دراسة مرضية وكيميائية نسيجية في الأمعاء الغليظة المخمجة تجريبيا بالاميبا الحالة للنسيج في الفئران

انتصار رحيم الكناني*، دعاء محمد يحيى** واحمد نجم عبد الله*
* فرع الأمراض وأمراض الدواجن– كلية الطب البيطري/ جامعة الموصل
**فرع العلوم الطبية الأساسية– كلية التمريض/ جامعة الموصل

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة معرفة التغيرات المرضية وكيمياء النسيج لأمعاء (القولون والأعور والمستقيم) الفئران المخمجة بالاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* تجريبيا ، إذ ظهرت النتائج وجود التهاب القولون النخري Necrotizing colitis والتهاب الأعور النخري الدموي Hemorrhagic necrotizing typhylitis والتهاب المستقيم النخري necrotizing proctitis بعد مرور 21 يوما من الإصابة.

كما وأظهرت لتغيرات في كيمياء النسيج وجود تفاعل موجب شديد جدا مع تقنية حامض البريوديك شيف وتفاعل موجب الشديد مع تقنية ازرق الاليشيان والتفاعل الموجب مع تقنية البيست كارمين.

تستنتج هذه الدراسة وجود زيادة في المركبات المعقدة والمتمثلة بالمواد المخاطية المتعددة السكريدات المتعادلة فضلا عن الزيادة في حامض السيالوميوسين والكلايكوجين في الخلايا الظهارية المبطنة للطبقة المخاطية للأجزاء الأمعاء المتمثلة بالقولون والأعور والمستقيم.

Pathological and Histochemical Study in the large intestine experimentally infected with *Entamoeba histolytica* in mice

E. R. Al-Kennany*, D. M. Yahya and A. N. Abd- Allua***
***Dep. of Pathology- College of Veterinary medicine\ University of Mosul**
****Dep. of Basic Science- Nursing College\ Mosul University**

Abstract

This study was conducted to investigate the pathological and histochemical changes in the large intestine (Colon, Ceacum and Rectum) in mice experimentally infected with *Entamoeba histolytica* .

The results revealed the presence of necrotizing colitis , Hemorrhagic necrotizing typhylitis and necrotizing proctitis after 21 day post infection. Also the changes in histochemistry revealed very high positive reaction with periodic acid shiffs, high positive reaction with Alcian blue and positive reaction with best carmine stains.

The study concluded the presence of complex compound represented by natural mucopolysaccharid as well as increase in sialomucine and glycogen in epithelial cells lining mucosal layer of the large intestine (Colon, Ceacum and rectum).

المقدمة

مرض الزحار Dysentery من الأمراض الواسعة الانتشار في العالم التي تصيب الإنسان والحيوان محدثة آفات مرضية مختلفة قد تؤدي إلى الموت كما هو الحال في خمج الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* وتتواجد الأميبات في الماء والتربة ومادة النبات المتفسخة (1). وتصنف الاميبا الحالة للنسيج امراضيا إلى E. histolytica sensu, stricto وغير ممرضة *E. dispar* (2).

ان خمج الاميبا الحالة للنسيج يعتمد على شدة الإصابة ومقاومة المضيف وحالة القناة الهضمية في تأثيراته المرضية (3).وتظهر التأثيرات المرضية للخمج بنوعين الأول معوي والثاني نسيجي أي خارج الأمعاء extra-intestinal وتشمل الكبد والرئة وخراجات الدماغ (4، 5). وقد يكون الخمج حادا acute amoebiasis أو خمجا مزمنا chronic amoebiasis ، وتتميز أعراضه بالمغص الحاد cramping والإعياء fatigue والقرحة مع الم بالجزء السفلي في البطن فضلا عن وجود الدم في الغائط مع ظهور أشكال الطفيلي المتمثلة بالطور الخضري الناشط trophozite وما قبل التكيس precyst phase والطور الكيسي cyst phase (الطور المعدي) (6، 7).

