢٤٠ للخط الخلوي السرطاني Hep-2 و التمريرة ٤٠ للخط الخلوي السرطاني AMN-3 و التمريرة 16 للخط الطبيعي REF) متكيفة للنمو على مصل البقري و لتمريرات عديدة و هذا مما اثر على تكيف الخلايا بوجود المصل الجديد.و الذي أثر بدوره على أطوار نمو الخلايا و كذلك سبب انخفاض معنوي $p<0.05$ في معدل نمو و انقسام الخلايا مقارنة بالسيطرة و عند جميع تراكيز مصل الإبل لكل عمر من الأعمار المستخدمة في الدراسة .كما سبب انخفاض معنوي في دليل الأنقسام الخلوي لخلايا الخطوط الخلوية الثلاث المستخدمة في الدراسة و المعاملة بالمصل ذي عمر خمسة أشهر و بتراكيزه الثلاث مقارنة بالسيطرة عند أجراء الدراسة الخلوية لها.

و عند دراسة الهيئة الكروموسومية للخطين السرطانين Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF قبل معاملتها بمصل الإبل بعمر خمسة أشهر و بتراكيزه الثلاثة، أظهرت النتائج وجود ظاهرة الـtriploidy عند الخط الخلوي السرطاني Hep-2 (Pan *et al*,1998) و ظاهرة تعدد الكروموسومات Polyploid chromosomes (الشمري ، ٢٠٠٣) .كما لوحظ وجود الكروموسومات الطبيعية المضاعفة Normal diploid chromosomes (Al-Shemary *et al.*, 2005) عند خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF . و عند معاملة الخلايا تلك الخطوط بمصل الإبل بالعمر خمسة أشهرو بتراكيزه الثلاثة لم يلاحظ وجود أي أختلاف في الهيئة الكروموسومية بينها وبين السيطرة قد يعزى السبب الى ربما عدم احتواء مصل الإبل على مكونات قد تؤدي الى حدوث تغيرات كروموسومية و تركيبية في الخلايا و بالتالي فأنه لم يؤدي الى حدوث تغير في شكل خلايا تلك الخطوط المعاملة بمصل الإبل مقارنة مع السيطرة عند فحصها مجهريا(Freshney,2000ً).

٤-٢ دراسة تأثير مصل الإبل بأعمار و تراكيز مختلفة على أنقسام الخلايا اللمفاوية

أشارت النتائج إلى إن دليل الأنقسام الخلوي و دليل التحسس الخلوي للخلايا اللمفاوية البشرية و المعاملة بأوساط مزودة بتراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة كان مرتفع معنوياً$p<0.01$ مقارنة بالسيطرة (مصل البقري و البلازما البشري) من خلال قراءة الـ MIو BI و لاسيما عند العمر خمسة أشهر و بجميع تراكيزه المتناظرة من مصل البقري و تركيز 20%من سيطرة البلازما البشري . قد يكون ذلك بسبب أحتواء دم الإبل على أعداد كبيرة من الصفيحات الدموية الحاوية على نسبة مرتفعة من حبيبات الفا مقارنةبالصفيحات الدموية لدم الأبقار (Zaidan *et al.*, 2000) و التي تكون مسؤولة عن تحرير العامل(PDGF) عند تجمعها بعملية التخثر Clooting و فصل المصل (McDonald , 2003;Freshney ,2000) وبذلك فمن الممكن ان تكون نسبة هذا العامل مرتفعة في الإبل مقارنة بالأبقار.فضلا عن أن أعداد تلك الصفيحات يكون مرتفع كلما قل عمر الإبل (حسن، ٢٠٠٥) و بالتالي أرتفاع نسبة PDGF عند مثل الإبل بالأعمار الصغيرة (Zaidan *et al.*, 2000) .حيث ان لهذا العامل دور في تحفيز الخلايا المناعية من خلال تأثيرها على خلايا تي اللمفاوية T Lymphocytes بوجودالمحفز(PHA) فيؤدي الى أنتاج الأنترلوكين ٦– (IL-6) في المستنبت و الذي يؤثر بدوره على خلايا بي اللمفاوية B Lymphocytes فيؤدي الى تكاثرها (حيث يعتبر الأنترلوكين ٦– من عوامل نمو الخلايا بي اللمفاوية) . كما يعمل هذا الأنترلوكين على زيادة الفعالية المشطرة لعامل تنخر الورم (Tumer Necrosis Factor - *a* (TNF-*a* و الأنترلوكين ١– (IL-1)على الخلايا التائية اللمفاوية (Daniel *et al*., 1994).

لذا وجد من النتائج عند قراءة الMI و BI للخلايا اللمفاوية النامية في الأوساط الزرعية الحاوية على مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مرتفع معنوياً $P<0.01$عند جميع تراكيزه ويزداد الارتفاع بزيادة التركيز مقارنة بالأعمار الأخرى من مصل الإبل و كذلك مقارنة بالسيطرة.

الأستنتاجات

1. لمصل الإبل القدرة على تنمية الخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية المستخدمة في الدراسة (خط سرطان الحنجرة البشري Hep-2 و خط سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3 و الخط الطبيعي لجنين الجرذ REF).وكذلك الخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية.
2. تأثر الخطوط السرطانية (Hep-2 و AMN-3) و الطبيعي REF بعمر و تركيز مصل الإبل. حيث تنمو الخلايا بصورة أفضل كلما ازداد التركيز و قل عمر الحيوان.
3. الخط الطبيعي REF يحتاج الى فترة نمو طويلة كما ان فترة التضاعف PDT طويلة على عكس الخطوط الأخرى المستخدمة في الدراسة و باستخدام مصل الإبل و السيطرة.
4. أطول فترة لطور Log لوحظت عند الخط السرطاني AMN-3 مقارنة ببيقة الخطوط الأخرى المستخدمة في الدراسة.
5. التركيز 15% من مصل الإبل و بعمر خمسة أشهر كان أفضل التراكيز و الأعمار المستخدمة حيث كانت الخلايا النامية في الأوساط الحاوية عليه لها اقصر فترة لطور Lag و أطول فترة لطور Log و اقل فترة تضاعف PDT مقارنة ببقية التراكيز المستخدمة من مصل الإبل .
6. ليس هناك تأثير ملاحظ لمصل الإبل بجميع اعماره وتراكيزه على اشكال خلايا الخطوط الخلوية المدروسة و لا على الهيئة الكروموسومية . كما لم يؤثر على الهيئة الكروموسومية التركيبية و العددية للخلايا اللمفاوية الطبيعية.

التوصيات

1. دراسة تأثير مصل الإبل بأعمار الصغيرة و تراكيز مختلفة على نمو خلايا الزرع النسيجي الأبتدائي و الزرع العضوي.

2. معرفة النسب الطبيعية لمكونات مصل الإبل العراقية و التي لها تأثير على نمو الخلايا خارج الجسم الحي و مقارنتها بالنسب الموجودة في مصول الحيوانات الأخرى التي لها تأثير على نمو الخلايا، و أمكانية عزلها أو تصنيفها.
3. دراسة تأثير مصل ذكور الإبل بأعمار وتراكيز مختلفة على أنواع أخرى من الخطوط الخلوية و مقارنتها مع الأناث.

المصادر العربية

أبن كثير ،(١٩٦٩). تفسير القران الكريم دار المعرفة .بيروت . لبنان.

أكساد ،(١٩٨٩). الأبل في الجمهورية العراقية. دمشق. سوريا.

