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{1} لِيَغْفِرَ لَكَ اللَّهُ مَـا تَقَـدَّمَ مِـن ذَنبِـكَ وَمَـا تَـــأَخَّرَ وَيُـــتِمَّ نِعْمَتَـــهُ عَلَيْـــكَ وَيَهْـــدِيَكَ صِـــرَاطًا مُّسْـــتَقِيمًا{2} وَيَنصُـــرَكَ اللَّهُ نَصْرًا عَزِيزًا{3 }

صدق الله العظيم

الفتح{ 1-3}

بسْمِ اللهِ 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
الأستاذ المساعد الدكتور
هادي رسول حسن

المشرف
الأستاذ الدكتور
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 اللهِ 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 6002/5/32 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: / /6002

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم:د.شلال مراد حسين اللطيف

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان:المركز العراقي لبحوث السرطان_جامعة المستنصرية

التاريخ: / /6002

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. سعد حمد عبد

المرتبة العلمية:أستاذ مساعد

العنوان:مدير وحدة أبحاث الرزازة_جامعة كربلاء

التاريخ: / /6002

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:

الاسم: د.هادي رسول حسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان:كلية التربية_جامعة كربلاء
السرطان_جامعة المستنصرية

التاريخ: / /6002

الاسم: د. ناهي يوسف ياسين

المرتبة العلمية:أستاذ

العنوان :مدير المركز العراقي لبحوث

التاريخ: / /6002

مصادقة عمادة كلية التربية/جامعة كربلاء على قرار اللجنة

التوقيع:

الاسم: د.حسين كاظم القطب
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / /6002

بسْمِ اللهِ 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

إلى من غرس في داخلي حب العلم و المعرفة.....

أبي

إلى من حرستني بدعائها وخففت عني بحنانها.....

أمي

إلى سندي وجوهرتي.....

أخي عمار

إلى كنوزي الثمينة و شموعي المنيرة.....

هــادي، وفــاق ,غصــون ، حســن 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 عونـاً لـي ، و اشكر فـي 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 مسانتدهما 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 Mitotic Index (MI) ودليل التحسس الخلوي Blastocyte Index (BI) 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:

1. أن للأوساط الزرعية المزودة بمصل الإبل القدرة على تنمية الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF الاأنه كان أقل كفاءةً من السيطرة المزودة بـ 5% من مصل البقري . و عند المقارنة بين تلك التراكيز لوحظ ان التركيز 15% 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.
2. 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 PDTكلما أزداد تركيز المصل و قل عمر الحيوان .

3. أن طور الـDecline 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% .
4. 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.
5. 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 قدرةً على تنمية الخلايا اللمفاوية عمر الخمسة أشهر وبتركيز 20% .
6. 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(3-1) منحى النمو لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	57
الشكل(3-2) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	57

الشكل(3-3) منحى النمو لخلايا الخط الخلوي Hep-2 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	58
الشكل(3-4) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	58
الشكل(3-5) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي Hep-2 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة سنوات مقارنة بالسيطرة	59
الشكل(3-6) فترة التضاعف لخلايا الخط السرطاني Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة	59
الشكل(3-7) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	62
الشكل(3-8) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	62
الشكل(3-9) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	63
الشكل(3-10) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني-AMN 3المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمرسنتين مقارنة بالسيطرة	63
الشكل(3-11) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمس سنوات مقارنة بالسيطرة	64
الشكل	**الصفحة**
الشكل(3-12) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمرخمس سنوات مقارنة بالسيطرة	64
الشكل(3-13) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	67
الشكل(3-14) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	67
الشكل(3- 15) منحنى لخلايا الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	68
الشكل(3-16) فترة التضاعف لخلايا الخط الخلوي REF المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	68
الشكل(3-17) منحنى النمو لخلايا الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل	69

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	69
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	72
الشكل(3-20) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل (5%،10%و15%) بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة	73
الشكل(3-21) 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	73
الشكل(3-22) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز 15% على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep-2 مقارنة بالسيطرة	74
الشكل(3-23) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة	75
الشكل	**الصفحة**
الشكل(3-24) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة	75
الشكل(3-25) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بالمقارنة مع السيطرة.	76
الشكل(3-26) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز 15% على معدل نمو وأنقسام خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 مقارنة بالسيطرة	76
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	77
الشكل(3-28) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر سنتين على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعيREF مقارنة بالسيطرة	78
الشكل(3-29) تأثير أستخدام ثلاث تراكيز من مصل الإبل بعمر خمس سنوات على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة	78

الشكل(3-30) تأثير معاملة ثلاث أعمار من مصل الإبل بتركيز 15% على معدل نمو و أنقسام خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF مقارنة بالسيطرة	79

قائمة الصور

الصورة	الصفحة
الصورة (3-1) خلايا الخط السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري و المعاملة بالتركيز 15% من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر (CV) (X100).	54
الصورة (3-2) خلايا الخط السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري (السيطرة) (CV) (X100).	54
الصورة (3-3) خلايا الخط السرطاني AMN-3 لسرطان الغدد اللبنية الفأري المعامل بالتركيز 15% من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر (CV) (X100).	54
الصورة(3-4) خلايا الخط السرطاني AMN-3 لسرطان الغدد اللبنية الفأري (السيطرة) (CV) (X100).	54
الصورة	الصفحة
الصورة (3-5) خلايا الخط الطبيعي REF لجنين الجرذ المعامل بالتركيز 15% من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر(CV) (X400) .	54
الصورة (3-6) خلايا الخط الطبيعي REF لجنين الجرذ (السيطرة) (CV) (X400).	54

