الترقيم الدولي ٨٦٩٠ - ١٩٩١ ISSN 1991- 8690

استزراع الاكياس العدرية لطفيلي المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* في الفئران المختبرية ودراسة التغيرات النسجية المصاحبة لها

عذراء عبد الامير عزيز الحلفي

قسم علوم الحياة– كلية العلوم – جامعة البصرة

الخلاصة

اجريت الدراسة لمعرفة قابلية نقل الاكياس العدرية بين الفئران ، اذ نقلت الاكياس المعزولة من حيوانات مختبرية مصابة برؤيسات اولية وبعمراصابة ٤ اشهرالى حيوانات سليمة عن طريق الجراحة ، وسببت اصابة الحيوانات بالاكياس المستزرعة بعد شهر من الاستزراع تكوين طبقتين صفائحيتين احدهما متطورة بشكل جيد ومولفة من الياف سميكة ومنتظمة واخرى في بداية تطورها واقل سمكاً مع تكوين طبقة مولدة مؤلفة من اكثر من صف من الخلايا، وكانت حيوانات السيطرة حاوية على اكياس مكونة من طبقة صفائحية واحدة وصف واحد من خلايا الطبقة المولدة كما كانت التغيرات النسجية في الحيوانات التي استزرعت فيها الاكياس اقل شدة من الحيوانات المصابة بالرؤيسات الاولية والتي تمثلت بوجود استجابة التهابية واسعة.ولوحظ زيادة في حجم الاكياس المستزرعة مقارنة مع السيطرة.

المقدمة

يعد مرض الاكياس العدرية Hydatidosis من الامراض المهمة الواسعة الانتشار في العالم ويتسبب هذا المرض بوساطة الطور اليرقي للدودة الشريطية*Echinococcus granulosus* في المضائف الوسطية وهو من الامراض المتوطنة في العراق التي تنتقل من الكلاب السائبة المصابة بهذه الدودة الشريطية (Saeed *et al*.,2000 ; Alwan and Faleh,2001)

يؤثر هذا الطفيلي في انتاجية الاغنام والابقار والماعز والجمال فتصبح اعضاؤها المصابة غير صالحة للاستهلاك البشري ،فضلاً عن كونه سبباً في فقدان الوزن وسوء الحالة الصحية للحيوانات المصابة (Morar and Felman, 2003).

يمتلك طفيلي *E.granulosus* العديد من السلالات حيث اشار Roratto *et al.* (2006) الى وجود اختلافات ضمن النوع الواحد اطلق عليها السلالات وهي تختلف عن بعضها في العديد من الصفات ومن هذه السلالات سلالة الاغنام وسلالة الجاموس وسلالة الجمال وسلالة الابقار.

تختلف الحيوانات المصابة بالاكياس العدرية عن بعضها في نسبة الاصابة ونسبة نمو الطفيلي اذ يتعلق نمو الطور اليرقي بحيوية اليرقة وكفاءة الجهاز المناعي للمضيف (*etal*.,2003 Zhang والخزاعي ،٢٠٠٥).وهذا قد يكون سبب اختلاف نسب الاصابة.

وقد وجدت التميمي (١٩٩٩) ان شدة الاصابة بلغت ١٢ كيس /فأر على خلاف الحلفي (٢٠٠٨) التي وجدت شدة الاصابة ٢٠كيس /فأر بالرغم من حقن الباحثتين لنفس العدد من الرؤيسات الاولية.

ونتيجة لتفاوت اعداد الاكياس للدراسات المختلفة واحجامها جعل من المتعذر تحديد هذه الاختلافات بدقة كونها عائدة الى المعاملة بالادوية المختلفة او اختلاف طبيعي، ورأت الدراسة الحالية اختبار امكانية تحديد اعداد واحجام الاكياس العدرية من خلال استزراعها باعداد ثابته وجعلها طريقة لدراسة تاثير الادوية و تحديد تطور الرد المناعي ضد الاصابة بالاكياس العدرية حسب فترات تطورها.

المواد وطرائق العمل

جمعت عينات الاكياس العدرية من اكباد الاغنام المصابة واعتمدت طريقة Agosin *et al*. (1957) لعزل الرؤيسات الاولية بفتح الكيس العدري وجمع السائل والرؤيسات التي غسلت بمحلول هانك الفسلجي بالاعتماد على Humason (1972) وتم التاكد من حيوية الرؤيسات باستخدام صبغة الايوسين حسب طريقة (Himonas *et al*., 1994) .