الأعظمي، محمد عبد الوهاب شاكر.(٢٠٠٠).دراسة التغيرات الكروموسومية في الأنسان الناتجة من التلوث بالنواتج العرضية للصناعات النفطية.رسالة ماجسير.كلية العلوم.جامعة بغداد.

البطانية ،حميد نايف؛ الحمود، محمد حسن؛ يوسف؛ وليد حميد(٢٠٠٢).علم الغدد الصماء الأهلية للنشر و التوزيع .الطبعة العربية الأولى.

البعلكي، منير (١٩٨٦).قاموس المورد(الطبعة العشرون). دار العلم للملايين.بيروت.

الجشعمي، زبيدة عدنان خضير(٢٠٠٠).دراسة الهيئة الكروموسومية و الخطوط الجلدية لمرضى أبيضاض الدم النخاعيني المزمن في العراق .رسالة ماجستير.كلية التربية_أبن الهيثم_ جامعة بغداد.

الحلي ،زيد عبد المنعم علي(٢٠٠٤).تأثير مستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperus rotundus L* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية.رسالة ماجستير.كلية العلوم- جامعة بغداد.

الشمري ، أحمد مجيدحمزة(٢٠٠٣).دراسة تأثير فايروس النيوكاسل في علاج الأورام السرطانية المغروسة في الفئران.رسالة ماجستر.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

الطائي،فراس صبحي صالح(٢٠٠٣).دراسة مرضية ووراثية خلوية لبعض الأورام الظهارية في جلد الأنسان و الأبقار.رسالة ماجستير.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

العاني،فلاح خليل؛ العباسي،صباح ناجي و الربيعي،عبد الجبار(١٩٩٠).الأبل تربيتها وأمراضها (الطبعة الأولى).وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.جامعة بغداد.

العوامي، عّباد موسى(١٩٨٥). الأبل و الخيل في التأريخ و الحضارة.(الطبعة الأولى).كتاب الشعب. المنشأة العامة للنشر و التوزيع.طرابلس .ليبيا.

المسعودي، هادي رسول حسن(٢٠٠٤).أثر أستخدام الفايبرونكتين في زيادة كفاءة الخلايا البلعمية في التهام طفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania tropica* خارج الجسم. مجلة جامعة كربلاء.٢(٧):٦٦-٧٦.

الندوة العراقية (١٩٨٨). ندوة لتربية و أمراض الأبل .كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

جعفر،سعاد غازي(١٩٩٩).دراسة وراثية خلوية لسرطان الثدي في العراق. رسالة ماجستير. كلية العلوم.جامعة بغداد.

حامد،أحمد بشير(٢٠٠٣).دراسة تكرار فقدان كروموسوم Y في بعض الأمراض السرطانية و المسنين. رسالة ماجستير.كلية العلوم.الجامعة المستنصرية.

حتي،يوسف (٢٠٠٤).قاموس حتي الطبي.مكتبة لبنان.بيروت.

حسن ،عبد الصمد عليوي(٢٠٠٥).الاتزان المائي في الجمال دراسة فسيولوجية_نسيجية.رسالة دكتوراه.كلية العلوم.جامعة بابل.

حسون،طارق مسلم ؛ خورشيد؛ نجوى ؛ ونيس، سهيلة و عبد الرحمن،محمد (١٩٩٠).التكاثر في الجمال و الجاموس.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.دار الكتب للطباعة و الشر.جامعة الموصل.

خلف،سمير مشرف(٢٠٠٥).دراسة دمية وراثية_خلوية على عمال معمل الزجاج في الرمادي رسالة ماجستير.كلية التربية.جامعة الأنبار.

زايد،عبد الله ؛ غادري،غسان و شريحة،عاشور(١٩٩١).الأبل في الوطن العربي.الطبعة الأولى جامعة عمر المختارالبيضاء.دار الكتب الوطنية.المركز البيلوغرافي الوطني.وحدة الأيداع القانوني.

علي،آمال محمد(٢٠٠٤).دراسة وراثية خلوية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرةHep-2 . رسالة ماجستير.كاية العلوم.جامعة بغداد.

محي الدين، خير الدين و يوسف،وليد حميد(١٩٩٠).علم الفسلجة البيطرية.(الطبعة الأولى).وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.جامعة بغداد.

منهوب، صفاء كاطع(٢٠٠١).دراسة مرضية وراثية خلوية لأورام القولون و المستقيم في الأنسان.رسالة ماجستير.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

وردة،محمد فاضل(١٩٩٦).أهمية الإبل في الوطن العربي.شبكة بحوث و تطوير الأبل.دمشق.سوريا.

المصادر الأجنبية

Abdel-Gadir,S.E.;Wahabi,A.&Idris,O.M.(1979).A note on hematology of adult sudanese camels,1FS.Int.Symposium on camelus , Sudan .348-354.

Al-Dugham,A.M. (2004).Some Endotoxin –induced clinical and biochemical changes in plasma of camelus (*Camelus dromedaries*) Vet.Res.Commun.28: 711-718.

Ali,Y.(2000). The role of serum on the adhesion of cultured Chines Hamster Lung (CHL) cellTr. J. of Medical Scie. 28:383-387.

AL-Qarawi,A.A.;Abdel- Rahman ,H.A.& EL- Mougy,S.A.(2002). ActivitiesDiagnostic Enzymes and lipid content in camel (*Camelus dromedarius*).ACTA.Vet.BRNO.71:19-22.

Al-Shemary,A.M.;Dawood,K.R.& Salmman,S.D(2005).Establishment & Characterization of Murine Embryo Fibroblast & it's application for medical research .Iraqi J.of Cancer1.under publication.

Al-sultan,S.I.(2003). Studies of some normal biochemical Parameters of Majaheem breed of camel (*Camelus dromedaries*) in Saudi Arabia.J. Animal & Vet.Adva.2:646-647.

Azouz,A. ; Ateia,M.Z.;Shawky,H.;Zakaria,A.D.&Farahat,A.A.(1992). Hormonal changes during rutting & non-breding season in dromedary camels .proc.1st camel conf.UAE.

Bacquer,O.L.; Laboisse,C.;Darmaun,D.(2002). Glutamine Preserves protein synthesis & paracellular premeability in Caco-2 cell submitted to (Luminal fasting) .Am.J.Physial.Gastrointes.Liver Physiol 285: G128-G136.

Banai,S.; Wolf,Y.&Golomb,G.(1998).PDGF-Receptor Tyrosine Kinase blocker AG1295 selectively ahenuates smooth muscle cell growth *in vitro* & reduces Neointimal formation after ballon angioplasty in swine. America.heart.asso.Inc.97:1960-1969.

Bengoumi,M.; Moutaouaki,F.; Farge,F & Faye,B.(1999).Thyroidal

status of the dromedary camel (*Camelus dromedaries*) .Effect of some physiology factor.J.Camel pract.&Res.6:41-43.

Benvenuti,S;Cramer,R.;Quinn,C.C.;Bruce,J.;Zvelebil,M.;Corless,S.Bond,J;Yang,A.;Hockfield,S.;Burlingame,A.L.;Waterfield,M.D.& Jat,P.S.(2002). Differential proteome Analysis of Replicative senescence in Rat Embryo Fibro .Molecu.Cell.Proteomics .1:280-292.