قائمة الجداول

الجدول	الصفحة
جدول(3-1) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة	70
جدول(3-2) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر سنتين مقارنة بالسيطرة	70
جدول(3-3) فترة التضاعف (PDT) بالساعات لخلايا الخطوط الخلوية الثلاثة والمعاملة بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة سنوات مقارنة بالسيطرة	71
جدول (3-4) معامل الأنقسام الخلوي لخلايا الخط الخلوي Hep-2 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة.	81
جدول (3-5) معامل الأنقسام الخلوي للخط الخلوي السرطاني AMN-3 و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل بعمر خمسة أشهر مقارنة	81

بالسيطرة.	
جدول (3-6) معامل الأنقسام الخلوي لخلايا الخط الطبيعي REF و المعامل بالتراكيز الثلاث من مصل الإبل عند العمر خمسة أشهر مقارنة بالسيطرة.	81
الجدول(3-7) دليل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بإضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة.	87
الجدول(3-8) دليل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بإضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة	87
الجدول(3-9) دليل الأنقسام الخلوي(MI) للخلايا اللمفاوية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بدون إضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة.	88
الجدول(3-10) دليل التحسس الخلوي(BI) للخلايا اللمفاوية النامية في تراكيز مختلفة من مصل الإبل بدون إضافة العامل المشطر مقارنة بالسيطرة	88

قائمة الملاحق

الملحق	الصفحة
الملحق(1) يوضح مكونات الوسط الزرعي (RPMI-1640) حسب (Sigma-2005).	115
الملحق (2) بعض مكونات المصل الضرورية لبقاء و نمو الخلايا خارج الجسم الحي *In vitro* .	117
الملحق (3) يبين جانب من المكونات المهمة لمصل جنين البقري.	118
الملحق (4) مكونات بلازما الإبل ذي السنام الواحد البالغ المثبتة من قبل عدة باحثين	120
الملحق (5) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بإضافة العامل المشطر	123
الملحق(6) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بدون إضافة العامل المشطر	123
الملحق(7) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بدون إضافة العامل المشطر	124
الملحق(8) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بإضافة العامل المشطر	124

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	
1-1 الزرع النسيجي	1
1-1-1 نبذة تاريخية عن الزرع النسيجي	1
2-1-1 تطبيقات الزرع النسيجي	3
2-1 الوسط الزرعي	4
1-2-1 الخصائص الفيزيائية للوسط الزرعي	5
1-1-2-1الرقم الهيدروجيني	5
2-1-2-1 الأزموزية	6
3-1-2-1 اللزوجية	6
4-1-2-1 الشد السطحي و الرغوة	6
2-2-1 مكونات الأوساط الزرعية المُعرّفة	6
1-2-2-1 الأحماض الأمينية	7
2-2-2-1 الفيتامينات	7
3-2-2-1 الأملاح	8

4-2-2-1 الكلكوز	8
3-1 المصل	8
1-3-1 مكونات المصل المهمة في الزرع النسيجي	9
1-1-3-1 البر وتينات	9
2-1-3-1 الهرمونات و عوامل النمو	12
3-1-3-1 الدهون	15
4-1-3-1 المعادن و العناصر النادرة	15
5-1-3-1 المغذيات و المؤيضات	16
الموضوع	الصفحة
4-1 الإبل	16
1-4-1 نبذة تاريخية عن الإبل	16
2_4_1 تصنيف الإبل	**17**
3_4_1 الإبل العراقية	18
4-4-1 بعض الخصائص الوظيفية للإبل	19
5_4_1 دم الإبل	21
1_5_4_1 خلايا الدم	21
1-1-5-4-1 خلايا الدم البيض	21
2-1-5-4-1 كريات الدم الحمر	22
2_5_4_1 بلازما الدم	24
5_1 الوراثة الخلوية	25
الفصل الثاني المواد و طرائق العمل	
1-2 المواد	29
1-1-2 الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة	29
2_1_2 المحاليل الكيميائية المستخدمة في الدراسة	32
3_1_2 تحضير الأدوات المختبرية	34
4-1-2 المواد والمحاليل المستخدمة في الدراسة	34
1-4-1-2 المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي	34
2-4-1-2 المحاليل الخاصة بالوراثية الخلوية	37
5-1-2 الخطوط الخلوية	40
1-5-1-2 الخط الخلوي لسرطان الحنجرة البشري (Hep-2)	40

2-1-5-2 الخط الخلوي لسرطان الغدد اللبنية الفأري (AMN-3)	40
2-1-5-3 الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (REF)	40
2-2 طرائق العمل	41
2-2-1 مخطط التجربة	41
2-2-2 جمع عينات دم الإبل	42
2-2-3 دراسة تأثير مصل الإبل في تنمية الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية	42
2-2-3-1 تهيئة الوسط الزرعي والخطوط الخلوية	42
2-2-3-2 عد الخلايا الحية	43
2-2-3-3 تأثير مصل الإبل بتراكيز وأعمار مختلفة على نمو الخطوط الخلوية	43
2-2-3-4 الفحص المجهري	44
2-2-3-5 منحنى نمو الخلايا	44
2-2- 5 الإدامة والمحافظة على الخطوط الخلوية	45
2-2-6 دراسة وراثية خلوية للخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية بعد معاملتها بمصل الإبل	45
2-2-6-1 الحضن و الحصاد	46
2-2-6-2 المعاملة بالمحلول واطيء التوتر	46
2-2-5-3 التثبيت	46
2-2-6-4 تحضير الشرائح الزجاجية	46
2-2-6-5 التقطير	47
2-2-6-6 التصبيغ	47
2-2-6-7-2-2 الفحص المجهري	47
2-2- 7 تأثير مصل الإبل على نمو الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي	47
2-2-7-1 عينة الدم	47
الموضوع	الصفحة
2-2-7-2 زرع الدم	47
2-2-7-3 حصاد الخلايا	48

