مجلة علوم ذي قار المجلد ٢(٣) ايلول/٢٠١٠

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 بروؤسكت اولية وبعمر اصابة ٤ اشهر الى 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 بالروؤسكت الاولية والتي تمثلت بوجود استجابة التهابية واسعة.ونوحظ زيادة في حجم الاكياس المستزرعة مقارنة مع السيطرة.

المقدمة

يعد مرض الاكياس العذرية 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 العذرية عن بعضها في نسبة الاصابة ونسبة نمو الطفيلي اذ يتعلق نمو الطور اليرقي بحيوية اليرقة وكفاءة الجهاز المناعي للمضيف (Zhang *etal*..2003 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 بالاذوية المختلفة او اختلاف طبيعي، ورأت الدراسة الحالية اختبار امكانية تحديد اعداد واحجام الاكياس العذرية من خلال استزراعها باعداد ثابته وجعلها طريقة لدراسة تاثير الاذوية و تحديد تطور الرد المناعي ضد الاصابة بالاكياس العذرية حسب فترات تطورها.

المواد وطرائق العمل

جمعت عينات الاكياس العذرية من اكباد الاغنام المصابة واعتمدت طريقة Agosin *et al.* (1957) لعزل الرؤيسات الاولية بفتح الكيس العذري 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) .

تصيب ١٥ فاراً بواقع ١٥٠٠ رؤيس/فأر وحقن في التجويف الغشائي 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 مائي ٥٠ ملغم /مل Ketamine و ٢٠ 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 اقطار الاكياس وقدرت النسبة المئوية لزيادة احجام اكياس الزرع بعد ٥ اشهر حسب المعادلة التالية :-

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

*حجم الاكياس المستزرعة =حجم الاكياس بعد ٤ اشهر + ١ شهر استزراع (Fu,1991)

الدراسة النسجية Histological Study

اعتمدت طريقة Drury *et al.* (1967) 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 بتمريرها بسلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي (50-70-90) % ساعتين لكل تركيز ثم نقلت الى كحول اثيلي مطلق 100% مرتين (ساعة لكل تركيز) بعدها روقت النماذج بمادة الكلوروفورم لمدة (12-24 ساعة وشربت بمنصهر شمع البرافين النقي بوضعها بأوعية معدنية خاصة إذ تركت على الصفيحة الحارة بدرجة 60 م واخيراً طمرت 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 Mayers 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

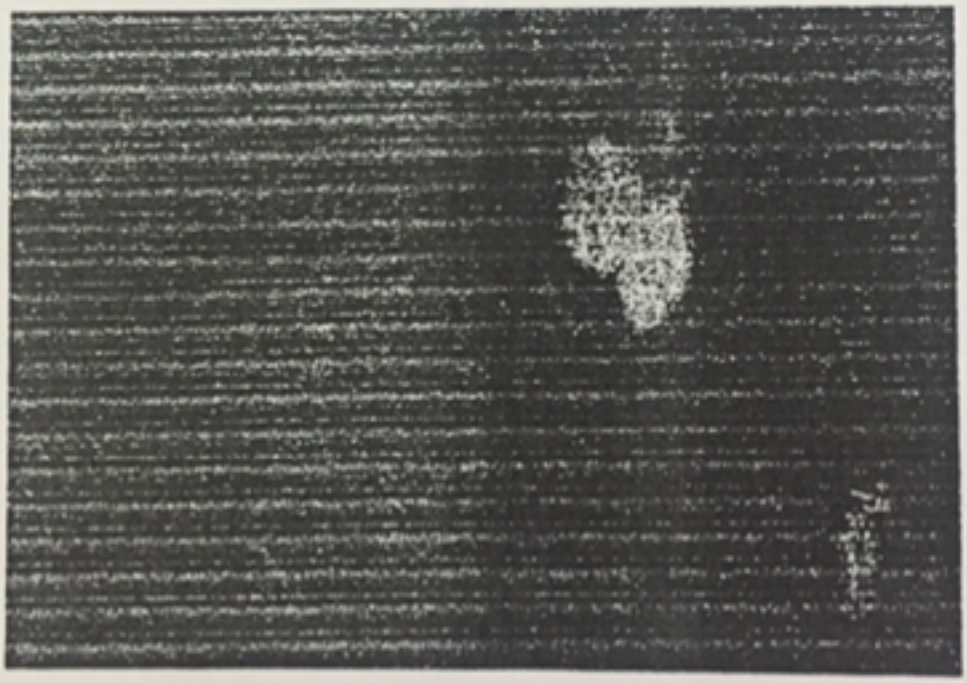
اثبتت الدراسة الحالية ان حقن ١٥٠٠ رؤوس/فأر ادى الى احداث الاصابة، بعد ٤ اشهر من التجربة تراوحت اعداد الاكياس (١٥-٢٠) كيس/فأر واحجامها (١,١-١,٣) ملم في حين بلغت بعد ٥ اشهر (٥٥- ٩٨) كيس /فأر واحجامها (٢,٥-٣,٥) ملم ،على خلاف الاكياس المستزرعة التي بلغت احجامها (٦,٤-٧,٢) ملم وقد بلغت نسبة الزيادة في احجام 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 عذرية 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).