Bocanera,L.B.;Aphalo,P.P.;Pisarev ,M.A.;Gartner,R.;Silberschmidt ,D., Jurenal,G.J.;Beraldi,G.& Karawiec,L.(1999). Presence of a soluble inhibiter of thyroid iodination in primary cultures of thyroid cells.Eur.J.Endo.141: 55-60.

Boyce,S.T.& Hansbrough,J.(1988). Biologic attachment ,growth & differentiation of cultured human epidermal keratinocytes an agraftablecollagen & chondroitin-6-sulfate substrate.Surge.103:421-431.

Bullock, J.; Boyle , J. & Wang, M.(1994). Physiology (3rd ed.).Mass. Pub.Co. Eygpet.

Burton,N.M. ; Vierck, J. ; Krabbenhoft, L.; Bryne, K. & Dodson, M. V.(2000).Methods for animal stallite cell culture under variety of conditions . Method, cell. Sci.22: 51-61.

Butler,M.(1996). Animal cell culture & technology ,the basics .IRL press atoxford Uni.press Inc.New York.

Carlo, E.A. ; Van de Valk, J.B.;Stafleu, F.R. & Baumons, V.(2004). The use of Fetal Bovine Serum . Ethical or Scientific problem.Johns Hopkin center . Methelands.

Carrel, A.(1912).On the permanent life of tissues outside of the organism. J.Exp.Med.15:516-528.cited by Reedy,2000.

Caspersson,T.;deLachapelle,A.;Schroder,J &Zech,L.(1972). Quinacrine fluorescence of metaphase chromosomes.Identical pattern in different tissues.Exp.cell.Res.72:56-59.

Chae,H.T.;Chae,S.W;Kang,J.S.;Bang,B.G.;Cho,S.B.;Park,R.K.;So,H.

S.&Kim,Y.K.(2000). Dexamethasone suppresses TNF-*a* induced apoptosis in osteoblasts : possible role for cermide.Endocrinol. 141:2904-2913.

Chang,H.Y.;Sneddon,J.B.;Ali,Z.;A;Sood,R.;West,R.B.;Montgomery,K .&Brown,P.O.(2004).Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression : Similarities between Tumors and Wounds.Bio.2:1-9.

Chaudhary,Z.;Iqbal,J.& Rashid,J.(2003).Serum protein electrophoretic pattern in young & adult camels.Aus.Vet.J.81:625-626.

Chino, M.R; Zgleszewski,S.E.; Cilley, R.E. & Krummet, T.M. (2000).Dexamethasone enhances rasrecision gene expression in cultured Murine fetal lungs: role in development.Am.J. Physiol. Lung.Mol.279:L312-L318.

Christenson,J.T. ; Vala, D.; Sierra, J. ; Beghetti, M.; Kalangos, A.(2004). Bloodgroup incompatibility & accelerated Homograft fibrocalcification.J.Thorasc Cardio-Vasc.Surg.127:242-250.

Daniel,P.S.; Abba,I.T.; Tristroma,G.P(1994). Basic & Clinical Immunology.Lang Medical book. Mc Graw-Hill Comp .USA.

Darling, D.C. & Morgan, S.J.(1994). Animal cells culture and media .John wiley & Sons. Itd.U.K.

Daryl,K.G.;Peter,A.M.;Victor,W.R.;(2003). Harper's illustrated Biochmistry .Mc Graw-Hill Comp.USA.

Doyle,A.& Griffiths, J.B.(2000).Cell & tissue culture for medical research.John wiley & Sons. Itd.U.K.

Ducluzeau,P.H.;Fletcher,L.M.;Vidal,H.;Laville,M.andTavare,J.M. (2002). Molecular Mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in cells.Diabe.Metab.paris.28:85-92

Dulbecco,R.& Freeman, G.(1959). Plaque formation by the polyoma virus. Virology.8:396-397.

Duncan,M.R.;Ken,S.F.;Susan,A.;Shawn,W.;Helen,K.;Xinfan,H.& Gary,R.G.(1999). Connect tissue factor mediates transforming growth factor *B* collagen synthesis : down-regulation by cAMP. The Faseb J.13:1774-1786.

Eagles,H.(1955).Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.Sci. 122:501-504.

Eagles,H.(1959).Amino acid metabolism in mammalian cell cultures .Sci .130:432.

Earle,W.R.; Schilling, E.L. ; Stark, T.H. ; Straus, N.P. ; Brown, M.F. ; schelton, E.(1943). Production of malignancy *in vitro*. The mous fibroblast cultures & changes seen in the living cells.J.Nat. Cancer. Inst.4:165-212.

Easty,D.M.;Easty,G.C.;Carter,R.L.;Monaghan,P.&Bultler,L.J.(1981). Ten human carcinoma cell lines derived from Sequamous carcinomas of the head & neck.Br.J.Cancer.43:772-785.

Emmison,N.;Agius,L.&Zammit,V.A.(1999).Regulation of fatty acid metabolism & gluconegensis by growth hormone & sheep insulin in .hepatocytes cultures effect of lactation & pregnancy. Biochem. J.15:21-26.

Faye, B. & Bengoumi, M. (1997). Comparative study of trace element status in camel & cow .J.Camel practice 7 Res.4:213-215.

Folkman,J.&Haudenschild,C.(1980). Angogensis *in vitro* nature. 288:551-556.

Ford,C.E.& Hamerton,J.L.(1956). The chromosomes of man nature.178:1020-1023.

Frederik,M.A.;Brent,R.;Kingston,R.E.;Moor,R.E.;Seidman,J.G.; Smith,J.A.&Struhl,K.(1993).Current protocols in molecular biology.*Vol* I & II, Jhn Wiley &Sons prees..New york

Freshney, R.I.(1995). Animal cell culture, Apractical approach (2nd ed.). Oxford Univ. press,Inc. oxford. New york.

Freshney, R.I.(2000). Culture of animal cells. Amanual for basic technique.(3rd ed.) wiley-liss.A John wiley 7 sons. Inc. Pub. New york.

Gallico, G.G.(1990). Bioligic skin substitues .Clin. Plas.Surg.17:519-526.

Gey, G.O. ;Coffman, W.D.; Kubicek,M.T.(1952).Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma & normal epithel. .Cancer Res.12:364-365.

Giard, D.J.(1988). A cell attachment assay for use in the standardization of serum products cell culture center.16:147-155.

Goddard, I.; Bouras, M.; Keramidas, M.; Hendrick, J.C.; Feige, J.J. &Benahmed, M.(2000).Transforming growth facter-beta receptor types I & II in cultured procine leydig cells : expression & hormonal regulation .Endocrin.141:2068-2074.

Green, H. ; Kehinde, O. & Thomas, J.(1979). Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting ,Proc.Natl. Acad. Sci.U.S.A.76:5665-5668.

Ham,RG(1965). Clonal growth of mammalian cell in achemichally defined synthetic medium .procc.Natl.Acad.Sci.USA.53:288.

Hamerton,J.L.(1971). HumanCytogenetic .Generacytogenetics Acadmic Press Vol.I..NewYork.

Haroun,E.M.;Mahoud,O.M.;Magzoub,M.;AbdeHumid,Y&Omar,O.H . (1996) The haematological & biochemical of the gastro intestinal nematodes prevalent in camels.(*Camelus dromedaries*) in central Saudia Arabia.Vet.Res.Commum.20:255-264.

Harris,C.C.;Trump,B.F. &Stoner,G.D(1981). Normal Human Tissue and Cell culture.Methods in cell Biology.Academic press.,New York.