2-2-7-4 التثبيت	49
2-2-7-5 تحضير الشرائح المجهرية	49
2-2-7-6 التحزيم	49
2-2-7-7 تصبيغ الشرائح المجهرية	50
2-2-7-8 فحص الشرائح المجهرية	50
2-2-8 التحليل الأحصائي	50
الفصل الثالث النتائج	
3-1 مصل الإبل	52
3-1-1 الفحص المجهري	52
3-1-1-1 الخط الخلوي السرطاني Hep-2	52
3-1-1-2 الخط الخلوي السرطانيAMN-3	52
3-1-1-3 الخط الخلوي الطبيعي REF	53
3-1-2 منحنيات النمو للخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية النامية في الأوساط الحاوية على تراكيز و أعمار مختلفة من مصل الإبل	55
3-1-2-1 خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2	55
3-1-2-1-1 طور السكون Lag phase	55
3-1-2-1-2 طور اللوغارتمي Log phase	56
3-1-2-1-3 طور الأنحدار Decline phase	56
3-1-2-2 خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3	60
3-1-2-2-1 طور السكون Lag phase	60
3-1-2-2-2 طور اللوغارتمي Log phase	60
الموضوع	الصفحة
3-1-2-2-3 طور الأنحدار Decline phase	61
3-1-2-3 خط خلايا الطبيعي لجنين الجرذ REF	65
3-1-2-3-1 طور السكون Lag phase	65
3-1-2-3-2 طور اللوغارتمي Log phase	65
3-1-2-3-3 طور الأنحدار Decline phase	66
3-1-3 تأثير أستخدام مصل الإبل العراقية بتراكيز مختلفة لحيوانات مختلفة الأعمار في تنمية خطوط الخلايا السرطانية والطبيعية	71
3-1-3-1 خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2	71
3-1-3-2 خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3	74
3-1-3-3 خط خلايا الطبيعي لجنين الجرذ REF	77
3-1-4 دراسة وراثية خلوية للخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF و المعاملة بالأوساط الحوية على	80

مصل الإبل	
3-1-4-1 الخط الخلوي السرطاني Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري	80
3-1-4-2 الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لسرطان الغدد اللبنية الفأري	80
3-1-4-3 الخط الخلوي الطبيعي REF لجنين الجرذ	80
3-1-4-4 حساب معامل الأنقسام (MI)	80
3-1-5 دراسة وراثية خلوية لتأثير تراكيز مختلفة من مصل الإبل العراقية، لحيوانات مختلفة الأعمار على الخلايا اللمفاوية البشرية	82
3-1-5-1 دليل الأنقسام الخلوي (MI) و التحسس الخلوي (BI) للخلايا اللمفاوية بإضافة العامل المشطر (PHA) وبدون أضافته	82
3-1-5-1 – 1 بإضافة العامل المشطر (PHA)	82
3-1-5-1-1-1 عمر خمسة أشهر	82
3-1-5-1-1-2 عمر السنتين	84
3-1-5-1-1-3 عمر خمس سنوات	85
3-1-4-1-2 بدون إضافة العامل المشطر PHA	88
3-4-1-2 التغيرات الكروموسومية	89
الفصل الرابع المناقشة	
4-1 دراسة تأثير معاملة خلايا الخط السرطاني Hep-2 و AMN-3 و الخط الطبيعي REF بتراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة.	90
4-2 دراسة تأثير مصل الإبل بأعمار و تراكيز مختلفة على انقسام الخلايا اللمفاوية	95
الاستنتاجات و التوصيات	
الموضوع	الصفحة
الاستنتاجات	96
التوصيات	97
المصادر	
المصادر العربية	98
المصادر الأجنبية	101
الملاحق	
الملاحق	115

2- المواد و طرائق العمل

2-1 المواد

2-1-1 الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة

أسم الجهاز	الشركة المجهزة	المنشأ
الأليزا ELISA	Organon techniqua	Germany
حمام مائي Water bath	Percisterm	Germany

Switzerland	Precisa	ميزان حساس Sensitive balance
U.K	GallenKamp	حاضنة مبردة Cooling incubator
U.K	Gelaire class gelman instrument	كابينة معقمة Laminar air flow safety cabinat
U.K	Chilipson	جهاز نبذ مركزي مبرد Cooling centrifuge
U.K	Universal 16A	جهاز نبذ مركزي Centerifuge
Germany	Opton	مجهر ضوئي مقلوب Inverted Microscope
Japan	Olympus	مجهر ضوئي مركب 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		
قناني بلاستيكية للزرع النسيجي حجم 25 سم^2 Plate bottles for tissue culture	Falcon	U.S.A

2_1_2 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	Iraq

	الطبية	
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 Giemsa stain	BDH chemical	England
تربسين Trypsin	Sigma	U.S.A
الفرسين Versene	BDH chemical	England

كلوتامين L-glutamin	Sigma	U.S.A
الكولسيمايد Colcemid	Serva	Germany
كلوريد البوتاسيوم KCL	BDH chemical	England
فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين $NaHPO_4$	BDH chemical	England
صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet	BDH chemical	England
محلول هانكس الملحي المتوازن Hank's Blaance Salt Solution(HBSS)	Irvine, Flow lab.	Scotland
صبغة التريبان الزرقاء Trypan blue stain	Phamacia fine chemical	Sweden
محلول الهيبس Hepes solution	Flow lab.	U.K
فورملديهايد Formaldehid %37	Sigma	U.S.A

2_1_3 تحضير الأدوات المختبرية General Laboratuies Equipments

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

2-1-3-1 الأدوات البلاستيكية Plastic Ware

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

2-1-3-2 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 Water و تجفف جيداً وتعقم بجهاز الموصدة autoclave بدرجة حرارة 121ْم لمدة نصف ساعة ويحفظ لحين الاستعمال .