اصيب ١٥ فاراً بواقع ١٥٠٠ رؤيس/فأروحقن في التجويف الخلبي Intraperitoneal Cavity وشرحت ١٠حيوانات مصابة بعد ٤ اشهر من الاصابة وتركت ٥ حيوانات كمجموعة سيطرة .

استزراع الاكياس

اختبرت قابلية الاستزراع بين الفئران اذ خدرت ٨ فئران سليمة بواسطة حقنها ٠,٠٥مل من خليط مادتي ٥٠ ملغم /مل Ketamine و٢٠ ملغم/مل Xylazine بحجم ١:٢ في العضلة الفخذية وبعد تخدير الحيوان بشكل كامل عقم سطح البطن بكحول اثيلي ٧٠% وفتحت منطقة البطن بواسطة شفرة حادة معقمة ونقلت الاكياس من التجويف

الخلبي للمضيف الواهب الذي اخذت منه الاكياس الى التجويف الخلبي للمضيف المكتسب الذي استزرعت فيه الاكياس بواسطة ملقط ورقي وخيطت منطقة البطن بخيوط Catgut وبعد مرور شهر من التجربة شرحت الحيوانات ذات الاكياس المستزرعة وحيوانات السيطرة المتروكة واخذت الاكياس واجزاء من الكبد لغرض الدراسة النسجية وقيست اقطارالاكياس ،وقدرت النسبة المئوية لزيادة احجام اكياس الزرع بعد ٥ اشهر حسب المعادلة التالية :-

$$\text{النسبة المئوية لزيادة حجم اكياس الزرع} = \frac{(\text{حجم الاكياس المستزرعة بعد ٥ اشهر} - \text{حجم اكياس السيطرة})}{\text{حجم الاكياس المستزرعة}} \times ١٠٠$$

*حجم الاكياس المستزرعة =حجم الاكياس بعد٤اشهر + ١ شهر استزراع (Fu,1991)

الدراسة النسجية Histological Study

اعتمدت طريقة (1967) .Drury *et al* في التحضير النسيجي اذ ثبتت القطع المأخوذة من الاعضاء المختلفة لحيوان التجربة بكمية مناسبة من 10 % فورمالين لمدة 24 ساعة،ثم غسلت النماذج باستخدام الماء الجاري وسحب الماء بتمريرهابسلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي (50-70-90) % ساعتين لكل تركيز ثم نقلت الى كحول اثيلي مطلق 100% مرتين (ساعة لكل تركيز)،بعدهاروقت النماذج بمادة الكلوروفورم لمدة (12-24)ساعة وشربت بمنصهر شمع البرافين النقي بوضعها بأوعية معدنية خاصة إذ تركت على الصفيحة الحارة بدرجة 60 م ،واخيراًطمرت بعد وضعها في القوالب الخاصة بالطمر واضيف اليها منصهر شمع البرافين النقي بدرجة 60 م مع مراعاة توجيه النماذج باتجاه القطع المطلوب وتركت القوالب لتتصلب بدرجة حرارة الغرفة ،وقطعت النماذج بسمك (5-6) مايكرون باستخدام جهاز المشراح الدوار Rotary Microtome (Reichert-Jung) بعدها نقلت المقاطع الى حمام مائي بدرجة حرارة 45 م لغرض فرش المقاطع ثم التقطت بواسطة شرائح زجاجية مطلية بمادة زلال ماير Mayer's Albumine ووضعت على صفيحة حارة نوع Fisher slide warmer بدرجة حرارة 50 م لمدة 24 ساعة ، وصبغت المقاطع النسجية بصبغة كول هيماتوكسيلين – ايوسين Cole's Eosin-Haematoxylin وحملت بمادة D.P.X ثم وضع غطاء الشريحة وفحصت وصورت بمجهر مركب تصويري نوع Nikon .