Harrison,R.(1907). Observation on the living developing nerve fibers,Proc.Soc.Exp.Biol.Med.4:140-143.Cited by Reedy,2000.

Hartmann,W.;Koch,A.;Brune,H.;Waha,A;Schuller,U.;Dani,I;Denkha, D.;Langmann,W.;Bode,V.;Wiestler,O.D.;Schilling,K.&Pietsch,T. (2005). Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulla blastoma & it's cerebellar precursor cells.Am.J..Pathol.166:1153-1162.

Hayflick,L&Moorehead,P.(1961). The serial cultivation of human diploid cell strains.Exp.cell.Res.25:585-621.

Heldin,H.C&Westermark,B.(2000).Mechanism of action &role of Platelets-Derived growth facter.Physiol.Rev.79:1283-1316.

Hewlett,G.(1991).Cytotechnology.5:3-14.Cited by (Freshney,1995)

Hickmann,G.P;Roberts,L.S.;Larson,A.(1998). Biology of animals(7th ed).Boston.McGraw-Hill.Comp.,Inc.

Higgin,A.J.(1986). The camel in health & disease (1st ed).Bailliere.Tindall.

Hillis,D.M.;Mortize,C;Mable,B.K.(1996). Molecular systematic.(2nd ed). Sundeland ,Massachusetts,Sinaver.Associates,Inc.

Hsu,T.C.(1952).Mammalian Chromosomes *In vitro*.I.The karyotype of man.J.Hered.43:172.

Hsu,T.C.(1979). Human and Mammalian cytogenetic.Pub.springe verlag Inc.Newyork.

Hynes,R.O.(1992). Integrins:versatility,modulation& signaling in cell adhesion . cell.J. 69:11-25.

ISCN(1995). An international system for human cytogenetic nomenclature by Felix Mitelman.S.Karder pupils.,Inc.Farmingto, CT06085, USA.

Jan,V.V.;Mellor,D.J. & Baumans,V.(2003). Fetal Bovine serum:human blood Collection&alternatives Toxicology *In vitro* .Natio. utrecht.Inst. Stockholm.

Jennifer,S.T.(2000). Overview of plasma proteins & protein Electrophoressis.(5th ed).Schalms'.Vet.Haem.Lippincott Williams & wilkins. New York.

Johnson,W.H.;Delanney,C.E.;Williams,L.E.;Cole,E.A.(1969). Principles of zoology (1st ed).Holt Rinehart & Winston.Inc.New York.

Jorge,J.& Yunis,M.D.(1974).human chromosome methodology.(2nd ed).Acad. Press.New York.

Kaneko,J.J.(1997). Serum proteins & the Dysproteinemias. (5thed)Clin.Biochem.Domes.Animal.Academic press.New York.

Keay,G.& Doxey,D.L.(1982). Species characteristic of serum proteins demonstrated after agarose gel electrophoresis. Vet.Res. Commun. 5:263-270.

Kohler,G& Milstein,C.(1975). Continuous cultures of fused cells , Secreting antibody of predefined specifity, Nature.256:492-497.

Kotecki, M.; Reddy,P.S. & Cochran,B.H. (1999). Isolation & characterization Of a near – haploid human cell line. Experimental Cell Res.,252:273-280.

Lambillotte,C.; Gilon,P.& Henquin,j.(2002). Direct Glucocorticoid inhibition of insulin secretion .An *in vitro* study of Dexamethason effect in Mouse Islets. J.Clin.Invest., Inc.99:997-998

Leibovitz ,A.(1963). The growth & Maintenance of tissue- cell cultures in free exchange with the atmosphere.Am.J.Hyg.78:173-180.

Lejeune,J; Gautier, M.& Turpin,R.(1959). Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongolies.Compt.Rend.248:1721-1722.

Lindl, T. & Bauer, J.(1989). Zell-und Gewebekultur.G.Fischer Verlage. Stuttagart.

Liu,Z.P.(2003). Studies on the Haematology & Trace element status of adult Bactrian cmels (*Camelus bactrian*) in China.Vet. Res. Commum. 27:397-405.

Luisier, G.L.; Urner, F. & Denny, S.(2002). Facilited glucose transporters Play acrucial throughout mouse preimplantation embryo development .HumanRep.16:1229-1236.

Macky,A.M.(2000).Tissue engineering .Natl.Bio.18:56-58.

Maloiy,G.M. & Clemens, E.T.(1988). Colonic absorption & secretion of electrolyets as seen in five species of East Africans herbivorous mammals .Compar.Biochem.Physiol. 67A:21-25.

Manefield,G.W. & Tinson,A.H.(1996).*Camelus*: A compendium Sydney Uni. Vet.Sci.Australia.

Mao,J;Wu,C.;Smith,MF.;Mc.Cauley,T.C.;Cantley,T.C.;Prather,R.S.; Didion,B.A.&Day,B.N.(2003). Effect of culture media, Serum type & various concentration of follicle.stimulating hormone on porcine preantral follicular development & Antrum formation *In vitro* . Bio.Prod.67:1197-1203.

Mather,J.P. & Roberts,P.E (1998). Introduction to cell & tissue culture, Theory & Technique .Plenum Press.New York.

McDonald, L.E.(2003). Veterinary Endocrinology & Reproduction .lea &Febiger , Philadilphia.USA.

Merril , C.R. (1971). Bacterial Virus gene expression in human cells .Nature.233:398-400.

Michael,H.I.; Kohlhuber,F.; Schlosser, I.; Dieter,H.;Bernhard,L.& Eick,D.(2001).MYC/MaX/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles.EMBO.J.2:1125-1132.

Mohamed , H.A.& Hussein , A.N. (1999). Studies on normal haematological & Serum biochemical values of the (Hijin) racing camels(*Camelus dromedaries*) in Kuwait.Vet.Res.Commun.23: 241-248.

Moor, G.E.; Gerner , R. E.; Franklin, H.A.(1967). Culture of normal Leuckocytes .J.Am..Med.Assoc.199:519-524.

Moore,A.E.;Sabachewsky,L.;Toolan,H.A.(1995). Culture characteristics of four prermanent lines of human cancer cell .Cancer Res.,15:598-606.

Moorhead,P.S.;Nowell,P.C.;Mellman,W.J.;Battips,D.M.&Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leuckocytes cultured from human peripheral blood.Exp.Cell.Res.20:613-616.

Morgan, J.G. ; Motton , H. J. ; Parker, R. C. (1950). Nutriton of animal cells in tissue culture . I. Initial studies on a synthetic medium.Proc. Soc.Exp.Bio.73:4.

Morton, H. J. (1970).A Survey of commercially available tissue culture media.*In vitro* 6:89-108.

Mosesson,W.M.& Umfleet,R.A.(1970). The cold insoluble globulin of human plasma .Purification primary characterization & Relationship to fibrinogen & other cold in soluble fraction components.J.Bioch.254:5728-5736.

Mosher,D.F.(1984). Physiological of fibronectine .Ann.Rev.Med.35:561-575.

Nazifi,S.; Razakhani , A. ; Gheisari, H.R.(1998).Physical , Biochmical & Cytologic properties of blood & synovial fluid in clinically normal adult camel (*Camelus dromedarius*). Zentralbl.Vet.Med.A.45:155-160.

Nazifi, S. ; Gheisari, H.R.;Poorkabir, M.A.; Saadatfar, S.(2000). Serum lipid & lipoproteins in clinically healthy male camels (*Camelus dromedaries*).Vet.Res.Commun.24:527-531.