2-1-3-3 تحضير الشرائح الزجاجية Slide Making

حضرت الشرائح الزجاجية الجديدة المغطاة بمادة زيتية حافظة من التخدش ،بغمرها بمحلول الكرومك (Chromic) لمدة 72 ساعة ،بعدها غسلت تلك الشرائح جيداً بالماء الحار ومن ثم بالماء المقطر ، و وضعت في وعاء زجاجي حاوٍ على الماء المقطر في درجة حرارة -20ْ 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 النسيجي Stock 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.

2-1-4-1-1 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.

2-1-4-1-2 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.

3-1-4-1-2 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.

4-1-4-1-2 بيكابونات الصوديوم Sodium bicarbonate

NaHCO3	4.4 غم
ماء مقطر	100 مل

يحفظ بدرجة حرارة 4ْ م.

5-1-4-1-2 الوسط الزرعي

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

أضيف إلى لتر من الوسط الزراعي RPMI_1640 المواد التالية :

1.10.4 غم من مسحوق RPMI-1640 مع دارىء هيبس مع 15 مل من لـ كلوتامين. 2.أضيف 15 مل من بيكاربونات الصوديوم Na_2HCO_3.

3. Streptomycin 0.5 مل
4. Gentamycine 0.25 مل
5. 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 0.22 مايكرون.

2-1-4-1-6 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.

2-1-4-1-7محلول هانكس الملحي المتوازن Hanks Balance Salt Solution (HBSS)

محلول X 10 جاهز من شركة.Flow lab، Irvine،Scotland .

2-1-4-1-8 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 10مل 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 .

2-1-4-1-9 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 .

2-1-4-1-10 صبغة التريبان الزرقاء Trypan Blue Stain

اذيب 1 غم من مسحوق الصبغة في 100 مل من محلول هانكس ثم رشح باستعمال ورق ترشيح واتمان رقم (1) ، و حفظ في درجة حرارة 4ْم الى حين الأستعمال . وحينها خفف بنسبة 1-10 بأستعمال محلول هانكس مباشرة.

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

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

2-1-4-2-1 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

2-1-4-2-1-1 مصل الإبل

قد حضر وفق الفقرة (2-1-4-1-1)

2-1-4-2-1-2 المصل البقري

حضر حسب الفقرة(2-1-4-1-2)

2-1-4-2-1-3 بلازما الدم البشري

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

2-1-4-2-1-4 الوسط الزرعي

تم تحضير الوسط الزرعي RPMI-1640 حسب الفقرة (2-1-4-1-5) .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.

2-1-4-2-2 محفز النمو Phytohemagglutinin (PHA)

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

2-1-4-2-3 الكولجسين Colchicine

تم بإذابة حبة بوزن 0.5ملغم بـ1مل ماء مقطر للحصول على تركيز 0.5ملغم /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.

2-1-4-2-4 الكولسمايد

أذيب1 غم من مسحوق الكولسمايد في 100 مل من الماء المقطر و حفظ بدرجة حرارة 4ْ م لحين الأستعمال.

2-1-4-2-5 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.

2-1-4-2-6 المثبت Fiaxtive

حضر بالمزج الفوري للميثانول المطلق مع حامض الخليك الثلجي (Glacial Acetic Acid) بنسبة 1:3 (حجم \ حجم).

2-1-4-2-7 محلول التربسين Trypsin solution

أذيب 0.25 غم من مسحوق التربسين في 100 مل من دارىء الفوسفات (PBS) المحضر في الفقرة (2-1-4-1-6) مع المزج الجيد بوساطة الهزاز المغناطيسي ثم وزع في أنابيب زجاجية سعة 1 مل و حفظ مجمدا لحين الأستعمال.

2-1-4-2-8 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.

2-1-4-1-2-9 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 solution وعند الاستعمال خفف محلول الصبغة المركز بمزج ا مل من الصبغة مع 4 مل من دارىء سورنسن الدافىء المحضر في الفقرة (2-1-4-1-2-8) .

2-1-5 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

الكاملـة Confluent Monolayer، ‘تعامـل الخلايـا بمحلـول التربسـين –فرسـين 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 (15) و المأخوذة من المركز العراقي لبحـوث السرطان و الوراثة الطبية ، أذ جرى أستحداث هذا الخـط الخلـوي خـارج الجسـم الحي.

2-2 طرائق العمل

2-2-1 مخطط التجربة

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

جمعت عينات دم (ما يقارب 2.5لتر)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 24 ساعة بعدها فصل المصل حسب ما وصف في الفقرة(2-1-4-1-1).

2-2-3 دراسة تأثير مصل الإبل في تنمية الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية

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

2-2-3-1 تهيئة الوسط الزرعي والخطوط الخلوية

Preparation media and cell lines

حضر الوسط الزرعي وفقا لطريقة (Freshney,2000)،حيث خلطت مكوناته مع بعضها حسب الفقرة(2-1-4-1-5).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(2-1-4-1-8) 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.

2-2-3-2 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 (2-1-4-1-10) ، اذ تاخذ الخلايا الميتة الصبغة ببضع ثواني مما يجعلها سهلة التميز عن الخلايا الحية ويتم ذلك بمزج 0.2 مل من عالق الخلايا بـ0.2 مل من الصبغة مع 1.6 مل من (PBS)المحضر وفق الفقرة (2-1-4-1-6) .ثم تم حساب الخلايا الحية والغير حية باستعمال شريحة العد التفريقي.

