



Effect of Gamma Irradiation on the Immune System of the Chick Embryo and the Induction of Tolerance

Malak Harateh, Souad Okla and Hani Rizk
Syrian Atomic Energy Commission
Damascus P.O. Box 6091

Abstract

The effect of low doses of gamma ray (1, 2.5 and 5 gray) irradiation on the lymphoid organs (bursa of Fabricius - BF-, the Thymus - Thy - and the bone marrow) of the developing chick were investigated. The embryos were irradiated at stage 34 (about 8 days of incubation). The results were as follows :

- 1 - Histological studies of sections of BF and Thy from embryos irradiated at stage 34 and sacrificed at stage 44 (about 18 day of incubation) showed that cells and especially the nuclei of the irradiated embryos, were larger in volume than in the control.
- 2 - The mitotic index (M.I) of the same embryos was in the treatment of 2.5 gray dose significantly higher than in other irradiated embryos and than the control. The M.I at 2.5 gray was 3.4% in BF, and 3.9% in Thy in comparison with 2.0% in BF and 2.4% in Thy of the control. In the bone marrow, the M.I. 1 gray was 1.91% in comparison with 0.84% in bone marrow of the control. Z was 12.2 at 2.5 gray in BF and Thy, and Z was 13.8 at 1 gray in bone marrow (The standard value is 3).
- 3 - The immune response against bovine serum albumin (BSA) of the irradiated embryos at 2.5 or 1 gray was higher in the adults of 45 day of age than of the controls as judged by the thickness of precipitation lines in the double immunodiffusion (Ouchterlony) technic.
- 4 - We were able to induce tolerance against BSA by injecting the antigen in the embryos in ovo only before stage 34 (i.e. before day 8 of incubation and not after). We think that the induced tolerance may be due to clonal deletion. It is interesting to note that the rearrangement of the immunoglobuline genes occurs about day 8 of incubation.

خلاصة

ان لتشعيع بيوض الدجاج بجرع منخفضة من أشعة غاما في مرحلة محددة من مراحل التنامي الجنيني أثراً تنشيطياً، حيث تزداد الفاعلية الانقسامية لخلايا نقي عظم الأجنة المشععة بالجرعة 1 غري، في حين تنشط الجرعة 1، و2.5، و5 غري تكاثر الخلايا في التوتة والجراب. ولقد أبدت الجرعة 2.5 غري أثراً تنشيطياً أعظمياً مقارنة مع بقية الجرع. كما أن التشعيع باحدى الجرعتين 1، أو 2.5 غري يؤدي إلى زيادة في مستوى الاستجابة المناعية نحو ألبومين مصل البقر. إن حقن ألبومين مصل البقر في البيضة في مرحلة مبكرة من مراحل التنامي الجنيني، يحرض ظاهرة التحمل فيصبح البروتين الغريب هذا جزءاً من الذات فلا تتعرفه خلايا الجهاز المناعي.

مقدمة

يمثل الجهاز المناعي جملة غاية في التعقيد، إذ لا يقل أهمية عن أي من أجهزة الجسم الأخرى ذات الوظائف التنسيقية، عصبية كانت أم هرمونية؛ ويميز هذا الجهاز مكونات الذات Self-components عن مكونات اللذات non self-components، وذلك نتيجة تربية صارمة تخضع لها الخلايا اللمفية بدءاً من الحياة الجنينية، وحتى حدوث الموت (رزق، 1993).

1 - اصل خلايا الأرومة اللمفية

يتباين منشأ خلايا الأرومة خلال تكون الفرد ontogeny، فتشتق خلايا الأرومة بعد اليوم الثاني من الحياة الجنينية من الكيس المحي Yolk sac واعتباراً من اليوم الثالث من الحياة الجنينية تبدأ فاعلية حادثات تكون مصدرها داخل الجنين، ويبدأ الطحال اعتباراً من اليوم الثاني عشر بإنتاج خلايا الأرومة التي تنتمي إلى كريات بيض وحمرة. ويلعب نقي العظم في هذه المرحلة أيضاً دوراً في تكوين بعض كريات الدم (Hamilton, 1952). وعلى الرغم من ذلك، فإن الأعضاء اللمفية تتشكل فقط من خلايا مشتقة من داخل الجنين وليس من خلايا الأرومة المشتقة من الكيس المحي (Martin et al., 1979).

2 - الانفصال المبكر لطائغ اللمفاويات البائية والتائية في جنين الدجاج

يزودنا جنين الدجاج بنموذج متفرد لدراسة تنامي الجهاز المناعي وذلك لامكانية الفصل التشريحي للخلايا اللمفية التائية والبائية في التوتة وفي جراب فابريشيوس.

يتم التعشيش colonization داخل بداءات التوتة والجراب وفق آليات دقيقة تتباين بين العضوين كليهما (Haussaint et al., 1991). فلا تتم هجرة خلايا الأرومة إلى التوتة صدفية، حيث تملك الخلايا التي ستهاجر إلى التوتة مستضدات سطحية، هذا بالإضافة إلى بعض الصفات الوظيفية لللمفاويات

التائية (Roitt et al.,1989). كما ان طلائع الخلايا البائية تقوم قبل دخولها الى بداء الجراب بإعادة ترتيب rearrangement جينات السلسلة الخفيفة للغلوبولين المناعي (Ig) (Houssaint et al.,1991).

3 - تمايز الخلايا التائية

تمثل عملية التربية داخل التوتة، والتي تلي تعشيش التوتة بخلايا الارومة، مرحلة ضرورية لتشكيل للمفاويات التائية الوظيفية. اذ يحصل في التوتة نوع من المحافظة على حالة التحمل المناعي الذاتي، فتمنع للمفاويات ذات التفاعل الذاتي المحتمل، من توليد استجابات مناعية تجاه مستضدات مستمدة من الذات (Goodnow et al.,1989).

وغالبا ما يتم في جنين الدجاج تعشيش الاعضاء اللمفية الاولية في اليوم 14 من الحياة الجنينية. اذ يحدث التعشيش في التوتة وفق موجات متعددة، تندفق فيها خلايا الأرومة، ويستمر تدفق هذه الخلايا الطبيعية حتى بعد النقف (Houssaint et al.,1991).