ونظرا لما تحدثه هذه الأطوار في جدار الأمعاء من تغيرات مرضية نسيجية تم تصميم هذه الدراسة لمعرفة التغيرات الكيميائية النسيجية التي ترافق التغيرات المرضية الناتجة عن الخمج.

المواد وطرائق العمل

تم استخدام 10 فئران بيضاء نوع Balb/c وبوزن 25-26 غرام، وزعت عشوائيا إلى مجموعتين (5 فئران لكل مجموعة) المجموعة الأولى عدت مجموعة سيطرة وحقنت بالماء المقطر. أما المجموعة الثانية فقد حقنت بمعلق الأكياس في المحلول الفسلجي بجرعة 7×10^4 كيس/سم^3 عن طريق المريء intra-esophageal باستخدام اللي المعدي stomach tube وضعت الفئران في أقفاص بلاستيكية خالية من نشارة الخشب ، وتم جمع البراز يوميا لمدة 6 أيام لغرض التأكد من حدوث الإصابة وبعد مرور 21يوما على الإصابة تم قتل الفئران وا جراء الصفة التشريحية عليها لملاحظة الآفات المرضية العيانية ان وجدت بعدها تم غمر 1سم من الأمعاء الغليظة من منطقة الأعور والقولون والمستقيم في محلول bouins لغرض تحضير بلوكات شمعية وتقطيعها إلى شرائح نسيجية باستخدام المشراح وبسمك 4-6 مايكروميتر ثم صبغت بصبغة الهيماتوكسلين ايوسين الاعتيادية (8).

- **تقنيات كيمياء النسيج**

لغرض دراسة التغيرات في مكونات كيمياء النسيج عند الخمج باميبا الزحار، ومقارنتها مع مجموعة الفئران غير المخمجة استخدمت التقنيات الآتية:

- **كيمياء نسيج الكربوهيدرات**

1. تقنية حمض البريوديك – شيف Periodic acid shiffs technique (PAS) : حضرت الصبغة حسب طريقة McManus (1946) والمذكور في (9).
2. الاستلة – تقنية حمض البريوديك – شيف Acetylation - Periodic acid shiffs technique. حسب طريقة Lillie (1954) المذكور في (10) .
3. الاستلة الصونية – تقنية حمض البريوديك – شيف Acetylation Saponification – PAS. أجريت حسب طريقة Spicer (1960) والمذكورة في (10)

- تقنية الاليشيان الزرقاء عند الدالة الحامضية Alcian -blue technique PH $_{2\text{-}5}$ (AB) pH2-5: حضرت الصبغة حسب طريقة Steedman (1950) والمذكورة في(9).
- تقنية المثيلة – ارزق الاليشيان Methylation – Alcian blue technique: أجريت حسب طريقة Spicer and Colleagues (1967) والمذكورة في(9).
- المثيلة – الصونية – ازرق الاليشيان Methylation – Saponification – AB (pH 2-5):
- تقنية البيست كارمين Bests carmine technique: حضرت حسب طريقة Best (1906) والمذكورة في(9).

النتائج

- **التغيرات المرضية**
- **التغيرات المرضية العيانية.**

بعد إجراء الصفة التشريحية عند انتهاء التجربة (ثلاثة أسابيع) للفئران المصابة باميبا الحالة للنسيج لوحظ انتفاخ شديد للأمعاء مع تلونها باللون الأخضر واحتقان الأوعية الدموية في الطبقة المصلية خاصة عند منطقة الأعور.

- **التغيرات المرضية النسيجية.**

لوحظ وجود التغيرات المرضية النسيجية للأمعاء الغليظة (في منطقة القولون) في الفئران المحقونة بأكياس الاميبا الحالة للنسيج تمثلت بنخر وتوسف الظهارة في الطبقة المخاطية مع فرط التنسج hyperplasia للخلايا الظهارية المبطنة للغدد المعوية يصاحبها تكاثر وارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة النواة فضلا عن التنكس المخاطيني في الخلايا المبطنة للزغابات مع وجود للمراحل المختلفة للطفيلي. تكررت هذه الآفات في كل من الأعور والمستقيم فضلا عن تضخم الطبقة العضلية والنزف الشديد مع ملاحظة وجود الناشطات وتكاثر للخلايا اللمفية وتندرج هذه التغيرات تحت مسميات الآفات المرضية المتمثلة بـ: Necrotizing colitis و Necrotizing typhlitis و Necrotizing proctitis صورة (1، 2، 3).