2-2-3-3 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 5%من مصل البقري حسب الفقرة (2-1-4-1-5) .'جهز عالق الخلايا لكل نوع من الأنواع الثلاثة من الخطوط الخلوية عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25سم ^{3} بمحلول التربسين-فرسين

المحضر وفق الطريقة(2-1-4-1-8) .بعدها أضيف 0.05 مل من عالق الخلايا الى 5مل من الوسط الزرعي الحاوي على أحد تراكيز مصل الإبل بأحد الأعمار أو على تركيز 5% من مصل البقري . تم نقل 0.2 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 (4×10^4 خلية\حفرة) و بواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة فيها، بعد أن تم عد الخلايا الحية من الميتة بواسطة صبغة (Trypan blue) المحضرة في الفقرة(2-1-4-1-10).ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37ْم لمدة 6 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 (2-1-4-1-9) .أعيد الطبق الى الحاضنة لمدة20 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 24 ساعة ثم تكرر كل 24 ساعة لمدة 6 أيام. أيام تقرأ بعدها بجهاز الأليزا على أمتصاصية 492 نانوميتر.

4-3-2-2 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 (2-1-4-1-9) وثم تم مقارنتها مع السيطرة.

5-3-2-2 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)

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

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- 5 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.

2-2-6 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 (5%،10% و 15%) و المحضر في الفقرة (2-1-4-1-2)لعمر خمسة أشهر و قورنت مع السيطرة و كالآتي

2-2-6-1 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 ْ37م لمدة72 ساعة . و بعد ذلك تم أضافة الكولسمايد بمقدار 0.1 مل للقنينية الواحدة ، و اعيدت القناني الى الحاضنة و تركت لمدة 15 دقيقة . وبعدها افرغت القنينة من الوسط الزرعي ثم أضيف التربسين / فرسين لمدة 1-2 دقيقة ومن ثم أعيد الوسط الزرعي السابق الى القنينة مع المزج الجيد للخلايا المفككة و نقلت الى أنابيب زجاجية نظيفة.

2-2-6-2 المعاملة بالمحلول واطىء التوتر Hypotonic solution

نبذت الخلايا بجهاز النبذ المركزي بسرعة 1500 دورة / دقيقة و لمدة 10 دقائق .ثم أزيل الرائق وعلق الراسب بمحلول واطىء التوتر من كلوريد الكالسيوم 0.075 مولر مع الرج المستمر ، ووضعت بعد ذلك في حمام مائي بدرجة حرارة ْ37م لمدة 20 دقيقة . بعدها نقلت الأنبوبة الى جهاز النبذ المركزي على سرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.

2-2-5-3 التثبيت Fixation

أهمل الرائق المتكون و أضيف الى الراسب الخلوي المحلول المثبت و المحضر آنيا حسب الفقرة (2-1-4-2-6) قطرة فقطرة مع الرج المستمر لحد 5 مل . بعدها يترك العالق الخلوي لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ، ثم اعيدت عملية النبذ المركزي على سرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق مرتان مع تبديل المثبت ثلاث مرات ، و في المرة الثالثة أعيد تعليق الخلايا مع 3 مل من المثبت و خزن في درجة حرارة –20ْم لمدة ساعتين على الأقل قبل تحضير الشريحة الزجاجية.

2-2-6-4 تحضير الشرائح الزجاجية Slid making

حضرت الشرائح الزجاجية حسب الفقرة (2-1-3-3)

2-2-6-5 التقطير Dropping

استعملت ماصة باستور لتقطير 2-3 قطرات من عالق الخلايا على الشريحة الزجاجية الرطبة وعلى مسافة 50 سم و تركت لتجف في الهواء.

2-2-6-6 التصبيغ Staining

صبغت الشريحة المحضرة بالخطوات السابقة بواسطة صبغة كمزا المحضرة في الفقرة (2-1-4-9) أذ غطت الشريحة بالصبغة لمدة 3 دقائق ثم غسلت بمحلول السورنسن المحضر في الفقرة (2-1-4-2-8) و تركت الشريحة لتجف في الهواء.

2-2-2-6-7 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- 7 تأثير مصل الإبل على نمو الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي

Effect of camel serum *in vitro* human lymphocyte growth

2-2-7-1 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.

2-2-7-2 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 للنموPHA 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.

2-2-7-3 حصاد الخلايا Harvesting

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

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

3.مزج المتبقي من الراسب جيدا بأستخدام المازج الكهربائي Vortex ويضاف اليه 2مل من محلول كلوريد البوتاسيوم 0.075 مولر المحضر في الفقرة(2-1-4-2-5) الدافئ قطرة فقطرة مع التحريك والرج المستمر ومن ثم يكمل الحجم إلى 10مل من المحلول السابق لكل انبوبة بصورة تدريجية .

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

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

2-2-7-4 التثبيت Fixation

تم تثبيت الخلايا حسب الخطوات الآتية:

1. خلط الراسب جيدا بالخلاط الكهربائي ويضاف 5 مل من المثبت المحضر آنيا حسب الفقرة (2-1-4-2-6) على جدار الأنبوبة بصورة تدريجية قطرة فقطرة مع الرج المستمر.
2. و ضعت العينة بجهاز الطرد المركزي1500 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق ،ثم أزيل الرائق وترك الراسب.
3. أعيدت الخطوة رقم1 و3 لعدة مرات للحصول على رائق عديم اللون.
4. أعيدت الخطوة 3 مع بقاء القليل من المثبت للحصول على عالق ضبابي.

2-2-7-5 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.