Niedzwiedzka,A.(2000). Insulin-like growth facter I(Somatomedin C) & it's binding protein 1 & 3 in children with special consideration of diabetes .Endog. Diabe.6:51-58.

Nowak,R.M.(1999). Walker's mammals of the word .(6^{th} ed).John.Hopkins press.Baltimore.

Nowell,P.C.(1960). Phytohaemagglutinin . An initiator of mitosis in cultures of normal human Leuckocytes .Cancer Res.20:462-466.

Nowell,P.C. & Hungerford , D.A.(1960).A Minute chromosome in human chronic granylocytic Leukaemia.Sci.132:1497.

Obera,J.A.;Gutierrez,C.Morales,m.;Montel,A.&Montoya,J.A.(2001).A ssessment of blood glutathione peroxidase activity in the dromedary camel .Vet.Res.32:185-191.

Ottosson, M. ; Peter, L. & Eden, S.(2000). Effect of cortisol & Growth hormone on lipolysis in human Adipose tissue.J.Clin.Endocrin & Metbol.85:799-803.

Painter,T.S.(1923). Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man.J.Exp.Zool.37:291-336. Cited by : Hsu.1979.

Pan,S; Zhang,X; Wang, F.; Zhao, W.; Li,C. & Chen, Y. (1998). Detection of HEP-2 & Hepatoma cell Line chromosomal aberration by using fluorescence in Situ-hybridizations .Zhonghua Yi xue yi chuan xue za zhi , Abstract.

Pfragner,R.& Freshney,R.I.(2004). Culture of human tumor cellsWiley-Liss., A John Wiley & Sons, Inc. Pup.New York.

Powell,A.J.; Darman, A.J. ; Gonos, E.S. ; Lam, E.w.; Peden, K.W. & Jat, P.S (1999). Different functions are required for intiation & maintenance of immortazation of rat embryo fibroblasts by SV40T antigen .Oncogen.18:7343-7350.

Puck, T. & Marcus, P.(1955). Arapid method for viable cell titration and clone production with Hela cells in tissue culture.The use of X-irradiated cells to supply-conditioning factors.Proc.Natl.Acrod. Sci.U.S.A.41:432-437.

Ramadan,R.O.(1994). Surgery & Radiology of the Dromedary.(1st ed.).King.faisal Univer.K.S.A.

Raymond,W.&Ruddon,M.D.(1981). Cancerbiology.Oxford.Univer.Press. Oxford.

Reedy,S.E. ; Powell, D.M. ; Williams , N.M. ; Dodson, M.V. & Fitzgerald, B.P. (2000). Thoughts on the source of tissue on subsequent cell culture success. Methodes cell Sci.22:29-32.

Renata,C.; P.; Deena, D. & Ernesto,C.(2000). Transcriptional regulation of continues tissue growth factor by cortisol in osteoblasts.Am.J. PhysioEndocrinol. Metab.. 279:EM570-EM576.

Roony, D. E. & Czepulkowski, B. H.(1992). Human cytogenetic . Appractical approach.Vol.I Oxford Univer. Press.Oxford.

Rosenfeld, M.A. ; Yoshmura, K. & Trapnell, B.C.(1992).*In vitro* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium cell.68:143-155.

Sanford, K. ; Erale, W. & Likely , G.(1948). The growth *In vitro* of single isolated tissue cells. J.Natl.Cancer.Inst.9:229-246.

Salman, R. & Afzal, M.(2004). Seasonal variations in hematological & Serum biochemical parameters in racing camels.Camel.Sci. U.A.E. 1:63-65.

Sarwar, A. & Majeed , M.A. (1997). Interrelation ships between 30 parameters of blood in normal one – humped camel in summer .J.Camel.Practice. & Res.4:35-39.

Schroter,**R.C.;Zine,F.R.;Brain,J.P.&Robert,S.D.(1990).**(Infuence of dehydration and watering on camel red cell size:a scanning electron microscopic study.Respir.Physiol.81:381-390.

Sghiri,H. (2001). Seasonal effects on fertility & Ovarian follicular growth and Maturation in camels*(Camelus dromedaris*). Anim.Reprod. Sci. 55:223-237.*s*

Shao, E.O. ; Blagoev, B.; Kratchmarova,I.; Kristensen, D.B.; Streen, H.; Pandey, A. & mann, M. (2002).Stable Isotope labeling by Amino acids in cell culture SILAC.,as asimple & approach to expression proteomics .Molecu.& Cell. Proteomica.3:376-386.

Shringi, B. N. (2001). Differential leucocytic count in the peripheral blood of camel (*Camelus dromedaries*) Indian.j.Health.41:24-28.

Shubber,E.K. & Al-Allak, B.M.(1989). Spontanous chromosomal aberration & SCE in human lymphocytes effect of cultuer condition .Nuclrus.22:92-98.

Sigma-Aldrich comp.(2005). Fundamental techniques in cell culture .A laboratory Hand book . Sigma- Aldrich, Inc.U.S.A.

Sinha, M.K. ; Buchaman, C.; Raineri, M.; Khazanie, P. ; Atkinson, S.; DiMarchi, R. & Caro, J.F. (1990).IGF-II receptor & IGF-II stimulated glucose transport in human fat cells .Am.J.Physiol. 258:E534-542.

Speirs,V.; Ray, K.P. Freshney, R .I.(1991). Paracrine control of differentiation in the alveolar carcinoma.Br.J.Carcer.64:693-699.

Stanely, V.(1985).Bacterian Camels.Proc.Roy.Soc.Lond.B.B.Sci.256:1-6.

Stevens, A.& Lowe, J. S.(1991). Human Histology (2nd ed).The C.V.Mosby. Co.

Strieter, R.M. ; Belperio, J. A. & Keane, M. P. (2002). Cytokines in innat host defense in the Lung. J. Clin. Invest.109:699-705.

Sultan, R. & Haagsman, P.H.(2001).Species – specific primary cell cultures . A reaserch tool in veterinary scinces.J.Vet. Sci.1:1-7.

Sutherland, F.W. ; Mayer, J. E. (2003). Tissue engineering for Cardic surgery .Mc.Graw.Hill.New York.

Tang, S. : Leung, T.C. ; Abe, K.S. ; Chan, K.W.; Ychan, L.Y.; Chan, T.M. & Lai, K.N.(2003). Albumin stimulates 1L-8 expression in proximal cell *In vitro* Clin.Inveat.111:515-527.

Thompson, B.; Johnson, K.; Fujmoto, B. & Barnett, B(2002).Serum alternative to fetal bovine serum in cell culture .Hyclone.A pre Biol.Sci.4:90-93.

Tibary,A.(1997). Theriogenology in Camelidae Anatomy , Physiology, Pathology & artifical Breeding Abu Dhabi Prin & Publi.com.U.A.E.

Tjio, J.H & Levan, A.(1956). The chromosome of number of man. Hereditas.42:1-6.

Toolan,H.A.;(1954). Transplantable human neoplasm maintained in cortisone treated laboratory animals:H.S.I.; HEP-1;HEP-2;HEP-3 and Hemb,Rh=1.Cancer Res.,14:660-702.

Traxinger, R.R. & Marshal, S. (1989). Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transport system .J.Biol.chem.264:20910-20916.

Verma, R.S. & Babu, A.(1989). Human chromosomes .Manual of basic techniques.(1st ed)pergamon Press.Inc.,New York.