النتائج

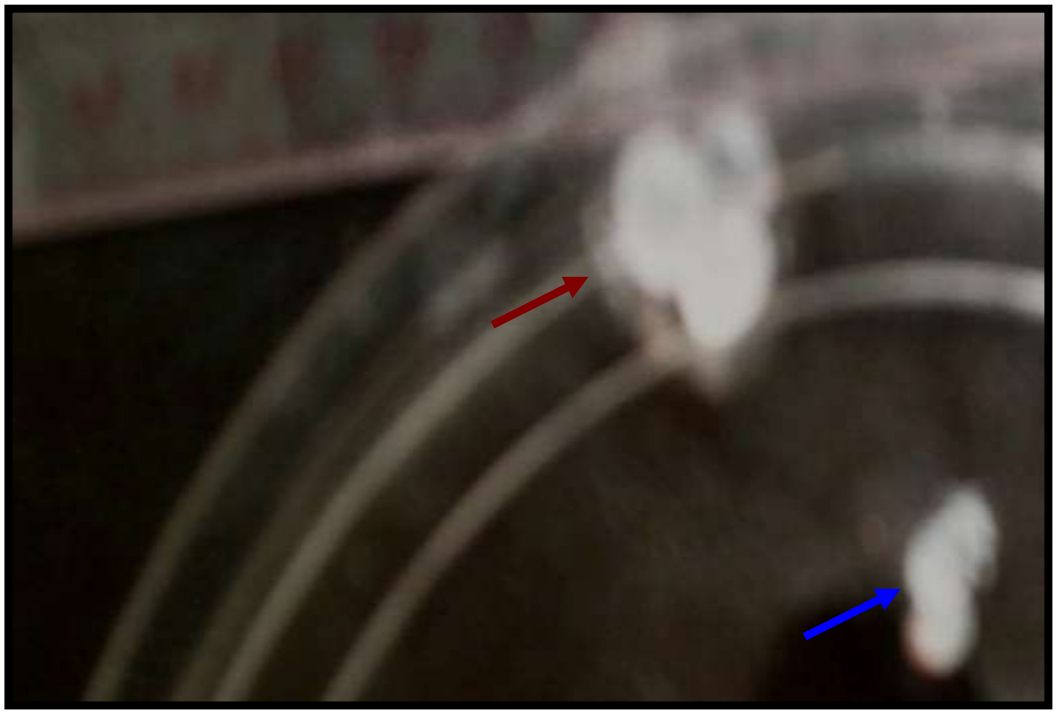
اثبتت الدراسة الحالية ان حقن ١٥٠٠ رؤيس/فأر ادى الى احداث الاصابة، بعد ٤ اشهر من التجربة تراوحت اعداد الاكياس (١٥-٢٠) كيس/فأر واحجامها (١,١-١,٣) ملم في حين بلغت بعد ٥ اشهر (٥٥- ٩٨) كيس /فأرواحجامها (٢,٥-٣,٥) ملم ،على خلاف الاكياس المستزرعة التي بلغت احجامها (٦,٤-٧,٢) ملم وقد بلغت نسبة الزيادة في احجام الاكياس المستزرعة (٢٠-٢٦) % بالمقارنة مع الاكياس المعزولة من حيوانات السيطرة لفترة ٥ اشهر (صورة ١) .

واظهرت المقاطع النسجية بعد ٥ اشهر من بدء الاصابة بالرؤيسات الاولية لطفيلي *E.granulosus* تطور تلك الرؤيسات الى اكياس عدرية فظهرت الطبقة المولدة وهي مؤلفة من صف واحد من الخلايا وطبقة صفائحية منتظمة وسميكة بالاضافة الى وجود طبقة سميكة من خلايا دفاعية تحيط بالطفيلي (صورة ٢).

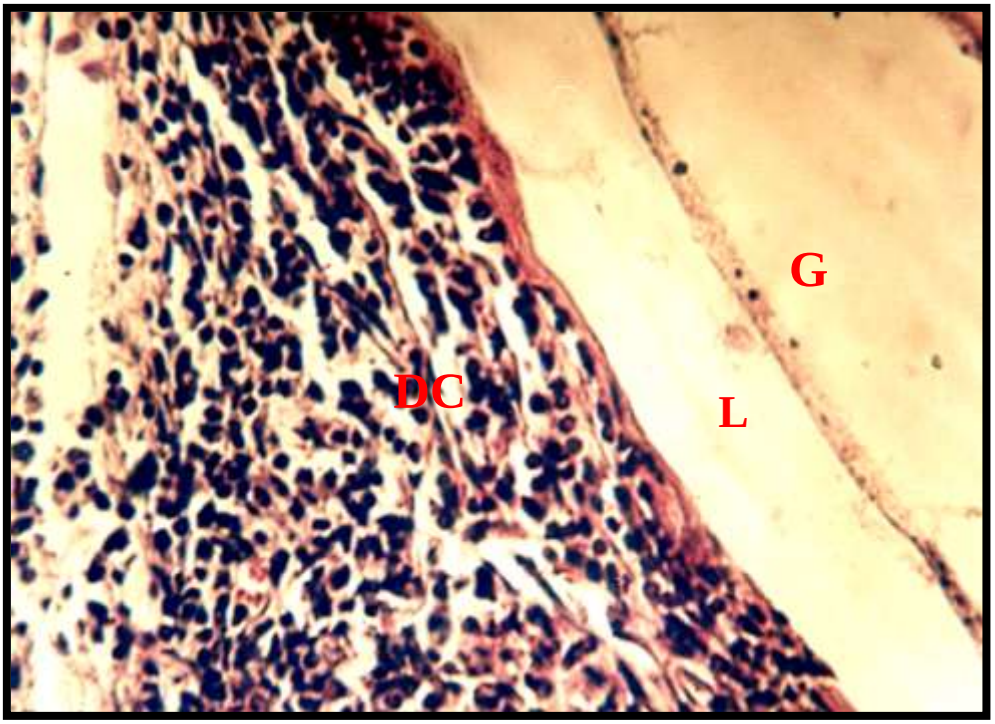
على خلاف مااظهرته المقاطع النسجية للاكياس العدرية بعد شهر من الاستزراع والتي تميزت بظهور طبقتين صفائحيتين احدهما متطورة بشكل جيد ومولفة من الياف سميكة ومنتظمة واخرى في بداية تطورها واقل سمكاً وكذلك وجود طبقة مولدة مؤلفة من اكثر من صف من الخلايا (صورة ٣).