6-7-2-2 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 65ْم لمدة ساعة ، و تعامل بعدها بمحلول التربسين لمدة 8-12 ثانية . تغسل بعدها الشريحة مباشرة بمحلول دارىء الفوسفات (PBS) لأيقاف عمل التربسين.

7-7-2-2 تصبيغ الشرائح المجهرية Slides staining

صبغت الشرائح بمحلول صبغة كمزا المحضر آنياحسب الفقرة (2-1-4-2-9) 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 .

8-7-2-2 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 Mitotic Index (MI) من خلال حساب النسبة المئوية لعدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة الى عدد الخلايا اللمفاوية الكلي (المنقسمة وغير المنقسمة 1000خلية) × 100 كما تم حساب معامل التحسس الخلوي Blasotcyte Index (BI) من خلال حساب النسبة المئوية لعدد الخلايا اللمفاوية المتحسسة الى الف خلية لمفاوية (االمتحسسة وغير المتحسسة)×100 (Shubber&Al-Allak., 1989)

وتطبق المعادلات الآتية :

معامـل الأنقسـام (MI)=عـدد الخلايـا المنقسـمة /عـدد الخلايـا المنقسـمة 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.

8-2-2 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 (5%) 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

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**

10	**Glycine**
15	**L-histidine (free base)**
20	**L-hydroxy-proline**
50	**L-isoleucine**
50	**L-leucine**
40	**L-lysine Hcl**
15	**L-methionine**
15	**L-phenylalanine**
20	**L-proline**
30	**L-serine**
20	**L-theronine**
5	**L-tyrptophan**
20	**L-tyrosine**
20	**L-valine**
Vitamins	
0.200	**Biotin**
0.250	**D-Ca pantothenate**
3	**Choline chloride**
1	**Folic acid**
35	**i-inositol**
1	**Nicotinnamide**
0.20	**Riboflavin**
1	**Thiamin Hcl**

1	**Pyridoxine Hcl**
1	**Para amino-benzoic acid**
Inorganic Salts	
400	**KCL**
100	**$MgSo_4$-$7H_2O$**
6	**NaCL**
2.200	**$NaHCO_3$**
1.512	**Na_2HPO_4**
Other component	
2	**D-glucose**
5	**Phenol red**
1	**Glutathione (reduced)**
%5	**CO_2 (Gas phase)**

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 – كلوبيولين – ألفا 2 **Macroglobulin**

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

Glutathion
▪ الدهون Lipids
حــــــــــــــــــــــامض لينوليــــــــــــــــــــــك **Linoleic acid**
الـــــــــــــــــــــدهون الفســــــــــــــــــفورية **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**
الفوســـــفات الغيــــر عضـــوية **Inorganic phosphate**	**100ملغم**
Glucoseكلكوز	**1250 ملغم**
nitrogen, urea) نيتروجين (يوريا	**160 ملغم**
total protein البروتين الكلي	**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**

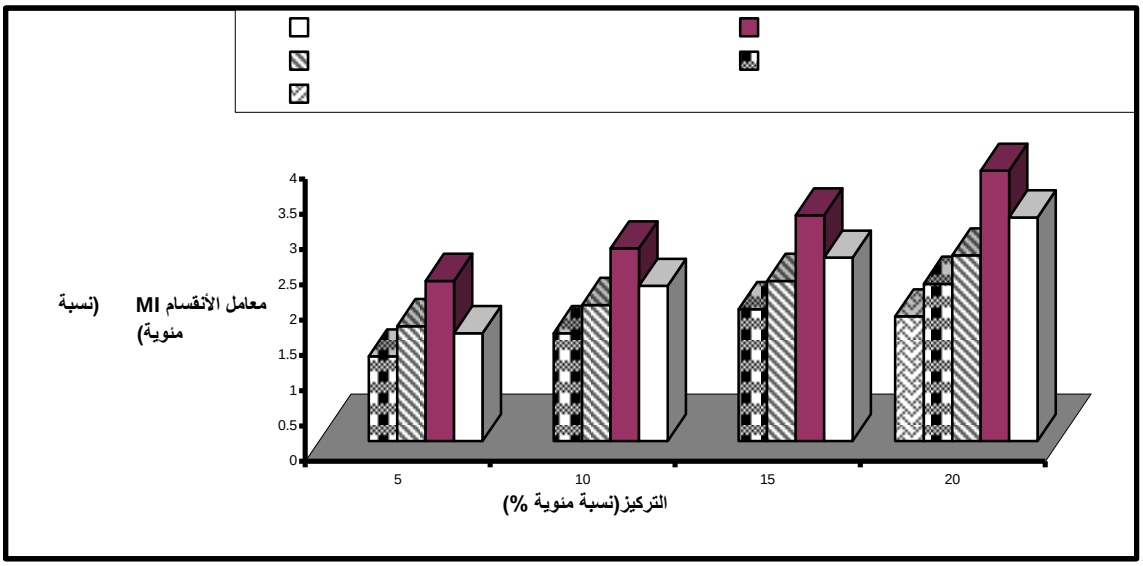
الملحق(4) مكونات بلازما الجمل ذي السنام الواحد البالغ المثبة من قبل عدة باحثين