هذا وتكون الخلايا التائية المهاجرة من نقي العظم على درجة اولية من التمايز بحيث تستقر غالبيتها في التوتة. وعلى الرغم من هذا التمايز البدائي الذي يتم في نقي العظم فإن التمايز النهائي أو التربية، تتم في فصيصات التوتة. وتتضمن عملية التربية هذه، الانقلاب من النمط ثنائي القسم المتغاير بيتا- غاما في 50% من التائيات الى النمط ثنائي القسم المتغاير بيتا- الفا وانقلاب النمط بيتا- غاما في حوالي 50% من التائيات الى النمط غاما- دلتا. ان الغاية من هذه التربية، هي تعليم الخلية التائية كيف تستطيع مشاهدة المستضد الغريب مقترناً بجزيء MHC (بروتينات معقد التوافق النسيجي الكبير) ومعرضاً على سطح الخلية مقدمة المستضد دون مشاهدة مستضدات الجسم (رزق، 1993).

4 - تمايز الخلايا البائية

تمايز للمفاويات البائية عند الطيور داخل جراب فابريشيوس، ولقد قسم Palojoki، وزملاؤه (1992) تنامي الخلايا اللمفية البائية تبعاً لمرحلة نضجها الى : 1- خلايا جريبية سليفة Prebursal، وتعطي نسايل الخلية البائية. 2 - خلايا جريبية bursal، التي تشترط وجود البيئة الجزيئية الصغيرة للجراب لانجاز نضجها. 3- خلايا بعد جريبية Post-bursal، وتشكل مجموع الخلايا البائية المتجددة ذاتياً عند الطير البالغ.

تهاجر خلايا الارومة البائية الى جراب فابريشيوس اعتباراً من اليوم الثامن من الحياة الجنينية، وترد على شكل موجة وحيدة تنجز خلال الايام 14- 8 من الحياة الجنينية (Palojoki et al.,1992). ويتم تعشيش ظهارة الجراب بالخلايا الطبيعية المكونة للدم وفق خطوتين: تدخل اولاً الخلايا التي تنتمي الى خط التكون الخلوي للبلعميات، الخلايا المتغصنة (macrophage/dendritic)، والتي تعبر بقوة عن مستضدات معقد التوافق النسيجي الكبير، وتكون

مسؤولة عن تكوين براعم الظهارة، في حين ان بعض الخلايا الطليعية المكونة للدم التي تغشش داخل الجراب لاتصل الى الظهارة، وانما تتدمج في طريق التمايز النقياني myeloide differentiation، وبشكل خاص في خط تكون المحببات. في حين تتمايز الخلايا اللمفية السليفة والتي تكون على تماس مع الخلايا الظهارية الى لمفاويات بائية. فدخول الخلايا التي تنتمي الى خط التكون الخلوي للبلعميات والخلايا المتغصنة قبل يوم او يومين من دخول الطلائع اللمفية البائية، ضروري لخلق البيئة المجهرية المناسبة لتمايز الخلايا البائية (Houssaint, 1987).

5 - التحمل المناعي

ان العنصر المنظم للاستجابة المناعية هو المستضد ذاته، هذا بالاضافة الى مركبات اخرى اساسية للجهاز المناعي (اللمفوكينات) والتي تلعب دوراً هاماً في توليد الاستجابة المناعية. فيستطيع المستضدان يقود الى حالة تفعيل، او تحمل وذلك حسب طبيعته ووفق طرق التقائه لأول مرة مع مكونات الجهاز المناعي.

والتحمل هو حالة من الشلل النوعي نحو مستضد معين بحيث ان اي تجريب جديد بالمستضد لا يكون دائماً مترافقاً مع استجابة مناعية، في حين تبقى الاستجابة المناعية طبيعية تجاه مستضدات اخرى.

وتبدو عملية التحمل بجرع خفيضة وعديدة من المستضد اكثر فاعلية من الجرعة الرفيعة الواحدة .

وفي حال اللمفاويات التائية يكون الخبن النسيلي clonal deletion غير قابل للعكس. ويحدث هذا الالغاء الانتقائي للخلايا التائية ذات التفاعل الذاتي في التوتة، بحيث يجهز التفاعل بين مستضد الذات ومستقبل الخلية التائية في مرحلة مبكرة من التمايز (Goodnow et al., 1989).

ويرجع ان يحدث تحمل الخلية البائية في الفترة القصيرة التي تلي تشكل مستقبلات الخلية البائية، لذلك فإن معظم هذه الخلايا لايتنامى الى خلايا مفرزة للاضداد (Nemazee et al., 1989).

6 - تاثير التشيع في المادة الحية

من المعروف أن الاشعاعات مضرّة بالنسج الحية، ويتوقف مدى التأثير الضار على الجرعة ومعدلها وعلى نمط النسج المعرضة، اذ يتعرض الكائن الحي للاشعاعات الطبيعية أو الصناعية عن طريق التشيع الخارجي أو عن طريق التلوث الداخلي، وتكون الاشعاعات ذات القدرة العالية على الاختراق، كاشعة غاما والأشعة السينية، شديدة الخطر على الانسان، وذلك لأن تأثيرها المباشر يتجلى باحداث تحول كيميائي في المكونات البنوية في المادة الحية، أما التأثير غير المباشر فيحث نتيجة تشكل جذور حرة، تنقل التأثير الاشعاعي بالتأين إلى جزيئات أخرى سيما في وسط غني بالأكسجين (Errera, 1985).

ويمثل التحلل الإشعاعي للماء أحد الظواهر الكيميائية الإشعاعية الملاحظة، فالماء ضروري جداً في العمليات الكيميائية والكيميائية الحيوية، ومن المنتجات النهائية الناتجة عن عملية التحلل هي الماء الأكسجيني والهيدروجين الفعال والأوزون التي توفر طاقة أكسدة وأرجاع عالية تؤدي إلى تحطم الروابط اللاتكافؤية للجزيئات البيولوجية مما يسبب تكسر هذه الجزيئات وذلك في حال الجرعة العالية من أشعة غاما (الحسني، 1986).
أما الفرضية المقترحة لتفسير آلية التأثير المنشط للتشعيع فتقترح أن التشعيع بجرع منخفضة من أشعة غاما يؤدي إلى تركيب كميات من عوامل النمو (عوامل الانتساخ والانتروكينات) أكبر من كميات الحالة السوية ويفترض أن تنشط هذه العوامل الجينات التي ترمز تركيب بروتينات معينة وتضبط هذا التركيب .