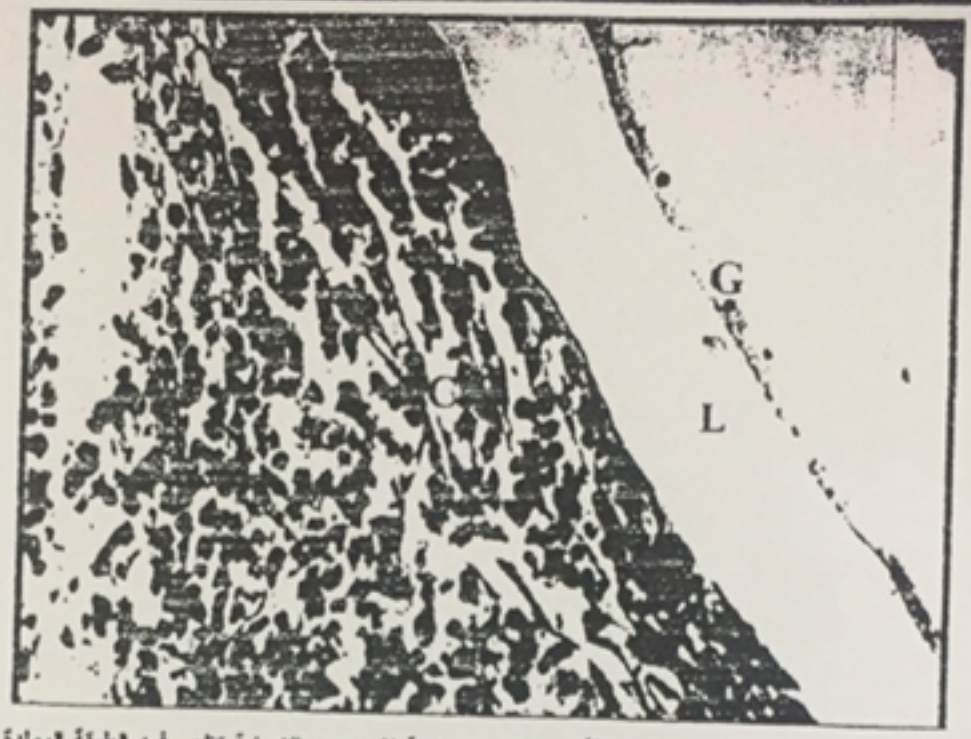
على خلاف مالظهرته المقاطع النسجية للاكياس العذرية بعد شهر من الاستزراع والتي تميزت بظهور طبقتين صفائحيتين احدهما متطورة بشكل جيد ومولفة من الياف سميكة ومنتظمة واخرى في بداية تطورها واقل سمكا وكذلك وجود طبقة مولدة مؤلفة من اكثر من صف من الخلايا (صورة ٣).

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) .