المكونات	النسبة	المصدر

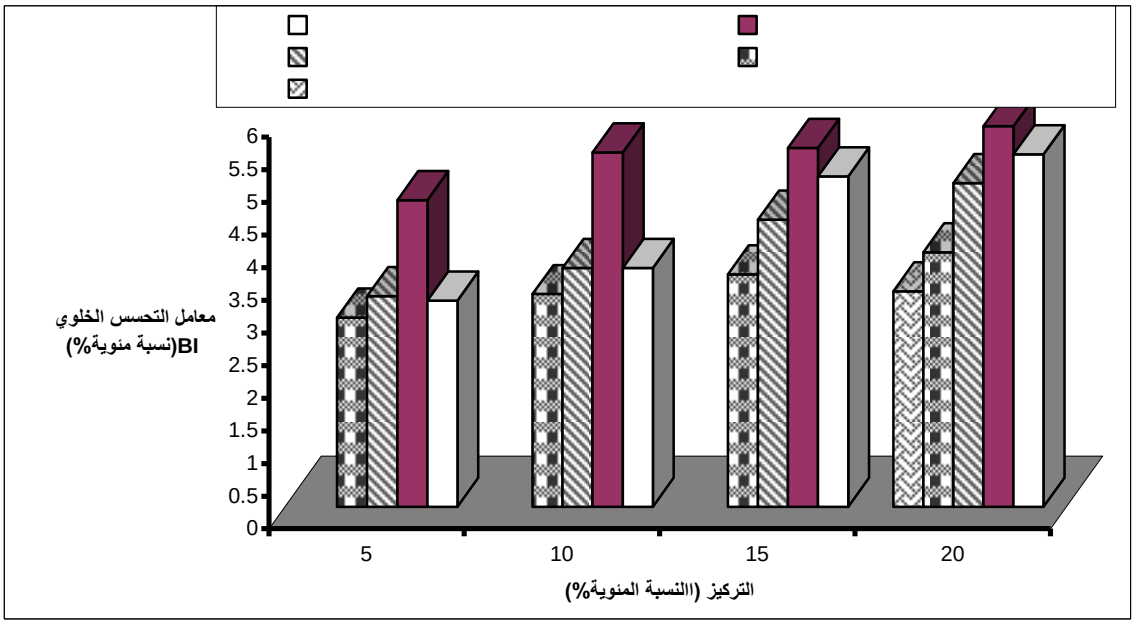
الصوديوم Na^{+} (MEq / L)	178	Sarwar & Majeed, 1997 Mohamed & Hussien,1999
البوتاسيوم K^{+} (MEq / L)	7.65- 4.1	Sarwar & Majeed, 1997 Mohamed & Hussien,1999
الكلور CL^{-} (mg/dl)	628	Sarwar & Majeed, 1997
النحاس Cu^{+2} (*M*g / dl)	89.0- 13.0	Faye & Bengoumi, 1997
الخارصين Zn^{+2} (*M*g /dl)	55.0 – 19.0	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	26.25 _30	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

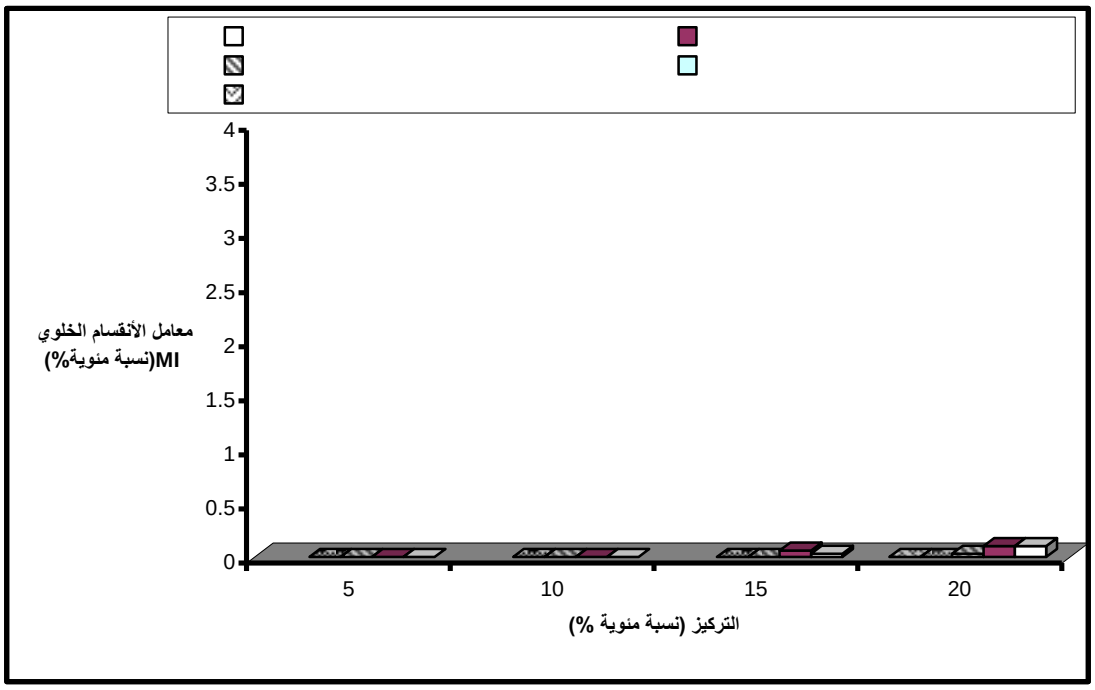
التستستيرون (ng / dl) Testosterone	2.99 -0.6	Azouze *et al* ., 1992 n = 5
الهرمـــون اللـــوتيني HL ((i.u.ml	2.98 -0.72	Azouz *et al.*, 1992 n = 5
الهرمون المحفز للجريبات FSH (i.u.ml)	4.62-2.07	Azouz *et al.*, 1992 n = 5