المواد والطرائق

1- التشعيع بأشعة غاما

تم تشعيع بيوض الدجاج المخصبة من النمط (الذرية leghorn) في قسم الوقاية والامان في هيئة الطاقة الذرية بمنبع من الكوبالت -60 واستعملت في هذه الدراسة اربع جرعة مختلفة من اشعة غاما هي 1، و2.5، و5، و7.5 غري، حيث تقدر قيمة الاشعة في الهواء بالرونجن في الدقيقة (Rontgen/minute)، وبضرب هذه القيمة بعامل، في حالة البيوض قيمته 0.965، نحصل على قيمة الاشعة الممتصة مقدرة بالراد في الدقيقة (Rad/minute).
وتجدر الإشارة هنا الى ان جميع المواد الكيميائية التي استعملت في هذه الدراسة كانت من الدرجة التحليلية، وتم شراء الاغاروز وألبومين مصل البقر من شركة سيغما وفلوكا على التوالي .

2- اعداد المحضرات المجهرية للدراسة النسيجية

حضنت مجموعة من البيوض في حاضنة درجة حرارتها 37.5 مئوية، ودرجة رطوبتها 60%، ثم فتحت هذه البيوض، واخذت منها اجنة في مراحل متتالية من مراحل التنامي بدءاً من المرحلة 36 وحتى المرحلة 46، اي اجنة تتراوح اعمارها بين 10 و20 يوماً.

وبعد تحضير المقاطع النسيجية للتوتة والجراب فابريشيوس ولنقي العظم للاجنة السابقة (وذلك وفق طريقة اعداد المحضرات المجهرية المعروفة)، درست هذه المقاطع للتعرف بنية التوتة والجراب والنقي، ومتابعة تناميتها خلال مراحل التنامي.

وفي تجربة ثانية قمنا بتشعيع بيوض طازجة (غير محضونة)، وبيوض اخرى كان الجنين فيها في مرحلة الثلم البدائي النهائي (19 ساعة تقريباً)، بثلاث جرعة من اشعة غاما هي: 1، و2.5، و5 غري وذلك بالاضافة الى مجموعة البيوض الشاهدة (غير المشعة) واعيدت البيوض الى الحاضنة ليتم فتحها

عندما يصبح عمر الجنين 12،14،16،18 يوماً، وذلك للتعرف تأثير اشعة غاما في تنامي الاجنة.

واجرينا تجربة اخرى، شععت فيها البيوض في اليوم الثامن من بدء الحضن وبالجرع المذكورة سابقاً نفسها، بالاضافة الى الجرعة 7.5 غري، ومجموعة البيوض الشاهدة. وعزلت التوتة والجراب من اجنة عمرها 18 يوماً، كما عزل نقي العظم من اجنة عمرها 12،14،16،18 يوماً. وبعد الحصول على المقاطع النسيجية، عينت نسبة الخلايا في حالة الانقسام الى العدداً الكلي للخلايا (أو ما يعرف بالنسب الانتسابي) في توتات واجربة ونقي عظم الاجنة السابقة وذلك بمعدل 40000 خلية لكل شرط تجريبي، ثم حسب المنسب الانقسامي (mitotic index)، وذلك لدراسة تأثير اشعة غاما في الفاعلية الانقسامية للخلايا اللمفية التائية والبائية، وحسبت ايضا القيمة المعيارية لمعرفة فيما اذا كان هناك فرق ذو دلالة واضحة بين المنسب الانقسامي لتوتات الاجنة المشععة باحدى الجرعات الثلاث المختلفة واجربتها ونقي عظمها، والمنسب الانقسامي في توتات الاجنة الشاهدة واجربتها ونقي عظمها، وبالتالي لتعيين الجرعة القادرة على تنشيط تكاثر الخلايا اللمفية.

3 - تقانة الانتشار المناعي المزدوج

تعرف هذه التقانة ايضاً باسم طريقة ouchterlony، وتستعمل للكشف عن الاضداد وذلك وفق المراحل التالية:

يحل الاغاروز بنسبة 2% بالدارة الملحبة الفوسفاتية في حمام مائي درجة حرارته 56 مئوية وتلون هذه الهلامة بملون ازرق التربيان، ثم تسكب الهلامة في علب بتري بحيث يكون ارتفاع الهلامة في العلبة مساوياً 2 ميلي متراً تقريباً.

بعد ان تجمد الهلامة، تصنع 6 آبار محيطية يوضع فيها المستضد بتراكيز متزايدة كما تصنع بئر مركزية توضع فيها كمية مساوية من المصل المدروس.

توضع العلب في حجرة رطبة وفي درجة حرارة المخبر، مدة 24-48 ساعة. ان كلاً من الضد والمستضد سينتشر في الهلامة، ويتشكل خط ترسب بين البئرين المركزية والمحيطية في حال وجود الضد النوعي في المصل المدروس، وذلك عندما يصبح عدد جزيئات المستضد متكافئاً مع عدد جزيئات الضد.

تم تشيع البيوض بالجرعة 1، أو 2.5 غري في اليوم الثامن من بدء الحضن ثم اعيدت البيوض الى الحاضنة لتتابع الاجنة تناميتها حتى مرحلة النقف. وبعد النقف تحقن الصيصان الناقفة من هذه البيوض بثلاث جرعات من المستضد (محلول البومين مصل البقر) وذلك بمقدار اميلي لتراً لكل صوص (0.5 ميلي لتراً في كل فخذ). فحقنت الجرعة الاولى في اليوم الثالث بعد النقف، وكان تركيز المستضد في هذه الجرعة اميلي غراماً/ اميلي لتراً

دارنة/ صوص، اما تركيز الجرعة الثانية فكان 1.5 ميلي غراماً/ اميلي لتراً دارنة/ صوص، وكان تركيز الجرعة الثالثة 2 ميلي غراماً/ اميلي لتراً دارنة/ صوص، بحيث يفصل بين الجرعة والاخرى مدة 14 يوماً. تضحى الدجاجات بعد 14 يوماً من الحقن بالجرعة الثالثة ليتم فصل المصل من الدم وحفظه في انابيب زجاجيه عميقة، حيث استعمل في دراسه تقانة الانتشار المناعي المزدوج.