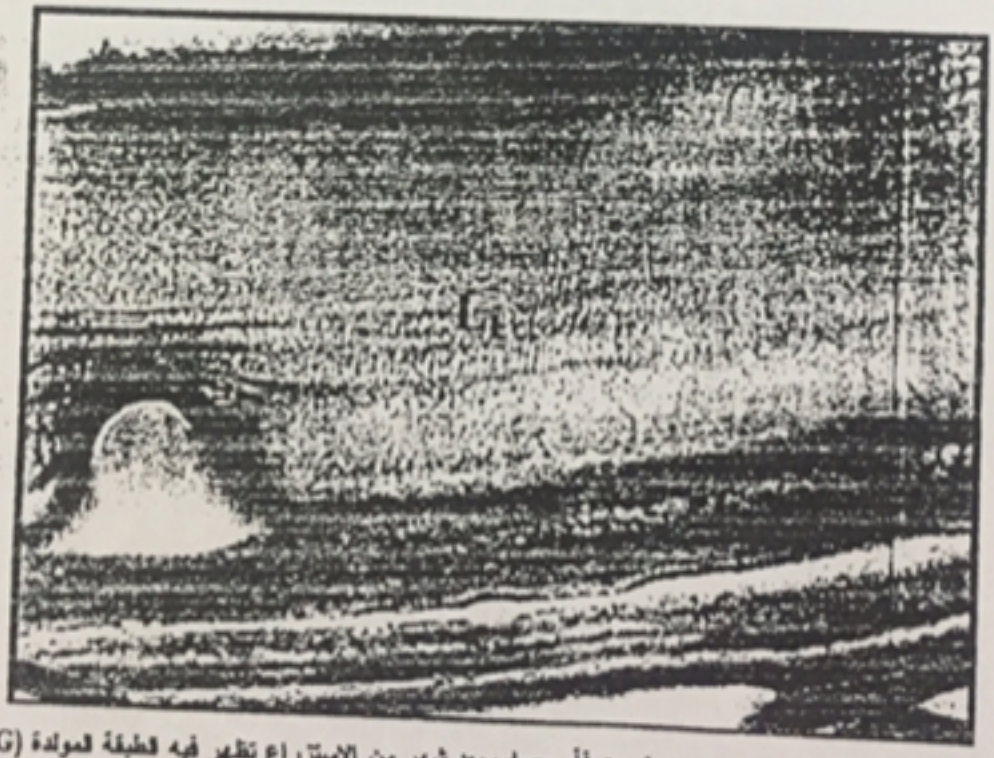
بينما تعرضت اكباد الحيوانات المعزولة من الحيوانات المصابة عن طريق الاستزراع الى تغيرات نسجية اقل حدة واقتصرت على انحلال محدود في سايتوبلازم بعض الخلايا الكبدية (صورة ٦). ولم تسجل حالة وجود الرؤيسات الاولية في الاكياس العذرية المعزولة من الحيوانات المصابة بالرؤيسات الاولية والحيوانات المصابة بالاكياس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



صورة (١) يظهر فيها كيس عذري بالحالة الطبيعية (←) وكيس عذري مستزرع (←) قوة التكبير X١