Vincent,T.D.; Samuel,H.; Steven,A.R.(1982). Principles & Practic of Oncology.J.B.Lippincott Comp.Philadelphia.Toronto.

Warda, M.& Zeisig, K.(2000). Phospholipid & fatty acid –compostion in the erythocytes membrane of the one-humped camel (*Camelus dromedaries*) & it's influence on vesicle properties prepared from these Lipids.Dtsch.Wochenschr.107:368-373.

Wensvoort, J.; Kyle,D.J.; Orskov,E.R. & Bourke,D.A.(2004). Biochemical Adaptation of camelids during fasting.J.Camel.Sci.1:71-75.

Wernery,U & Kaaden,O.R.(1995). Infectious diseases of camelids.Black well.wissen schafts-verlag,Berlin.

Wernery,V.;Fowler,M.E.& Wernery,R.(1999). Color Atlas of Camelid Hematology .Black well wissens chafts. Verlag Berlin.Germany.

Yaseen,N.Y.(1990). Cytogenetic study on human colorectal cancer cell.*Ph.D thesis .Universty of Sheffield*.

Yassen,N.Y. ; Tawfiq,M.S. ; Hamadi , A.A. ; Estivan A.G. (1998). Cytogenetic studies on patient with chronic mylocytic leukemia .Med.J.Tikrit Uni.4:5

Yaseen,N.Y. ; Tawfiq, M.S.;Shaker,A.A. & Mutasher, S.M.(1999). Chromosomal study on peripheral blood lymphocytes by using human plasma in culture media.J.Nahrin uni.3:167-174.

Yashwat,G.S.(2000). Structure of blood cells on the dromedary camel.Vet.Res.214:215-216.

Zhang,L.;Yamane,T.;Satoh,E.;Amagasaki,K.;Kawataki,T.;Asahara,T. ;Furuya,K.Nukui,H. & Naganuma,H.(2005). Establishment and partial charaterization of five malignant glioma cell lines.Neuropathol.25:136-143.

Zidan,M.;Kassem,A.& Pabst,R.(2000). Megakaryocytes & platelets in the spleen of the dromedary camel(*Camelus dromedarius*) .Embryol. 29:221-224.

الملحق(1) يوضح مكونات الوسط الزرعي (RPMI-1640)حسب(Sigma-2005).

المكونات	النسبة ملغم /لتر
Amino Acids	
L-arginine (free base)	200
L-asparagine	50
L-aspartic acid	20
L-cystine	50
L-glutamic acid	20
L-glutamine	300
Glycine	10
L-histidine (free base)	15
L-hydroxy-proline	20
L-isoleucine	50
L-leucine	50
L-lysine Hcl	40
L-methionine	15
L-phenylalanine	15
L-proline	20
L-serine	30
L-theronine	20
L-tyrptophan	5
L-tyrosine	20
L-valine	20
Vitamins	
Biotin	0.200
D-Ca pantothenate	0.250
Choline chloride	3
Folic acid	1
i-inositol	35
Nicotinnamide	1
Riboflavin	0.20
Thiamin Hcl	1
Pyridoxine Hcl	1
Para amino-benzoic acid	1
Inorganic Salts	
KCL	400
$MgSo_4$-$7H_2O$	100

NaCL	6
$NaHCO_3$	2.200
Na_2HPO_4	1.512
Other component	
D-glucose	2
Phenol red	5
Glutathione (reduced)	1
CO_2 (Gas phase)	%5

الملحق (2) بعض مكونات المصل الضرورية لبقاء و نمو الخلايا خارج الجسم الحي *In vitro* حسب (Freshney ,2000)

▪ **البر وتينات** **Proteins**
فايبرونكتين Fibronectine
a_2 – Macroglobulin كلوبيولين – ألفا 2
Fetuin فيتوين

ترانسفرين Transferrin	
▪ **عوامل النمو** **Growth factor**	
العوامل الشبيه بالأنسولين الأول و الثاني IGF –1 ,2	
السوماتومدين A و C	Somatomedin A & C
عوامل النمو المشتقة من الصفائح الدموية	Platelets Derived Growth Factor (PDGF)
عوامل نمو البشرة	Epidermal Growth Factor (EGF)
عوامل نمو الأورمات الليفية	Fibroblasts Growth Factor (FGF)
عوامل نمو الخلايا الأندوثيلية	Endothelial Cell Growth Factor(ECGF)
▪ **الأمينات** **Amines**	
الحوامض الأمينية	Amino acids
الأمينات المتعددة (السبيرمين و السبيرميدين)	Poly amines (Spermine , Spermidine)
▪ **البيبتيدات** **Peptides**	
الكلوتاثيون Glutathion	
▪ **الدهون** **Lipids**	
حامض لينوليك	Linoleic acid
الدهون الفسفورية	Phospholipids

الملحق (3) يبين جانب من المكونات المهمة لمصل جنين الأبقار حسب (Lindl & Bauer ,1989).

المكونات	معدل تركيزه / لتر
Na^{+}	137 ملي مكافئ
K^{+}	11 ملي مكافئ
CL^{-}	103 ملي مكافئ
Fe^{-2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{-2}, Co^{-2}, Vo^{-3} $MO_7O_{24}^{-6}$	مايكروغرام-نانوغرام
SeO_3^{-2}	26 مايكروغرام
Ca^{+2}	135 ملغم
الفوسفات الغير عضوية Inorganic phosphate	100ملغم
كلكوزGlucose	1250 ملغم
نيتروجين (يوريا)nitrogen, urea	160 ملغم
البروتين الكلي total protein	38 غم
الألبومين Albumin	23 غم
ألفا$_2$ – كلوبيولين a_2-Macroglobulin	3 غم
فايبرونكتين Fibronectin	35 ملغم
حامض اليوريك Uric acid	29 ملغم
كريا تنين Creatinine	31 ملغم
خضاب الدم Hemoglobin	113 ملغم
بليروبين الكلي total bilirubin	4 ملغم
أنزيم Alkaline phosphatase	225 وحدة
أنزيم Lactate dehydrogenase	860 وحدة
الأنسولين Insulin	0.4 مايكروغرام
الهرمون المحفز للدرقية TSH	1.2 مايكروغرام
الهرمون المحفز للجريبات FSH	9.5 مايكروغرام
هرمون النمو البقري Bovine growth hormones	39 مايكروغرام
بروﻻكتين Prolactine	17 مايكروغرام
هرمون ثايرونين ثلاثي اليود tri iodothyronine	1.2 مايكروغرام
كوليسترول Cholesterol	310 مايكروغرام

كورتيزون Cortisone	0.5	مايكروغرام
التستستيرون Testosterone	0.4	مايكروغرام
البروجستيرون Progesterone	0.8	نانوغرام
بروستوكلاندين –E	6	مايكروغرام
فيتامين A	90	مايكروغرام
فيتامين E	1	ملغم