أما فيما يخص التغيرات النسجية لاكباد الحيوانات المصابة بالرؤيسات الاولية فقد ظهرت تغيرات تمثلت بوجود خلايا دفاعية حول الوعاء الدموي (صورة ٤)وتنخر الخلايا الكبدية (صورة ٥) .

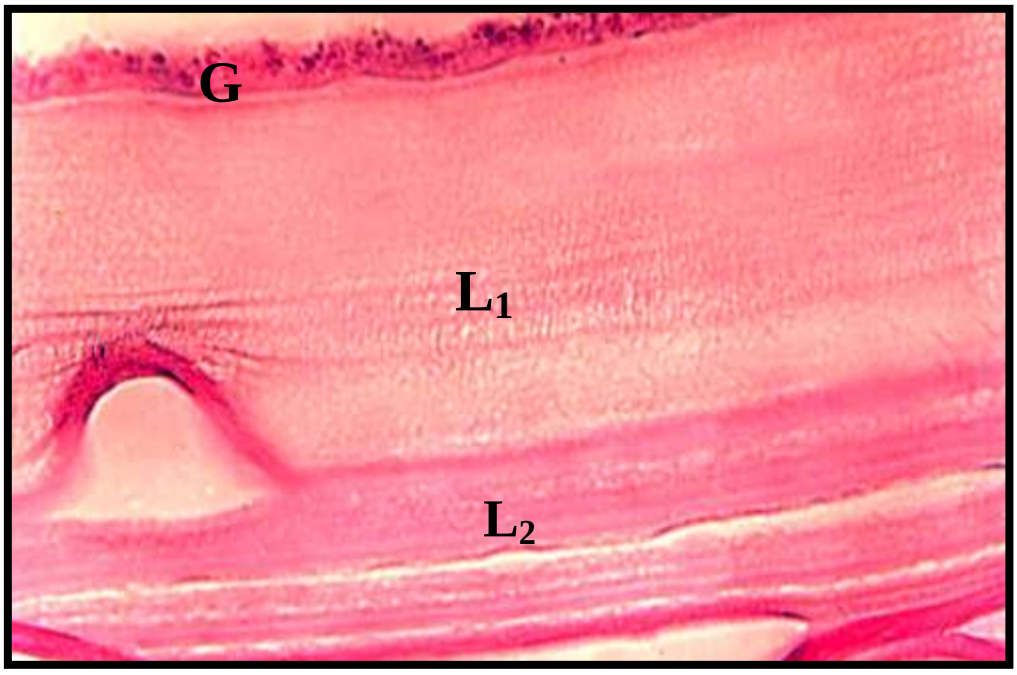
بينما تعرضت اكباد الحيوانات المعزولة من الحيوانات المصابة عن طريق الاستزراع الى تغيرات نسجية اقل حدة واقتصرت على انحلال محدود في سايتوبلازم بعض الخلايا الكبدية (صورة ٦). ولم تسجل حالة وجود الرؤيسات الاولية في الاكياس العدرية المعزولة من الحيوانات المصابة بالرؤيسات الاولية والحيوانات المصابة بالاكياس المستزرعة .