4- الحقن في البيضة لدراسة ظاهرة التحمل المناعي

تم اجراء تجربة اتبع فيها برنامج محدد للحقن في البيضة بمحلول البومين مصل البقر. وتمت المعالجة في البيضة بالحقن عبر الأح وذلك بإحداث ثقب صغير جداً في القشرة وحيث تعقم سطح البيضة بمسحها بمحلول اليود المائي، ومن ثم بالكحول ذي التركيز 95٪. اجريت عملية الحقن والبيضة بوضع افقي، مع المحافظة على تعقيم سطح البيضة بعد صنع الثقب وبعد الحقن ايضاً، ثم اغلق الثقب بمصهور البرافين، ودرجت البيضة بلطف لتسهيل عمليه مزج المحلول المحقون بالأح، وخصص لهذه التجربة 4 مجموعات:

أ- المجموعة الأولى: تحقن البيوض بمحلول البومين مصل البقر ذي التركيز 0.5 ميلي غراماً/ 200 مكرو لتراً دارنة/ بيضة، وذلك في الايام 4، و6، و8 من بدء الحضن .

ب - المجموعة الثانية: تحقن البيوض بمحلول البومين مصل البقر ذي التركيز اميلي غراماً/ 50 مكرو لتراً دارنة/ بيضة في اليوم الرابع فقط من بدء الحضن.

ج - المجموعة الثالثة: تحقن البيوض بمحلول الالبومين ذي التركيز اميلي غراماً/ 50 مكرو لتراً دارنة/ بيضة، في اليوم السادس فقط من بدء الحضن.

د - المجموعة الرابعة: تحقن البيوض بمحلول الالبومين ذي التركيز اميلي غراماً/ 50 مكرو لتراً دارنة/ بيضة، في اليوم الثامن فقط من بدء الحضن. ويقابل كل مجموعة من المجموعات السابقة مجموعة من البيوض الشاهدة التي تحقن بالدارنة فقط دون المستضد.

وبعد نقف البيوض العائده لكل المجموعات تحقن جميع الصيصان الشاهدة منها والمعالجة بالجرع الثلاث من المستضد والتي استعملت في التجربة السابقة، ويأخذ الدم بنفس الطريقة المشار اليها، ليدرس بتقانة الإنتشار المناعي المزدوج.

النتائج

ثم تعيين المنسب الانقسامي لخلايا نقي عظم الأجنة المراحل 44,42,40,38، (التي توافق الأيام 18,16,14,12 من بدء الحضن).

كما عين هذا المنسب الانقسامي في توتات وأجربة أجنة المرحلة 44 (اليوم 18 من الحضن). ودرس تأثير التشعيع في الاستجابة المناعية نحو ألبومين مصل البقر لدى الدجاجات الناقفة التي ثم حقنها بهذا البروتين بدءاً من اليوم الثالث من النقف بجرعة واحدة، أو بجرعتين، أو بثلاث جرعات بحيث تفصل بين الجرعة والأخرى مدة 14 يوماً. ونبين فيما يلي النتائج التي تم التوصل إليها:

1- تأثير التشعيع في المنسب الانقسامي

تم تعيين المنسب الانقسامي لخلايا نقي عظم الأجنة الشاهدة (ثلاث أجنة في كل مرحلة من مراحل التنامي الجنيني 44,42,40,38 التي توافق الأيام 18,16,14,12 من الحضن) وفي نقي عظم الأجنة المشععة في المرحلة 34 من مراحل التنامي الجنيني المذكورة سابقاً .

كما عين هذا المنسب الانقسامي في توتات وأجربة أجنة المرحلة 44 (اليوم 18 من الحضن). ودرس تأثير التشعيع في الاستجابة المناعية نحو ألبومين مصل البقر لدى الدجاجات الناقفة التي ثم حقنها بهذا البروتين بدءاً من اليوم الثالث من النقف بجرعة واحدة، أو بجرعتين، أو بثلاث جرعات بحيث تفصل بين الجرعة والأخرى مدة 14 يوماً.

قورن هذا المنسب الانقسامي في كل من نقي عظم الأجنة الشاهدة، ونقي عظم الأجنة المشععة بـ 1، أو 2.5، أو 5 غري، وذلك في كل مرحلة من مراحل التنامي الجنيني المذكورة أعلاه، وتم حساب القيمة المعيارية (Z) لتحديد دلالة الفرق الملاحظ بين قيم المنسب الانقسامي في نقي عظم الأجنة الشاهدة، وقيم المنسب الانقسامي في نقي عظم الأجنة المشععة بالجرعة 1، أو 2.5، أو 5 غري، وذلك في كل مرحلة من مراحل التنامي الجنيني المدروسة.

فاذا كانت القيمة المعيارية $Z < 3$ فيوجد عندئذ فرق معنوي بين النسبتين، وإذا كانت القيمة المعيارية $Z > 3$ فلا يوجد في الغالب فرق معنوي. هذا، وتبين الجداول الاربعة التالية نتائج هنا الدراسة:

الجدول 1. القيمة المعيارية منسوبة للشاهد للمقارنة بين المنسب الانقسامى في نقي عظم أجنة المرحلة 38 التي شععت في المرحلة 34 من مراحل التنامى الجنينى، والمنسب الانقسامى في نقي عظم أجنة المرحلة 38 الشاهدة

القيمة المعيارية منسوبة للشاهد	المنسب الانقسامى في 40 000 خلية	عدد الخلايا في حالة الانقسام	العدد الكلى للخلايا	نقي عظم أجنة المرحلة 38 (12) يوماً من بدء الحضان
	% 0.59	241	40 313	الشاهد
5.2	% 0.88	361	40 890	المشعع بالجرعة 1 غري
4.0-	% 0.41	167	40 212	المشعع بالجرعة 2.5 غري
4.5-	% 0.39	157	40 100	المشعع بالجرعة 5 غري

الجدول 2. القيمة المعيارية منسوبة للشاهد للمقارنة بين المنسب الانقسامى في نقي عظم أجنة المرحلة 40 التي شععت في المرحلة 34 من مراحل التنامى الجنينى، والمنسب الانقسامى في نقي عظم أجنة المرحلة 40 الشاهدة