- **كيمياء النسيج**

(الجدول –1) اظهر التفاعل الموجب الشديد جدا مع الأمعاء في الأعور والتفاعل الموجب الشديد مع كل من القولون والمستقيم (الصورتان 4، 5) عند استعمال صبغة PAS. في حين كان التفاعل سالب مع أجزاء الأمعاء المذكورة أعلاه عند استعمال تقنية الاستلة يتبعها صبغة PAS وعادة التفاعل موجبا مع أجزاء الأمعاء المختلفة والمتمثلة بالقولون والأعور والمستقيم.وباستخدام تقنية ازرق الاليشان عند الدالة الحامضية ظهر التفاعل موجبا شديدا مع كل من القولون والأعور والمستقيم (الصور 6، 7، 7).

أما عند استخدام تقنية البيست كارمن فقد ظهر التفاعل موجبا مع أجزاء الأمعاء المختلفة (القولو ن والأعور والمستقيم).

المناقشة

أظهرت الدراسة الحالية قابلية الاميبا الحالة للنسيج على إحداث الآفات المرضية النسيجية في كل من القولون والأعور والمستقيم تمثلت بالتنكس المخاطيني وبالتهاب القولون النخري والتهاب الأعور النخري والتهاب المستقيم النخري في الفئران المخمجةتجريبيا فضلا عن وجود الناشطات ملتصقة في ظهارة الطبقة المخاطية وعدم وجودها

في الطبقات المتبقية من الأمعاء ، يشير ذلك على ان الإفرازا ت المخاطية من قبل خلايا كوبلت قد حدت من اختراق تلك الناشطات لطبقات الأمعاء الأخرى وهذا يتفق وما ذكره (11).

أظهر ت نتائج الدراسة الكيميائية للنسيج عند استخدام صبغة PAS تفاعل موجب شديد جدا يؤيد وبشكل وثيق مع ما ذكر أعلاه حيث يتكون حاجز وقتي يمنع مرور واختراق الناشطات لطبقات الأمعاء (3).

كذلك أظهرت دراسة كيمياء النسيج لكربوهيدرات الأمعاء المخمجة باميبا الحالة للنسيج التفاعل الموجب الشديد مع تقنية PAS، وهو يشير إلى قابلية الطفيلي على تحفيز الخلايا المسؤولة عن إفراز المواد المخاطية الحاوية على المواد السكرية والكلوبيولينات المناعية مثل 1gA لتصنيع حاجز يمنع اختراق الناشطات في كل من القولون والأعور والمستقيم. ان التفاعل الموجب الشديد جدا مع تقنية PAS يشير إلى وجود وتحفيز متعدد السكريدات المخاطية البروتينية.

ان هذه النتائج تشير إلى أهمية الكربوهيدرات التي يستخدمها الطفيلي في الحماية من الاستجابة المناعية للمضيف ، فضلا عن احتواء الأجزاء السكرية على شحنات سالبة تحمل على سطح الخلايا، وهي ذات خاصية استضادية تساعد في عملية اختراق الخلايا الطلائية وذلك عن طريق التأثيرات الأيونية المحيطة بالخلية.

وأظهرت تقنية لمثيلة تبعها ازرق الاليشان تفاعلا سالبا مع أجزاء الأمعاء المذكورة وعاود التفاعل الموجب الشديد مع أجزاء الأمعاء المختلفة Protein – mucopoly saccharide والبروتينات السكرية glycoprotein والتي قد تستخدمها الاميبا في عملية التكاثر. بينت نتائج التفاعل السلبي مع صبغة PAS بعد الاستلة إلى وجود مجاميع كلايكول الفعالة 1:2 glycol group ذات الطبيعة السكرية والتي حجبت اثر الاستلة وكانت المسؤولة عـ ن التفاعل الموجب مع تقنية PAS لوجود مجاميع الكاربوكسيل الجانبية وكما أكد احد الباحثين على ان الصونية تستخدم للتمييز بين مجاميع الكاريوكسيل الطرفية والجانبية (9).