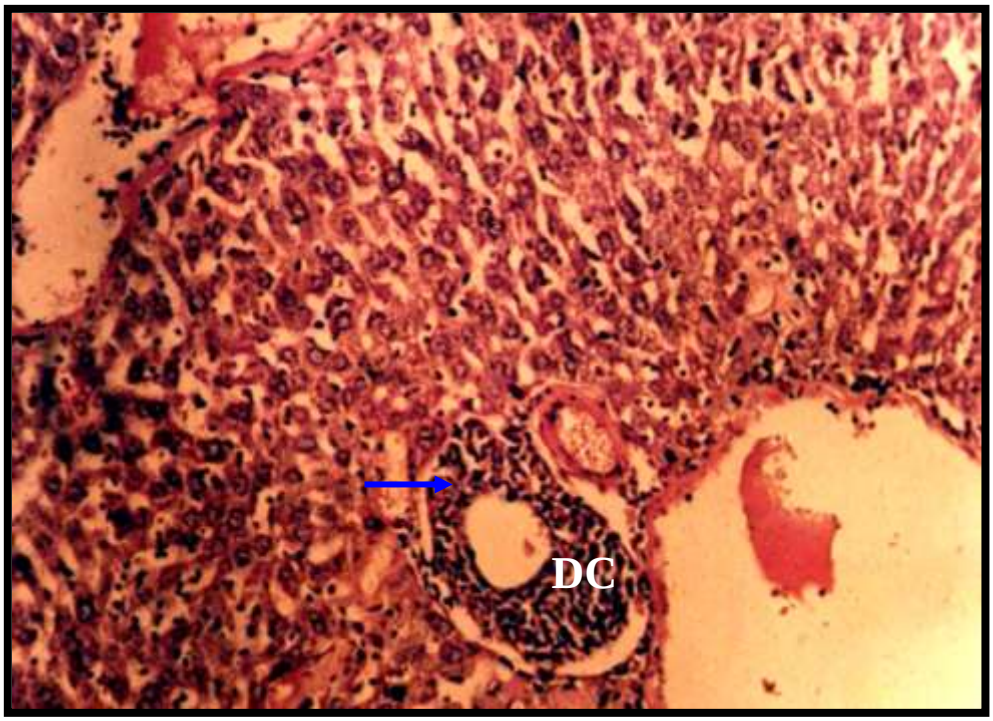
صورة (١) :يظهر فيها كيس عدري بالحالة الطبيعية (→) وكيس عدري مستزرع (→) قوة التكبير X١



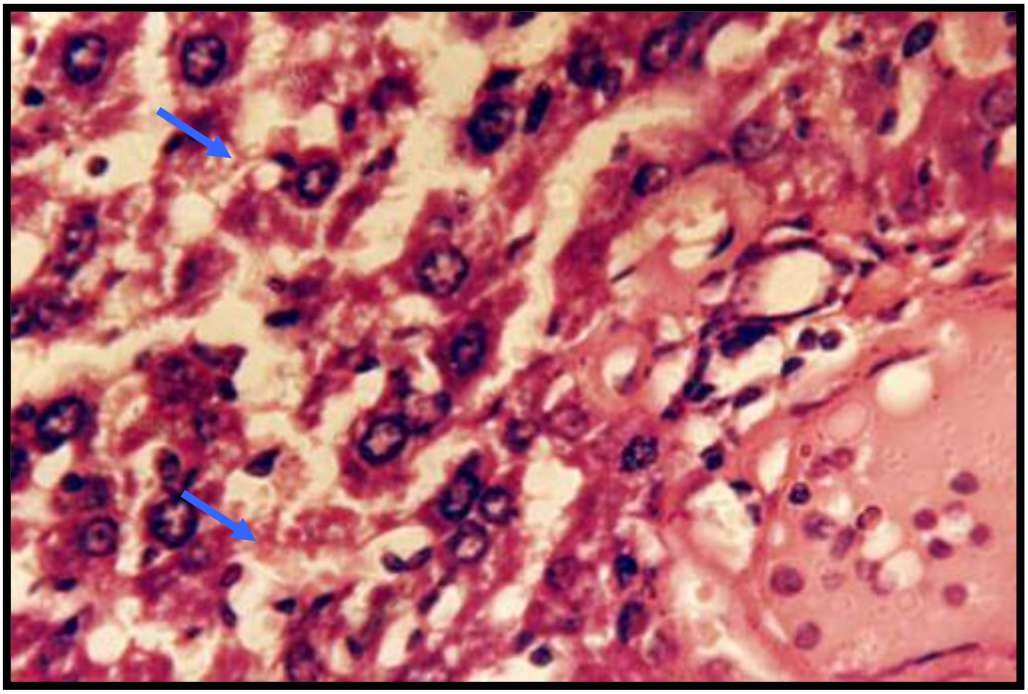
صورة (٢) :مقطع في كيس عدري معزول من فأر مصاب بعد خمسة اشهر من الاصابة تظهر فيه الطبقة المولدة (G) والطبقة الصفائحية (L) والاستجابة الدفاعية للمضيف (DC).صبغة (H.E) X ٤٧٥.