القيمة المعيارية منسوبة للشاهد	المنسب الانقسامى في 40 000 خلية	عدد الخلايا في حالة الانقسام	العدد الكلى للخلايا	نقي عظم أجنة المرحلة 40 (14) يوماً من بدء الحضان
	% 0.65	264	40.399	الشاهد
5.6	% 0.96	393	40 710	المشعع بالجرعة 1 غري
4.9-	% 0.43	177	40 650	المشعع بالجرعة 2.5 غري
5.3	% 0.41	169	40 592	المشعع بالجرعة 5 غري

الجدول 3. القيمة المعيارية منسوبة للشاهد للمقارنة بين المنسب الانقسامي في نقي عظم أجنة المرحلة 42 التي شععت في المرحلة 34 من مراحل التنامي الجنيني، والمنسب الانقسامي في نقي عظم أجنة المرحلة 42 الشاهدة

القيمة المعيارية منسوبة للشاهد	المنسب الانقسامي في 40 000 خلية	عدد الخلايا في حالة الانقسام	العدد الكلي للخلايا	نقي عظم أجنة المرحلة 42 (16 يوماً من بدء الحضان)
9.4	% 0.72	292	40 182	الشاهد
4.4-	% 1.24	508	40 923	المشع بالجرعة 1 غري
4.9-	% 0.52	215	40 853	المشع بالجرعة 2.5 غري
	% 0.50	203	40 068	المشع بالجرعة 5 غري

الجدول 4. القيمة المعيارية منسوبة للشاهد للمقارنة بين المنسب الانقسامي في نقي عظم أجنة المرحلة 44 التي شععت في المرحلة 34 من مراحل التنامي الجنيني، والمنسب الانقسامي في نقي عظم أجنة المرحلة 44 الشاهدة

القيمة المعيارية منسوبة للشاهد	المنسب الانقسامي في 40 000 خلية	عدد الخلايا في حالة الانقسام	العدد الكلي للخلايا	نقي عظم أجنة المرحلة 44 (18 يوماً من بدء الحضان)
	% 0.84	339	40 265	الشاهد
13.8	% 1.91	766	40 087	المشع بالجرعة 1 غري
4.7-	% 0.58	238	40 579	المشع بالجرعة 2.5 غري
4.9-	% 0.57	235	40 780	المشع بالجرعة 5 غري

لقد لاحظنا في النتائج السابقة أن قيمة المنسب الانقسامي في نقي عظم الأجنة المشععة بالجرعة اغري أكبر من قيمته في نقي عظم الأجنة الشاهدة وفي نقي عظم الأجنة المشععة بالجرعتين 2.5، أو 5 غري وبما أن نتائج القيمة المعيارية التي حصلنا عليها في نقي عظم الأجنة المشععة بالجرعة 1 غري كانت جميعها وفي المراحل الجنينية المدروسة كلها أعلى من القيمة 3، ونتائج القيمة المعيارية التي حصلنا عليها في نقي عظم الأجنة المشععة بالجرعتين 2.5، أو 5 غري كانت جميعها في المراحل الجنينية المدروسة كافة أقل من 3 فيمكن الاستنتاج أن الجرعة 1 غري من أشعة غاما تنشط تكاثر خلايا النقي في حين أن الجرعتين 2.5، أو 5 غري تثبطان تكاثر خلايا النقي مقارنة مع الشاهد.

ولقد حسبت نسبة عدد الخلايا في حالة الانقسام إلى العدد الكلي للخلايا وذلك في توتات وأجره فابريشيوس أربعة أجنة شاهدة وإثنى عشر جنيناً شعماً (أربع أجنة لكل جرعة)، وتم تعيين المنسب الانقسامي في 40000 خلية لمفية تقريباً وحسبت القيمة المعيارية، فكانت النتائج كالتالي:

الجدول 5. القيمة المعيارية محسوبة بالنسبة للشاهد للمقارنة بين المنسب الانقسامي في توتات أجنة المرحلة 44 التي شععت في المرحلة 34 من مراحل التنامي الجنيني، والمنسب الانقسامي في توتات أجنة المرحلة 44 الشاهدة

القيمة المعيارية منسوبة للشاهد	المنسب الانقسامي في 40 000 خلية لمفية	عدد الخلايا في حالة الانقسام	العدد الكلي للخلايا	توتات أجنة المرحلة 44)18 يوماً من بدء الحضان)
	2.4 %	938	39 573	الشاهد
8.4	3.4 %	1357	40 502	المشعع بالجرعة 1 غري
12.2	3.9 %	1595	41 018	المشعع بالجرعة 2.5 غري
4.4	2.9 %	1179	40 929	المشعع بالجرعة 5 غري

الجدول 6. القيمة المعيارية محسوبة بالنسبة للشاهد للمقارنة بين المنسب الانقسامي في أجرة أجنة المرحلة 44 التي شععت في المرحلة 34 من مراحل التنامي الجنيني، والمنسب الانقسامي في أجرة أجنة المرحلة 44 الشاهدة

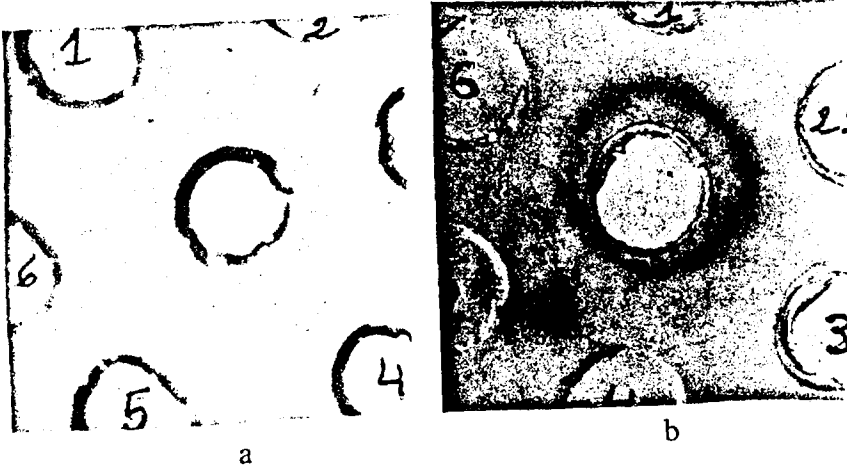
القيمة المعيارية منسوبة للشاهد	المنسب الانقسامي في 40 000 خلية لمفية	عدد الخلايا في حالة الانقسام	العدد الكلي للخلايا	اجرة أجنة المرحلة 44(18) يوماً من بدء الحضن)
	2.0 %	821	40 243	الشاهد
5.7	2.6 %	1 032	40 055	المشعع بالجرعة 1 غري
12.2	3.4 %	1 363	40 056	المشعع بالجرعة 2.5 غري
4.8	2.5 %	1 023	40 270	المشعع بالجرعة 5 غري

ان هذين الجدولين يدلان على ان الجرعة 2.5 غري من اشعة غاما تنشط تكاثر الخلايا في التوتة وفي جراب فابريشيوس اكثر من الجرعتين او 5 غري، واكثر بطبيعة الحال من الشاهد.