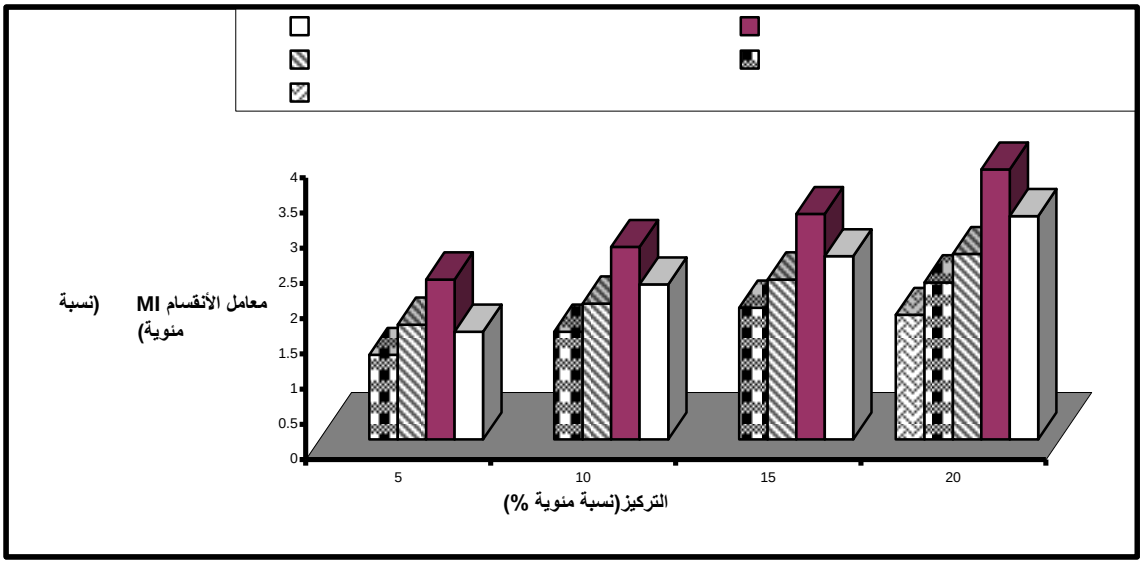
الملحق(4) مكونات بلازما الجمل ذي السنام الواحد البالغ المثبة من قبل عدة باحثين

المكونات	النسبة	المصدر
الصوديوم Na^+ (MEq / L)	178	Sarwar & Majeed, 1997 Mohamed & Hussien,1999
البوتاسيوم K^+ (MEq / L)	7.65- 4.1	Sarwar & Majeed, 1997 Mohamed & Hussien,1999
الكلور CL^- (mg/dl)	628	Sarwar & Majeed, 1997

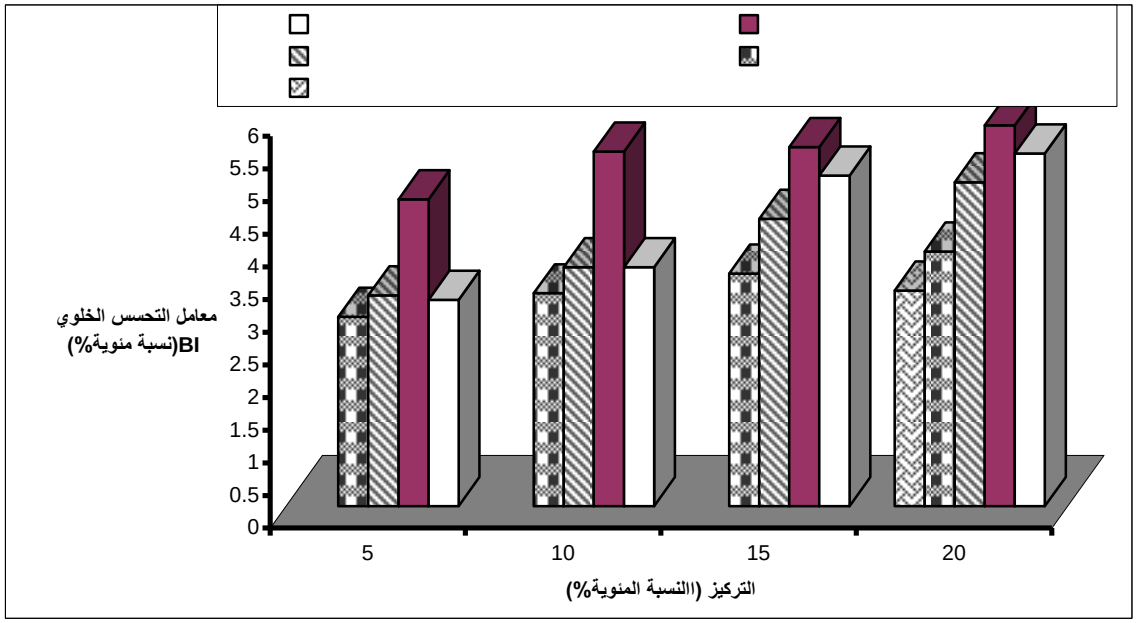
النحاس Cu^{+2} (*M*g / dl)	89.0- 13.0	Faye & Bengoumi, 1997
الخارصين Zn^{+2} (*M*g /dl)	55.0 – 19.0	Faye & Bengoumi, 1997
الحديد Fe (*M*mol /L)	30.43- 10.4	Haroun, 1994 Mohamed & Hussien, 1999
الكاليسوم Ca^{+2} (mg /dl)	7.20	Mohamed & Hussien, 1999 AL-Sultan, 2003
الفوسفات غير العضوية (mg / dl) Inorganic phosphorus	6.8-3.9	Abdel-Gadir *et al* 1977 Mohamed & Hussien , 1999
كلكوز (mg / L) Glucose	1670	Sarwar & Majeed, 1997 Mohammed & Hussien, 1999
اليوريا (mg / dl) Urea	78.31 -18.0 7	Haroun *et al.*, 1996
البروتين الكلي (g/L) Total protein	64.1 - 50.0	Chaudhary *et al.*, 2003

الألبومين (g /L)	35.1 - 27.0	Chaudhary *et al.*, 2003
ألفا $_2$ – كلوبيولين (g/L) a_2-Macroglobulin	4.1-2.4	Chaudhary *et al.*, 2003
كرياتينين (mg/L) Creatinine	5-3	Sarwar & Majeed ,1997 Mohamed & Hussien, 1999
أنزيم (U/ L) Alkaline phosphatase	55.00-33.40	Haroun *et al.*,1996
الكوليسترول (mg/dl) Cholesterol	30_ 26.25	AL- Sultan,. 2003 Sarwar & Majeed, 1997
الثيروكسين -T_3 (ng / dl)	130 -45	Bengoumi *et al.*, 1999 n=5
الكورتيزول (ng/dl) Cortisol	3.60 -0.96	Azouz *et al* . ,1992 n = 5
التستستيرون (ng / dl) Testosterone	2.99 -0.6	Azouze *et al* ., 1992 n = 5

الهرمـون اللـوتيني HL (i.u.ml)	2.98 -0.72	Azouz *et al.*, 1992 n = 5
الهرمون المحفز للجريبات FSH (i.u.ml)	4.62-2.07	Azouz *et al.*, 1992 n = 5