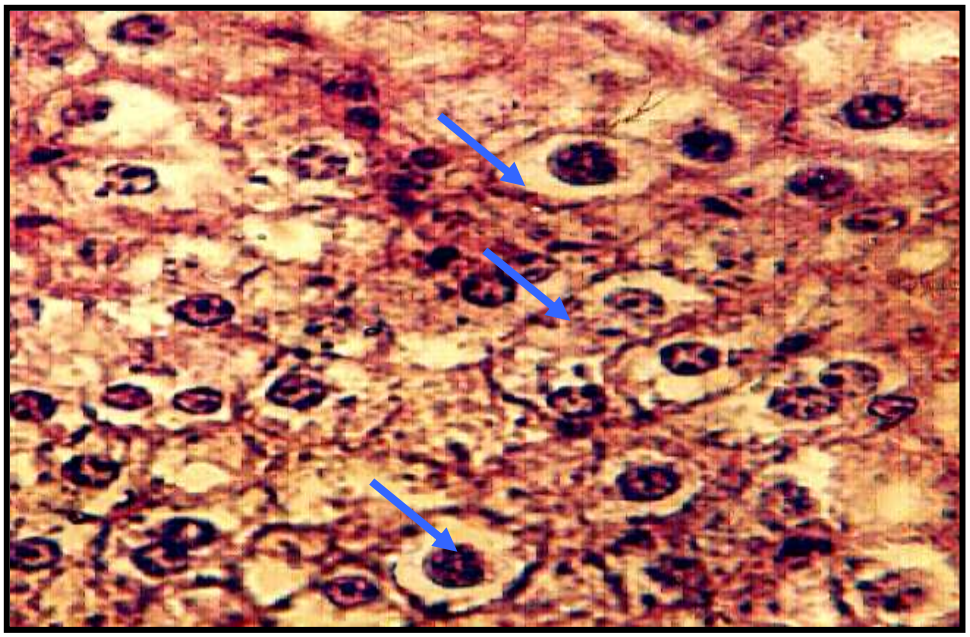
صورة (٣) :مقطع في كيس عدري معزول من فأر مصاب بعد شهر من الاستزراع تظهر فيه الطبقة المولدة (G) وطبقتين صفائحيتين(L_1 و L_2) .صبغة (H.E) X ٤٧٥.



صورة (٤): مقطع في كبد فأرمصاب بالرؤيسات الاولية بعد خمسة اشهر من الاصابة يظهر فيه تجمع خلايا دفاعية (DC) حول الوعاء الدموي(⟶).صبغة (H.E) X ١٩٠



صورة (٥): مقطع في كبد فأرمصاب بالرؤيسات الاولية بعد خمسة اشهر من الاصابة يظهر فيه تنخرالخلايا الكبدية (⟶) .صبغة (H.E) X ٤٧٥



صورة (٦): مقطع في كبد فأر مصاب بعد شهر من الاستزراع يظهر فيه انحلال في سايتوبلازم بعض الخلايا الكبدية(⟶) .صبغة (H.E). ٤٧٥ X

المناقشة

تبين من خلال الدراسة الحالية ان احجام الاكياس المستزرعة اكبر من قريناتها عن طريق الاصابة بالرؤيسات الاولية وقد يعود ذلك الى عدم تطورد الفعل المناعي في حالة الاكياس المستزرعة بسبب ظهورها بشكل مفاجى على الجهاز المناعي في حين كانت الاكياس غير المستزرعة قد نشات من رؤيسات اولية بصورة مباشرة وهذا ادى الى تعرضها للجهاز المناعي لمدة اطول من مرحلة الرؤيسات الى تكون الاكياس مما ادى الى تطور الاستجابة المناعية مع نمو الطفيلي وبالتالي صغرها في الحجم .