2 - أثر التشعيع في الاستجابة المناعية

تم دراسة تأثير الجرعة 1، و 2.5 غري في الاستجابة المناعية، وذلك لارتفاع المنسب الانقسامي في نقي عظم الأجنة المشععة بالجرعة 1 غري، وارتفاع هذا المنسب في توتات وأجنة الأجنة المشععة بالجرعة 2.5 غري. وطبقت تقنية الانتشار المناعي المزدوج على المصل المأخوذة من الدجاجات الناقفة من بيوض شععت في اليوم الثامن من الحضن بالجرعة 1 غري، والناقفة من بيوض شاهدة (10 دجاجات شاهدة، و10 دجاجات شععة) المحقونة بجرعة واحدة من محلول ألومين مصل البقر بتركيز 1 ميلي غراماً / 1 ميلي لترأ درائة/ صوص، وذلك بعد انقضاء 14 يوماً من حقنها بجرعة المذكورة.

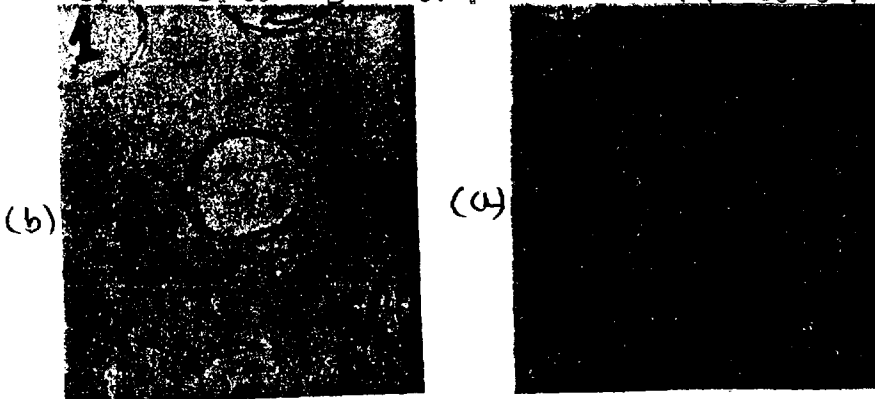
لقد شكلت وصول الدجاجات المشععة خطوط ترسب واضحة، وذلك لتراكيز من المستضد تتراوح بين 2.5-2 ميلي غراماً / 1 ميلي لترأ درائة، أما فصول الدجاجات الشاهدة (غير المشععة) فلم تشكل أي خط ترسب بين البئر المركزية التي تحوي الضد وأي من الآبار المحيطة التي تحوي المستضد بالتراكيز: 1.5، 1.0، 0.5 ميلي غراماً / 1 ميلي لترأ درائة. وفيما يلي الصورتان التي توضح هذه النتائج:



الشكل 1 : صورتان لخطوط الترسيب التي شكلتها وصول دجاجتين لمقارنة الاستجابة المناعية ضد ألبومين مصل البقر بين الشاهد (الصورة a) والمشع (الصورة b).

a، صورة توضح الاستجابة المناعية ضد ألبومين مصل البقر لمصل دجاجة شاهدة، لم يتشكل خط ترسيب بين البئر المركزيه التي تحوي المصل، واي من الآبار المحيطة التي تحوي المستضد بتركيزه المختلفة. b، خط الترسيب لمصل احدى الرجاعات المشعة بين البئر المركزية التي تحوي المصل والبئرين المحيطين رقم 2،1.

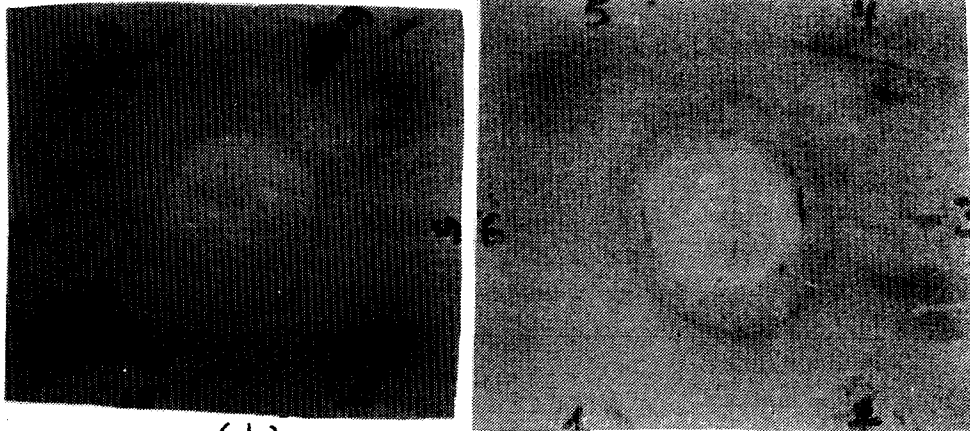
كما طبقت تقانة الانتشار المناعي المزدوج على المصل المأخوذة من الدجاجات الناقفة من البيوض المشعة والبيوض الشاهدة المحقونة بجرعتين من ألبومين مصل البقر بالتركيز 1، و 1.5 ميلي غراماً / 1 ميلي لترأ دارته/ صوص ويفواصل زمنية مدتها 14 يوماً بين الجرعة والأخرى، وذلك بعد انقضاء 14 يوماً من حقنها بالجرعة الثانية. فشكلت وصول الدجاجات المشعة خطوط ترسيب كثيفة وثخينة بالمقارنة مع خطوط الترسيب التي شكلتها وصول الدجاجات الشاهدة، كما يظهر ذلك في الصورتين التاليتين.