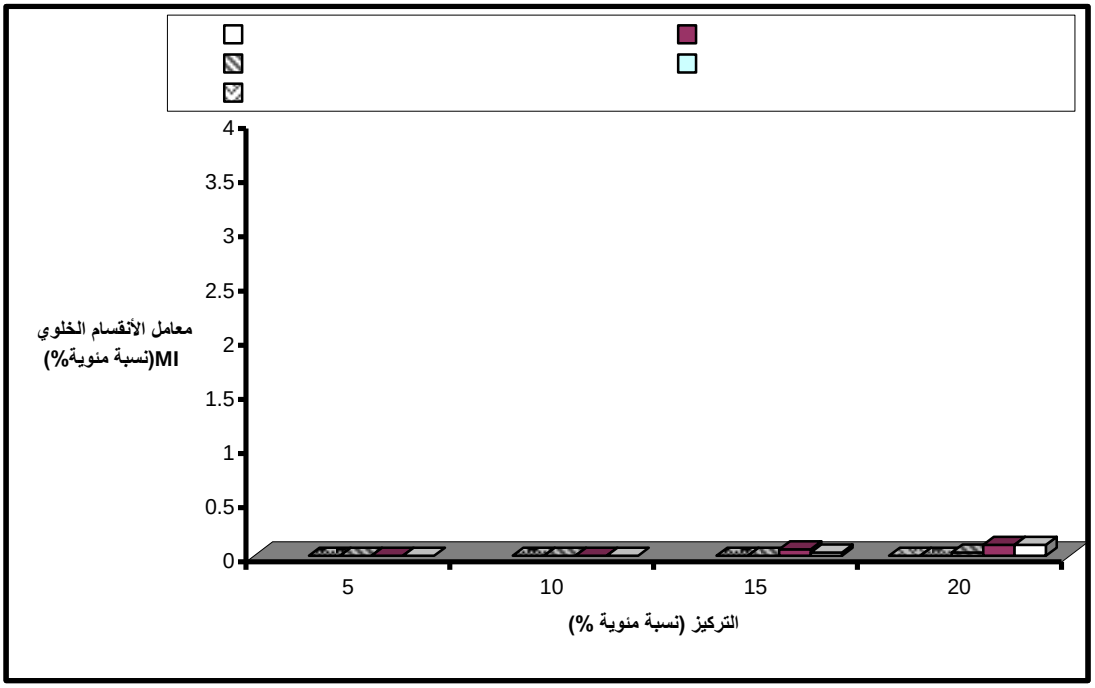


الملحق (5) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بإضافة العامل المشطر

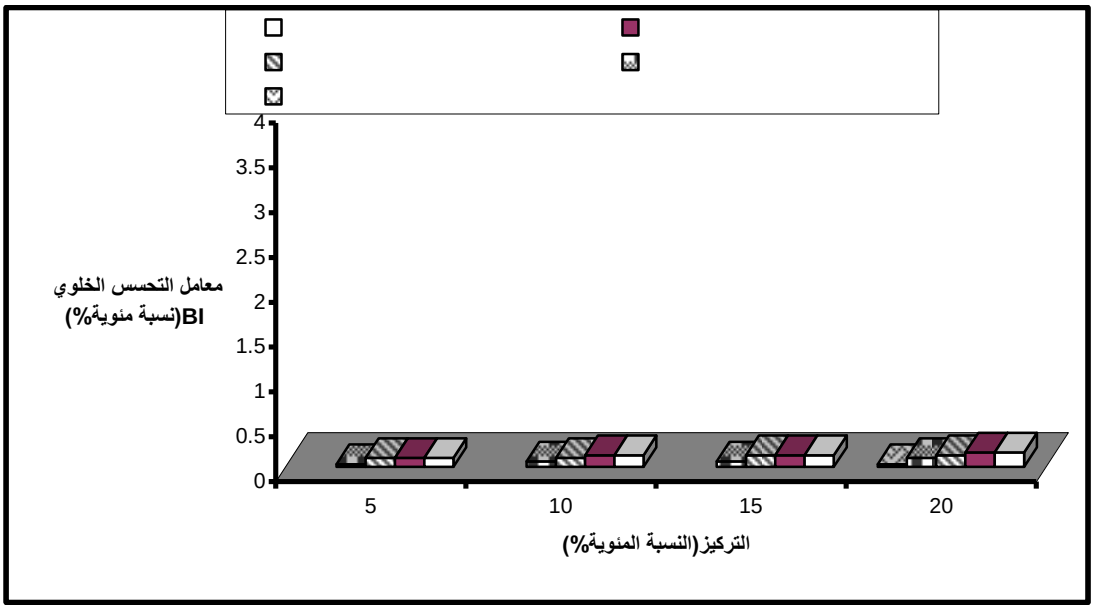


الـ

ململحق (6) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بإضافة العامل المشطر



الملحق (7) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بدون إضافة العامل المشطر



الملحق (8) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصلالإبل و بأعمار مختلفة على معامل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بدون إضافة العامل المشطر

Summary

This study is designed to use Iraqi camel serum instead of fetal calf serum in the tissue culture media.

The study includes the propagation of cancer cell lines Human layrnx carcinoma (Hep-2) , Murine mammary adenocarcinoma (AMN-3) and normal cell line, Rat Embryo Fibroblast (REF) in media which contains three concentrations (5%,10% & 15%) male camel serum in three ages (five months , two years & five years) for seven days. In addition this study is extended to assess the effect of camel serum in growth rate , phases of cancer and normal cell growth curves by studying the period of each of these phases and PDT period in comparison with (5% bovine serum) as a control. Morphological pictures of these cell lines are described in comparison with control. The comparison is also conducted between the three concentrations and the three ages of camel serum . In addition to the Cytogenetic analysis is studied for these cell lines that are treated with three concentrations of camel serum in five month age by studying the Mitotic Index (MI) and Chromosomal profile in comparison with control.

One face of the study found the effect of four concentrations (5%,10%,15%&20%) from camel serum in three ages on the growth of normal human lymphocytes with mitogen (PHA) by measuring the (MI) and Blastocyte Index (BI) in comparison with the same four concentrations of bovine serum and 20% of human plasma(as a control). Comparison is conducted between the four concentrations of camel serum and the ages used in this study.

The results showed:

1. The camel serum can propagate cancer cell lines (Hep-2 , AMN-3) and normal cell line (REF), but less significant $p<0.05$ in comparison with control. 15% of camel serum in five month age showed that the best in propagating cancer and normal cell lines especially REF cell line.
2. The cancer and normal cell growth curves phases and PDT period , they revealed that there are no differences in the phases

of growth curves between the former cell lines that are treated and non treated (control) with the three concentrations of camel serum in three ages , except in the periods of each phase that differed in concentrations and age of camel serum, so the treatments showed that the Lag Phase period is shortened and the Log. phase period is elongated with shorted in PDT period when the concentration of camel serum is increased and age of camel is decreased.also the Lag phase period is longer than control with shorter Log. phase period and longer PDT in comparison with the control.

3. The same Decline phase period showed in most cell lines that are treated with camel serum and with control.The five month age of camel serum in 15% concentration revealed that the nearest one to the control in period of phases and PDT.
4. normal cell line (REF) had the longer Lag phase with the short Log. phase and longer PDT period in comparison with the other cell lines that are used in this study.
5. The effect of four concentrations of camel serum in three ages on growth of human normal lymphocytes with mitogen (PHA) showed that the high significant effect $p<0.01$ in comparison with the control. The result also showed that 20% concentration in five month age is the best for normal lymphocytes growth,
6. Morphological pictures and Chromosomal analysis to the cell lines revealed that no differences between treatment and control. with no effect on the number and structure of chromosomes of human normal lymphocytes.

The use of Iraqi Camel Serum as effective alternative for Fetal Calf Serum in the Tissue Culture Media

A Thesis Submitted By
Sinaa Joubory Mohammod Al-Bazii

To
Th Council of the College of Education ,
University of Karbala
As a
Partial fulfillment of the Requirement for the Degree of Master of Science in
Animal science

1472 *2006*