اشاركلاً من Arias and Senent (1995) و Dacki *etal*.(2000) الى تطور الجهاز المناعي بتقدم فترة الاصابة فقد وجد ان مستويات الضد المناعي IgG_4 والضد المناعي IgG_1 سوف ترتفع عندما ينمو الكيس بينما ينخفض تركيزها عند حدوث حالة التكلس كما وجد ان الاضداد IgG_2 و IgG_3 تظهر بتقدم فترة الاصابة. وقد يعود تكون طبقتين صفائحيتين في الاكياس المستزرعة الى اختلاف المضيف اذ يكون من المحتمل ان الطفيلي قد كون طبقة صفائحية وطبقة مولدة في المضيف الاول تتوافق مع فسلجة المضيف وعند نقلها الى حيوان اخر قد يتطلب تكون طبقة صفائحية وطبقة مولدة جديدة تتوافق مع فسلجة المضيف الجديد او ان نقل الاكياس الى حيوانات غير محفزة ضد الاصابة بالطفيلي قد شجع نمو الطفيلي السريع بزيادة في سمك الطبقة الصفائحية ونمو الطبقة المولدة لتكوين رؤيسات اولية وقد وجد الزبيدي (١٩٨٩)اختلاف التركيب للطبقة الصفائحية بين الاكياس العدرية من الاعضاء المختلفة في المضيف نفسه والاعضاء المتناظرة في المضائف المختلفة .

واوضح كلاًمن Hemphill and Gottstein (1995) و Galindo *et al.*(2003) ان الطبقة الجرثومية تتكون من خلايا مولدة لها القابلية على الانقسام والتكاثر وتنشا من هذه الطبقة خيوط سايتوبلازمية تعمل على نقل المواد المصنعة لتكوين الطبقة الصفائحية .

اما بالنسبة الى اكباد الحيوانات المصابة بالرؤيسات الاولية فقد لاحظ ارتشاح للخلايا الدفاعية بنسبة اكبر من اكباد الحيوانات ذات الاكياس المستزرعة وقد يعود ذلك تبعاً لحقن الرؤيسات الاولية وعملية تحولها الى اكياس عدرية وقد يتطلب ذلك من الطفيلي التخلص من بعض اجزائه ومنها الكلاليب وقد اكدت الحلفي (٢٠٠٨) ان الرؤيسات الاولية تطلق الكلاليب اثناء عملية تحولها الى اكياس عدرية وبذلك تزداد الاستجابة المناعية خلال عملية التحول .

كما ان عملية النمو للاكياس تتطلب دخول وخروج مواد من والى الاكياس وبذلك تزداد الاستجابة المناعية كما اشار Vedat *et al.*(2001) الى وجود مستضدات في الدم مضادة للاكياس واوضح ازيز(١٩٨٧) وجود انزيمات الكبد GOT,GPT داخل الاكياس مما يدل علىعملية التبادل.

كما قامت التميمي (١٩٩٩) بدراسة تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنبات الحرمل والشيح وقشور الرمان اتجاه الرؤيسات الاولية لطفيلي *E. granulosus* خارج الجسم الحي إذ كان لمستخلص بذور الحرمل كفاءة عالية في قتل الرؤيسات.

واشار الكناني وعلي(٢٠٠٤) الى فعالية المستخلص المائي لنبات عنب الذئب *Solanum nigrum L.* وبتركيز ١٠% على حيوية الرؤيسات الاولية داخل وخارج الجسم الحي إذ لوحظ انخفاض في عدد الاكياس فضلاً عن فشل الاكياس الثانوية في نسيج الكبد .

ودرس الخزاعي (٢٠٠٥) تقييم فعالية مستخلص الحبة السوداء وبعض الادوية والتيار الكهربائي على حيوية الرؤيسات واظهرت الدراسة خارج الجسم الحي بان طريقة التيار الكهربائي المباشر هي الافضل والاسرع في قتل الرؤيسات الاولية

المصادر العربية

ازيز،لندا جاني . (١٩٨٧) .دراسة التركيب الكيميائي للسائل المائي في الاكياس المائية الكبدية في بعض المضائف الوسطية .رسالة ماجستير–كلية العلوم–جامعة صلاح الدين.

التميمي ، ايمان حسين عبد الصاحب .(١٩٩٩) . عزل وتشخيص الحرمين والحرملين من بذور نبات الحرمل ودراسة تأثيرها المضاد على طفيلي الأكياس المائية *Echinococcus granulosus* في الفئران المصابة مختبرياً . رسالة ماجستير – كلية العلوم– جامعة البصرة. ١٣٠ صفحة .

الحلفي ، عذراء عبد الامير عزيز.(٢٠٠٨) . دراسة مقارنة لتأثير عقاري الـ Cisplatin والـ Albendazole في الأصابة بداء الأكياس العدرية Echinococcosis في الفئران المختبرية سلالة Balb/c .رسالة ماجستير–كلية العلوم– جامعة البصرة .٨٥صفحة

الخزاعي ، جاسم حميد .(٢٠٠٥) تقييم فعالية مستخلص الحبة السوداء وبعض الأدوية والتيار الكهربائي على حيوية الرؤيسات الأولية لطفيلي المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* .اطروحة دكتوراة – كلية التربية –جامعة القادسية . ٩٩ صفحة .