الشكل 2 : صورتان توضحان الاستجابة المناعية ضد ألبومين مصل البقر بين شاهد غير مشع (الصورة a) ومشع (الصورة B).

a، صورة تظهر خط الترسيب بين البئر المركزية التي تحوي المصل والآبار المحيطة رقم 3-4،5-5،6 التي تحوي المستضد. b، خط الترسيب لمصل احدى الدجاجات المشععة، بين البئر المركزية التي تحوي المصل والآبار المحيطة التي تحوي المستضد.

ولقد ظهر الاختلاف ذاته بين المشعع والشاهد في مجموعة الدجاجات الناقفة من بيوض شععت في اليوم الثامن من الحضانة بالجرعة 2.5 غري، والناقفة من بيوض شاهدة (غير مشععة) المحقونة بثلاث جرعات من محلول ألبومين مصل البقر بالتركيز 1، و 1.5، و 2 ميلي غراماً / 1ميلي لترأ دارئة/ صوص بحيث يفصل بين الجرعة والأخرى 14 يوماً، وذلك بعد انقضاء 14 يوماً من حقنها بالجرعة الثالثة. فشكلت وصول الدجاجات المشععة خطوط ترسيب ذات ثخانة أكبر من ثخانة الخطوط التي شكلتها وصول الدجاجات الشاهدة. وخطوط الترسيب التي شكلتها وصول الدجاجات المشععة:



(b)

(a)

الشكل 3. صورتان توضحان الفرق في شكل وكثافة خط الترسيب الذي شكلته وصول الدجاجات المشععة الصورة (b). ومصول الدجاجات الشاهدة (الصورة a).

إن هذه النتائج تدل على أن التشعيع في المرحلة 34. باحدى الجرعتين 1 أو 2.5 غري يؤدي إلى زيادة مستوى الاستجابة المناعية في الدجاجات المشععة مقارنة مع الدجاجات الشاهدة، إذ استطاعت الدجاجات الناقفة من البيوض المشععة بالجرعة 1غري أن تستجيب مناعياً ضد ألبومين مصل البقر بدءاً من الجرعة الأولى ذات التركيز 1 ميلي غراماً / 1 ميلي لترأ دارئة/ صوص.

3- تحريض ظاهرة التحمل

لقد حقنت مجموعة من البيوض بمحلول البومين مصل البقر بالتركيز 0.5 ميلي غراماً / 200 مكرو لترأ دارئة/ بيضة، في الايام 8،10،12 من الحضانة. ثم حقنت الصيصان الناقفة من هذه البيوض بثلاث جرعات من المستضد

بالتراكيز 1 و 2,1.5 ميلي غراماً/ ميلي لترأ و اردئة/ صوص، وبفاصل زمني مدته 14 يوماً بين الجرعة والآخرى، أن هذا الحقن اد الى تفعيل خلايا الجهاز المناعي في الدجاجات العائدة لهذه المجموعة، وبالتالي حدوث الاستجابة المناعية..

في حين أن حقن المستضد في البيضة بالتراكيز ذاته (0.5 ميلي غراماً/ 200 ميكرو لترأ دارئة/ بيضة/ ولكن في الايام 8,6,4 من الحقن، ثم حقن الصيصان الناqqة من هذه البيوض بالجرع الثلاث المذكورة من المستضد اد الى نتائج سلبية وذلك بمقارنتها مع مجموعة الشاهد الموافقة لها والتي حققت البيوض العائده لها بالدارئة فقط ثم حقنت الصيصان الناqqة من البيوض الشاهدة بالجرع الثلاث ذاتها من المستضد. ففي الحالة الأولى لم تعرف خلايا الجهاز المناعي المستضد على انه مادة غريبة، ولم تشكل اعداداً له وقد تعود هذه النتيجة الى ظاهرة التحمل. في حين انه في حالة المجموعة الشاهدة تعرفت خلايا الجهاز المناعي المستضد وشكلت اعداداً له.

كما حصلنا على النتيجة ذاتها وذلك لدى حقن مجموعة من البيوض بالمستضد التركيز 1 ميلي غراماً/ 50 مكرو لترأ دارئة/ بيضة، في اليوم السادس من الحضن، وكانت النتيجة ايجابية لدى حقن مجموعة من البيوض بالمستضد بالتركيز 1ميلي غراماً/ 50 مكرو لترأ دارئة/ بيضة، في اليوم الثامن من الحضن.

يمكن ان تستنتج اذن ان حقن المستضد في اليوم الثامن تقريباً ومابعده يؤدي الى تفعيل خلايا الجهاز المناعي. في حين أن الحقن قبل اليوم الثامن تقريباً يحرض ظاهرة التحمل، فيصبح البروتين الغريب هذا جزءاً من الذات، فلا تتعرفه خلايا الجهاز المناعي. ويعتقد ان هذا التحمل يعود الى ظاهرة الجنن النسيلي.

المناقشة

1- تأثير التشيع في المنسب الانقسامي

قد يعود الارتفاع في قيمة المنسب الانقسامي الى تنشيط للمفاويات التي يتضمن عادة خروج الخلية من الصورة G، الامر الذي يؤدي الى زيادة في محتوى الخلية من (RNA)، ويتم في الطور S تركيب (DNA)، ومن ثم ينتقل الخلية الى الطور G₂ حيث تكون في مرحلة انتقالية قبل ان تدخل الطور . لقد تم البرهان على العلاقة (تنشيط- انقسام خلوي) في الحالة الخاصة بالمفاويات منذ اكتشاف التحول بالارومة للمفاوية من قبل Nowell(1960) حيث عرض PHA (الفيتوهي غلوتنن Phylohamag lutinise) في الزرع قصير الامد على ظهور ارومات لمفاوية وخلايا في الطور الانقسامي التالي (وذلك بتحريضة على لافراز عوامل مختلفة قادرة على حقن تكاثر للمفاويات التائية والبائية وتعرف هذه العوامل بالانترلوكينات (Fradeliqui , 1986).

وقد يبدو ان تأثير PHA مشابه للتأثير المنشط للتشيع الذي قد يؤدي

الى تركيب كميات من عوامل النمو اكبر من كميات الحاله السوية. ان عوامل النمو هذه تكون قادرة على تحريض للمفاويات البائية للدخول في الطور G₁.