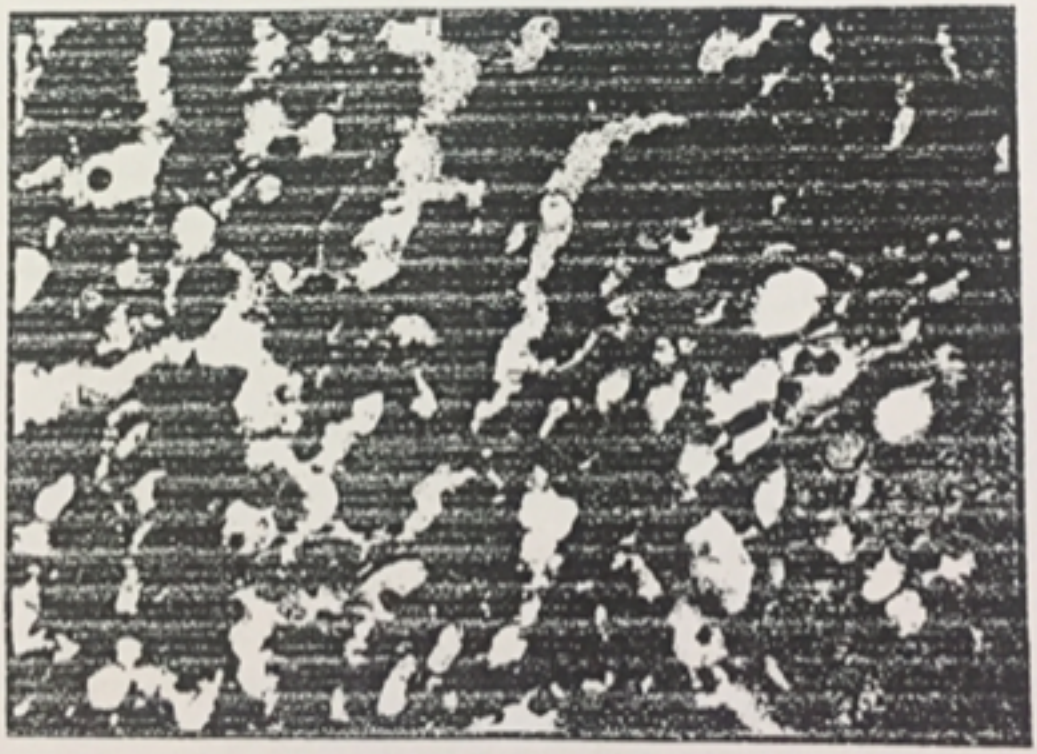


صورة (٢) :مقطع في كيس عدري معزول من فأر مصاب بعد خمسة اشهر من الاصابة تظهر فيه الطبقة المولدة (G) والطبقة الصفائحية (L) والاستجابة الدفاعية للمضيف (DC)صبغة (H.E) X ٤٧٥.



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 تنخر الخلايا 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). X ٤٧٥

المناقشة

تبين من خلال الدراسة الحالية ان احجام الاكياس المستزرعة اكبر من قرينتاتها عن طريق الاصابة بالرؤيسات الاولية وقد يعود ذلك الى عدم تطوررد الفعل المناعي في حالة الاكياس المستزرعة بسبب ظهورها بشكل مفاجئ على الجهاز المناعي في حين كانت الاكياس غير المستزرعة قد نشئت 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 .

اشار كلاً من Arias and Senent (1995) و Dacki *etal*.(2000) الى تطور الجهاز المناعي بتقدم فترة الاصابة فقد وجد ان مستويات الضد المناعي IgG_1 والضد المناعي IgG_2 سوف ترتفع عندما ينمو الكيس بينما ينخفض تركيزها عند حدوث حالة التكلس كما وجد ان الاضداد IgG_2 و IgG_1 تظهر بتقدم فترة الاصابة. وقد يعود تكون طبقتين صفاتحيتين في الاكياس المستزرعة الى اختلاف المضيف اذ يكون من المحتمل ان الطفيلي قد كون طبقة صفاتحية وطبقة مولدة في المضيف الاول تتوافق مع فسلجة المضيف وعند نقلها الى حيوان اخر قد يتطلب تكون طبقة صفاتحية 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 الصفاتحية ونمو الطبقة المولدة لتكوين رؤيسات اولية وقد وجد الزبيدي (١٩٨٩)اختلاف التركيب للطبقة

الصفاحية بين الاكياس العذرية من الاعضاء المختلفة في المضيف نفسه والاعضاء المتناظرة في المضائف المختلفة .

ولوضح كلاً من 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 الصفاحية .

اما بالنسبة الى اكباد الحيوانات المصابة بالرؤيسات الاولية فقد لاحظ فرنشاح للخلايا الدفاعية بنسبة اكبر من اكباد الحيوانات ذات الاكياس المستزرعة وقد يعود ذلك تبعاً لحقن الرؤيسات الاولية وعملية تحولها الى اكياس عذرية 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 عذرية 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 ولوضح ازيز(١٩٨٧) وجود انزيمات الكبد GOT.GPT داخل الاكياس مما يدل على عملية 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 الثعلب *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 تسويح 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 ختدا جلقي . (١٩٨٧) .دراسة التركيب الكيميائي للسائل المائي في الاكياس المائية الكبدية في بعض المضائف الوسطية رسالة ماجستير -كلية العلوم-جامعة صلاح الدين.

التميمي ، ليمان 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 العذرية 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*. أطروحة دكتوراة – كلية التربية -جامعة القادسية . ٩٩ صفحة .

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

الكناني ، قتصار رحيم وعلي ، فواز فاضل . (٢٠٠٤) دراسة مقارنة لتأثير المستخلص المائي لنبات عنب الثعلب وعقار البندازول على حيوية الرؤيسات الأولية المعزولة من الكيس 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 , L 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