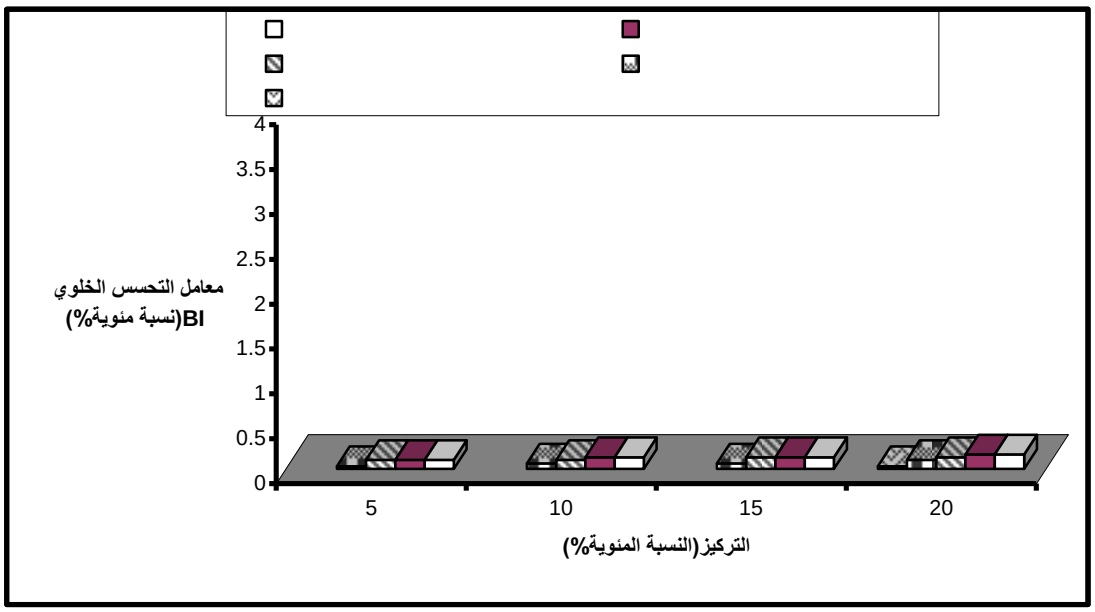
الملحق (5) تأثير أستخدام تراكيز مختلفة من مصل الإبل و بأعمار مختلفة على معامل الأنقسام الخلوي (MI) للخلايا اللمفاوية الطبيعية البشرية بإضافة العامل المشطر



الململحق (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

المصادر العربية

أبن كثير ،(1969). تفسير القران الكريم دار المعرفة .بيروت . لبنان.

أكساد ،(1989). الأبل في الجمهورية العراقية. دمشق. سوريا.

الأعظمي، محمد عبد الوهاب شاكر.(2000).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(2002).علم الغدد الصماء الأهلية للنشر و التوزيع .الطبعة العربية الأولى.

البعبلكي، منير (1986).قاموس المورد(الطبعة العشرون). دار العلم للملايين.بيروت.

الجشعمي، زبيدة عدنان خضير(2000).**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(2004).تأثير مستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperus rotundus L* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية.رسالة ماجستير.كلية العلوم-

جامعة بغداد.

الشمري ، أحمد مجيدحمزة(2003).دراسة تأثير فايروس النيوكاسل في علاج الأورام السرطانية المغروسة في الفئران.رسالة ماجستر.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

الطائي،فراس صبحي صالح(2003).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(1990).الأبل تربيتها وأمراضها (الطبعة الأولى).وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.جامعة بغداد.

العوامي، عّباد موسى(1985). الأبل و الخيل في التأريخ و الحضارة.(الطبعة الأولى).كتاب الشعب. المنشأة العامة للنشر و التوزيع.طرابلس .ليبيا.

المسعودي، هادي رسول حسن(2004).أثر أستخدام الفايبرونكتين في زيادة كفاءة الخلايا البلعمية في التهام طفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania tropica* خارج الجسم. مجلة جامعة كربلاء.2(7):66-76.

الندوة العراقية (1988). ندوة لتربية و أمراض الأبل .كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

جعفر،سعاد غازي(1999).دراسة وراثية خلوية لسرطان الثدي في العراق. رسالة ماجستير. كلية العلوم.جامعة بغداد.

حامد،أحمد بشير(2003).دراسة تكرار فقدان كرموسوم Y في بعض الأمراض السرطانية و المسنين. رسالة ماجستير.كلية العلوم.الجامعة المستنصرية.

حتي،يوسف (2004).قاموس حتي الطبي.مكتبة لبنان.بيروت.

حسن ،عبد الصمد عليوي(2005).الاتزان المائي في الجمال دراسة فسيولوجية_نسيجية.رسالة دكتوراه.كلية العلوم.جامعة بابل.

حسون،طارق مسلم ؛ خورشيد؛ نجوى ؛ ونيس، سهيلة و عبد الرحمن،محمد (1990).التكاثر في الجمال و الجاموس.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.دار الكتب للطباعة و الشر.جامعة الموصل.

خلف،سمير مشرف(2005).دراسة دمية وراثية_خلوية على عمال معمل الزجاج في الرمادي رسالة ماجستير.كلية التربية.جامعة الأنبار.

زايد،عبد الله ؛ غادري،غسان و شريحة،عاشور(1991).الأبل في الوطن العربي.الطبعة الأولى جامعة عمر المختارالبيضاء.دار الكتب الوطنية.المركز البيلوغرافي الوطني.وحدة الأيداع القانوني.

علي،آمال محمد(2004).دراسة وراثية خلوية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرةHep-2 . رسالة ماجستير.كاية العلوم.جامعة بغداد.

محي الدين، خير الدين و يوسف،وليد حميد(1990).علم الفسلجة البيطرية.(الطبعة الأولى).وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.جامعة بغداد.

منهوب، صفاء كاطع(2001).دراسة مرضية وراثية خلوية لأورام القولون و المستقيم في الأنسان.رسالة ماجستير.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

وردة،محمد فاضل(1996).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. (5th ed)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 .(6th 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). Assess ment 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.

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*