كما أظهرت نتائج هذه الدراسة تفاعل الموجب الشديد مع تقنية ازرق الاليشيان عند الدالة الحامضية 5-2 وهي تشير إلى زيادة في إفراز عديد السكريدات المخاطية الحامضية الكبريتية (sulphated acid mucopoly saccharide) في الخلايا الظهارية (خلايا كوبلت) المبطنة للطبقة المخاطية المعوية لأجزاء الأمعاء المختلفة وهي من النوع الضعيف(weakly acidic Sulphated acid mucopoly saccharide) ومن نوع Sialomucin وهذا يؤكد سيادة مجموعة الكاربوكسيل على المجموعات الكبريتية وهذا يتفق مع ما ذكره (12، 13).

ان نتائج التفاعل السالب مع تقنية ازرق الاليشيان بعد المثيلة تشير إلى زيادة في تكوين السكريدات المخاطية الضعيفة الحامضية الكبريتية والتي قد تستهلك من قبل الطفيلي في عملية الانقسام، وتشير نتائج التفاعل الموجب بعد المثيلة والصونية وجود زيادة في إفراز عديد السكريدات المخاطية الحامضية من نوع كاربوكسيل وهي يتفق مع ما أشار إليه (14).أما نتائج التفاعل مع تقنية بيست كارمين والذي كان موجبا شديدا فتشير إلى إفراز الكلايكوجين بكميات كبيرة في الخلايا الظهارية في الطبقة المخاطية والغدد المعوية (كوظيفة تعويضية) والتي ربما قد يستهلكها الطفيلي كمصدر ضروريلطاقة للقيام بالفعاليات الايضية وا كمال دورة الحياة عند استعمال المثيلة – الصونية يتبعها ازرق الاليشيان.

جدول (1) تفاعلات كيمياء النسيج مع كل من القولون والأعور والمستقيم في الفئران المخمجة بالاميبا الحالة للنسيج

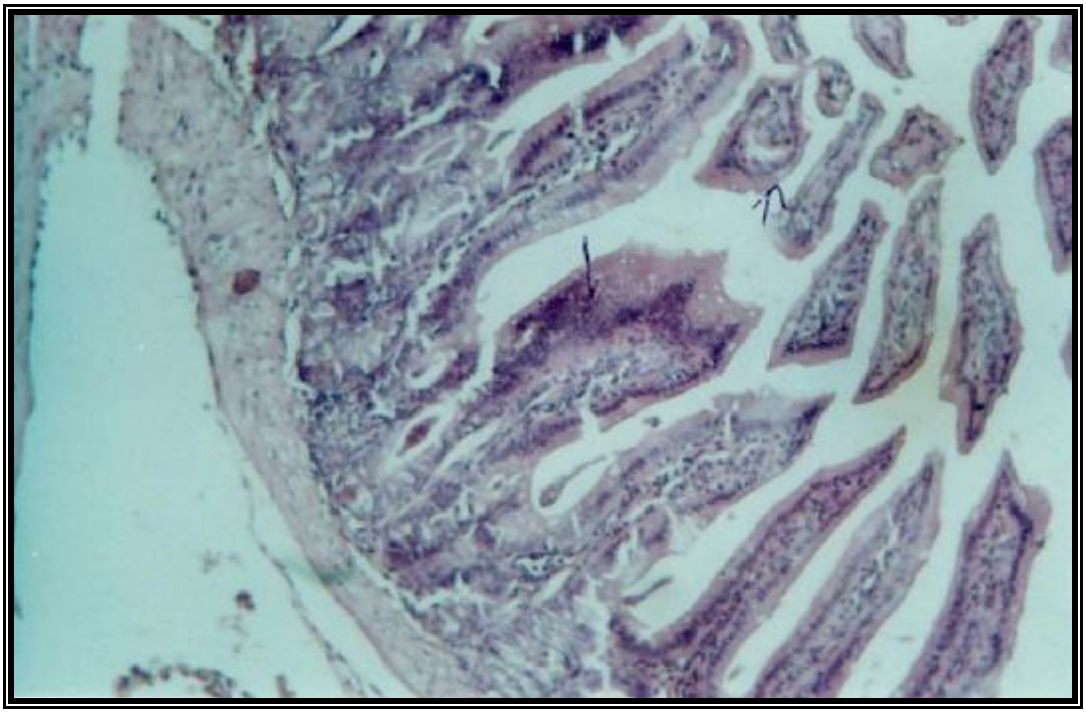
ت	التقنيـة	نوع العينة		
		القولو ن Colon	الأعور Cecum	المستقيم Rectum
.1	تقنية PAS	+++	++++	+++
.2	الاستلة – PAS	–	–	–
.3	الاستلة – الصونية – PAS	+++	++++	+++
.4	ازرق الاليشيان pH2-5	+++	+++	+++
.5	المثيلة – ازرق الاليشيان pH2-5	–	–	–
.6	المثيلة – الصونية – ازرق الاليشيان pH2-5	+++	+++	+++
.7	بيست كار من BC	++	++	++