الزبيدي ، علي بناوي. (١٩٨٩) . التركيب الكيميائي للسائل العدري والطبقة الصفائحية للمشوكات الحبيبية. رسالة ماجستير – كلية العلوم– جامعة الموصل ١٦٣صفحة.

الكناني ، انتصار رحيم وعلي ، فواز فاضل . (٢٠٠٤) دراسة مقارنة لتأثير المستخلص المائي لنبات عنب الذئب وعقار البندازول على حيوية الرؤيسات الأولية المعزولة من اكياس عدرية في الزجاج وداخل الجسم الحي .كلية القادسية لعلوم الطب البيطري المجلد ٣ ، عدد١ : ٦٤-٦٩

المصادر الاجنبية

- **Agosin , M. T ; Von Brand . F. R and Mc Mahon , P. (1957)** . Studies on the metabolism of *Echinococcus granulosus* 1 – general clinical composition and Respiration Reaction Parasitol . J. 6: 37-51 .
- **Alwan , M. J and Faleh , A. B. (2001) .** Experimental studies infected dogs with *Echinococcus granulosus* origin from goat and cattle . J. Veterinary medicine 25 (2) : 14-26.
- **Arias , I. and Senent , C. J. (1995) .** Toxocariasis : A cause of hyper IgE and eosinophilia . J. Investig . Allergal . Clin. Immunal ., 5 : 232-234.
- **Dacki , A. O ; Craig , P. S and Shambesh , M. K. (2000) .** IgG . Subdass anibody responses and the natural history of hepatic Echinococcosis in asymptomatic patients Ann . Trop. Med. Parasitol . J.94 : 319-328 ..
- **Drury , R. A. V ; Wallington , E. A and Cameron , R. (1967) .** Carleto´s histological techninqua 4th ed Oxford University Press , New York .
- **Fu ,H.**G.(1991).Resources of medicinal plants in China . M.I.O.C.J. 86(2): 9-12
- **Galindo , M** ; **Paredes , R ; Marchant , C ; Mino , V and Galanti , N. (2003)** Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus* .J Cell Biochem., 90 (2) : 249- 303.
- **Hemphill , A and Gottstien , B. (1995) .** Immunology and morphology studies the proliferation of in *In vitro* . Cultivated *Echinosoccus multilocularis* . Metacestoda parasitol . Res.J., 81 : 605-614 .
- **Himonas , C ; Antonindon , S and Popaelopoulos , E. (1994) .** Hydatidosis of feed animal in Greece . Frevalence of Cysts containing viable protoscoleses . J. Helminthol ., 68 : 311-320 .
- **Humason , G. I. (1972) .** Animal and tissue techniques 3rd ed Freeman and company , San Francisco . 534 .
- **Morar , R and Felman , C. (2003) .** Pulmonary echinococcosis . Eur Respir J. 21 : 1069 1077.

- **Roratto , P. A ; santos , M. L. B ; Gutierrez , A. M ; Kamentzky , L; Rosenzvit , M. C and Zaha , A. (2006) .** detection of genetic poly morphism among and within *Echinococcus graunulosus* strains by heteroduplex analysis of microsatellite from the V1 Sn RNA genes .G.M.R .J. 5 (3) : 542-552.
- **Saeed , I ; Kapel , C ; Saida , L. A ; Willingham , L and Nansen , P. (2000)** . Epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Arbil province , northern Iraq , 1990 – 1998 . J. Lidminthol 74 (11) : 3-83.
- **Vedat, B. ; Fulya , I .; Ahmet , Y. ; Suleyman , O. ; Yavus , I. and Ahmet , G.(2001)** . Immunological Follow – up of hydatid cyst cases A.S.M . 96(5):669-671.
- **Zhang , W ; Li , J and Mcmanus , D. P. (2003).** Concepts in Immunology Diagnosis of hydatid Disease A.S.M . J. 16 (1) 18-36

Culturing of *Echinococcus granulosus* cysts in laboratory mice and study of the associated histological changes

Athraa Abd-Al Aziz Al-Hilfy

Biology Department- College of Science- University of Basrah

Summary

This study was carried out to follow liability of transporting hydatid cyst among mice , Cysts isolated from mice labture infected by protoscolex after four month ,and then surgically transpored to uninfected mice. After one month post cultivation the cyst forming two laminated layer ,one of this developed and the other is still in the beginning of development in addition to germinal layer which consist of more row of cells, Control animals had cysts formed from one laminated layer and one row of germ layer.The histological changes in cultivated animals were less sever than animals infected with protoscolex