2 - تأثير التشعيع في الاستجابة المناعية

قد تعود الزيادة في الاستجابة المناعية للدجاجات الناقفة من البيوض انمشعة بإحدى الجرعتين 1 او 2.5 غري في اليوم الثامن من بدء الحضن الى ان التشعيع يؤدي الى تركيب كميات من عوامل النمو اكبر من الكميات المركبة في الحالة الشاهدة (يرجع الى الفقرة السابقة)، حيث تقفل هذه العوامل (الانترلوكينات) الخلايا التائية والبائية. فيفعل الانترلوكين 2- الخلايا التائية ويؤدي الى تنشيط تكاثرها مما يسمح بزيادة عدد الخلايا التي تتفاعل مع المستضد. كما توجد عدة انترلوكينات تفعل للمفاويات البائية وتتدخل في المراحل المختلفة الضرورية لمرور الخلية البائية من خلية في الطور G₀ الى خلية يلزمية وظيفية مفرزة للاضداد. كما يستطيع الانترلوكين-2 ان يفعل للمفاويات البائية بشكل مباشر وذلك لوجود مستقبلات الانترلوكين 2- على سطح اللمفاويات البائية المفعلة تحت تأثير المستضد، فيؤدي الى زيادة عددها وزيادة كمية الغلوبولينات المفرزة (Fnadelyi, 1986). بناء على ذلك، واذا ماتم إيضاح هذه الظاهرة حقليا، فإننا قد نستطيع الاسنفناء عن اللقاحات والمضادات الحيوية التي تعطى للصيصان في المداجن وذلك يتشعيع البيوض، وبالتالي حماية الدجاج من العوامل الممرضة التي قد يتعرض لها.

3- تحريض التحمل

ولن نتأجنا على ان وجود المستضد في البيضة في اليوم الثامن تقريبا من بدء الحضن ومابعده، يحرض استجابة مناعية تعود الى تعرف خلايا الجهاز المناعي على هذه المادة القريبة (البوين مصل البقر) فتتشكل اضدادضدها في حين ان حقن هذه المادة قبل اليوم الثامن من بدء الحضن يحرض ظاهرة التحمل المناعي، ويصبح البروتين الغريب هذا جزءاً من الذات لاتتعرفه خلايا الجهاز المناعي، ولاتشكل بالتالي اضداد ضده. أن اليوم الثامن من الحضن يمثل المرحلة التي تهاجر فيها الخلايا الارومية الى كل من التوتة والجراب. فلقد بينت تجارب le Douasin عام (1975) (يرجع الى Bach 1986)) ان هجرة الخلايا للمفوية الارومية الى الجراب يتم في الفترة الواقفة بين اليوم 10 و14 من بدء الحضن (Roih et al., 1989). كما بينت تجارب الزرع ان التعشيش في الجراب يبدأ في منتصف اليوم الثامن، وينتهي في اليوم 14 تقريبا من بدء الحضن (Housjaint. 1987) ولقد وضحت نتائج تجارب هذه الباحثة (1991) انه يحدث الالتزام بخط تكون الخلية البائية قبل ان تدخل الخلايا الطليعية الى الجراب، فيتم اعادة تراتب جينات السلسلة الخفيفة للغلوبولينات المناعية في اليوم السابع من الحياة الجنينية (Houssaint. 1991). واتت تجارب Polojeki وزملائه (1992) لتأكد ورود الخلايا للمفوية الطليعية الى الجراب على شكل موحة وحيدة تنجز خلال الايام 14-8 من الحياة الجنينية (Paloki 1992).

تدل النتائج التجارب الى قسمنا على ان المستضد الذي حقن قبل اليوم الثامن من بدء الحضن قد التقى الخلايا البائية غير الناضجة بكونها حساسة التوليد ظاهرة التحمل وذلك نتيجة لالغاء نضجها الطبيعي، حتى انها لا تكون قادرة فيما بعد على الاستجابة استجابة طبيعية للتحريض المستضدي. وكذلك تغدو نائل من الخلايا التائية غير الناضجة غير مستجيبة مناعياً (Baeh,1986). وهذا العود الى ان طلائع اللمفاويات تكتسب داخل الاعضاء اللمفية الاولية بعد اليوم الثامن من الحضن القدرة على تعرف المستضدات وذلك بفضل ظهور المستقبلات على سطوحها. (RoiH et al.,1989).

المراجع

1. Bach J.F., "Immunologie", 3eme edition, Flammarion, PARIS, 1986.
 - 2 Goodnow Ch. C., Crosbie. J., Jorgensen H., Brin R.A., And Basten A., Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. Nature., Vo. 432, 1989, Pp. 385-390.
 3. Errera M., Les effets des radiations nucleaires a faibles doses. La Recherche 168, 1985., Pp 959-98.
 4. Hamilton H.L., "Development of the chick an introduction to embryology". NEW YORK, 1952.
 5. Houssaint E., Cell lineage segregation during Bursa of Fabricius ontogeny. J. Immunol, Vol. 138, No. 11, 1987, Pp. 3626-3634.
 6. Houssaint E., Mansikka A., And Vainio O., Early separation of B and T lymphocytes precursors in chick embryo. J. Exp. Med., Vol. 174, 1991 Pp. 397-406.
 7. Kristic R.V., "Encyclopedia of Human Histology". New York -Tokyo, 1984.
 8. Martin C., Lassila O., Nurmi T., Eskola J., Dieterlenlievere F., And Toivanen P., Intraembryonic origion of lymphoid stem cells in the chicken. J. Immunol 10, 1979, Pp. 333-338.
 9. Nemazée D.A., Burki K., Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. Nature, Vol. 337, 1989, 562-566.
 10. Palojoki E., Lassila O., Jalkanen S., And Toivanen P., Ivolvement of the avian u heavy chian in recolonization of the Bursa of Fabricius. J. Immunol 36, 1992, 151-259.
 11. Rodney E. L., "The Immune System", London, 1989.
 12. Roitt I., Brostoff J., Et Male D.K., et MALE D.K., "Immunologie", 2eme edition. Medecine, PARIS, 1989.
- الحسنى مكي، " المدخل إلى الفيزياء النووية، جامعة دمشق، 1986، ص 77-78، ص 187-192.
- الخياط محمد هيثم، " بسائط علم المناعيات جامعة حلب، 1980، ترجمة عن Rزق هاني، " مقدمة في علم المناعة"، جامعة دمشق 1993.
- رزق هاني، محاضرة بعنوان "تأثير التشعيع بجرع متباينة في النسيج والأعضاء النباتية والحيوانية، هيئة الطاقة الذرية 1990.