++++ تفاعل موجب شديدجدا

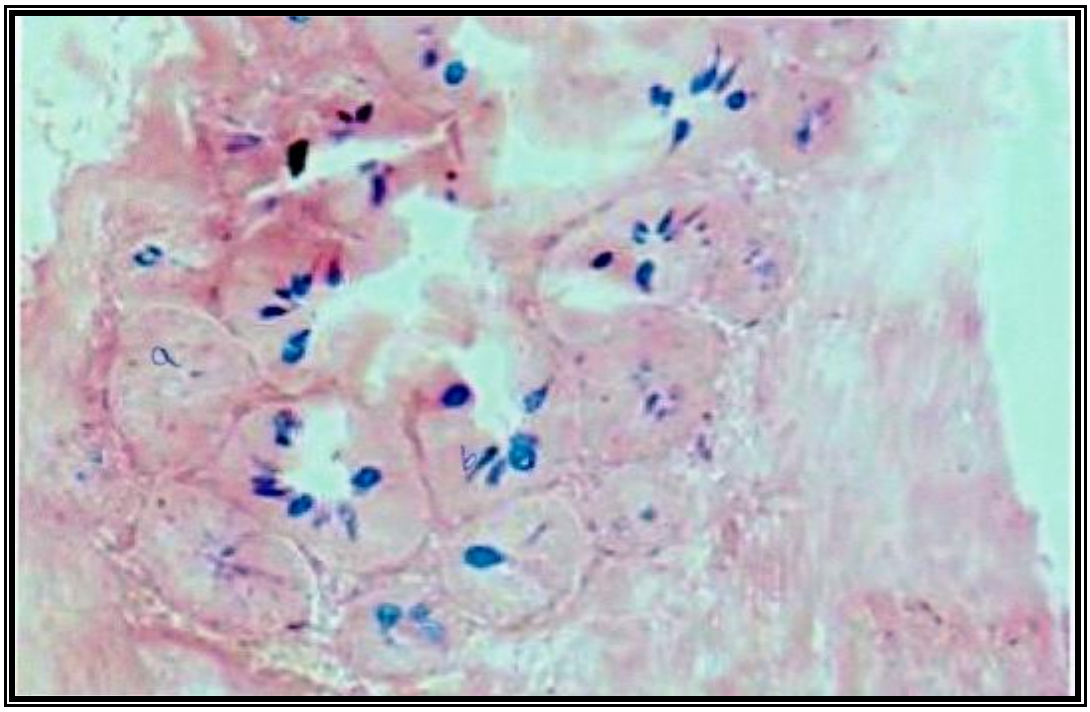
+++ تفاعل موجب شديد

++ تفاعل موجب معتدل

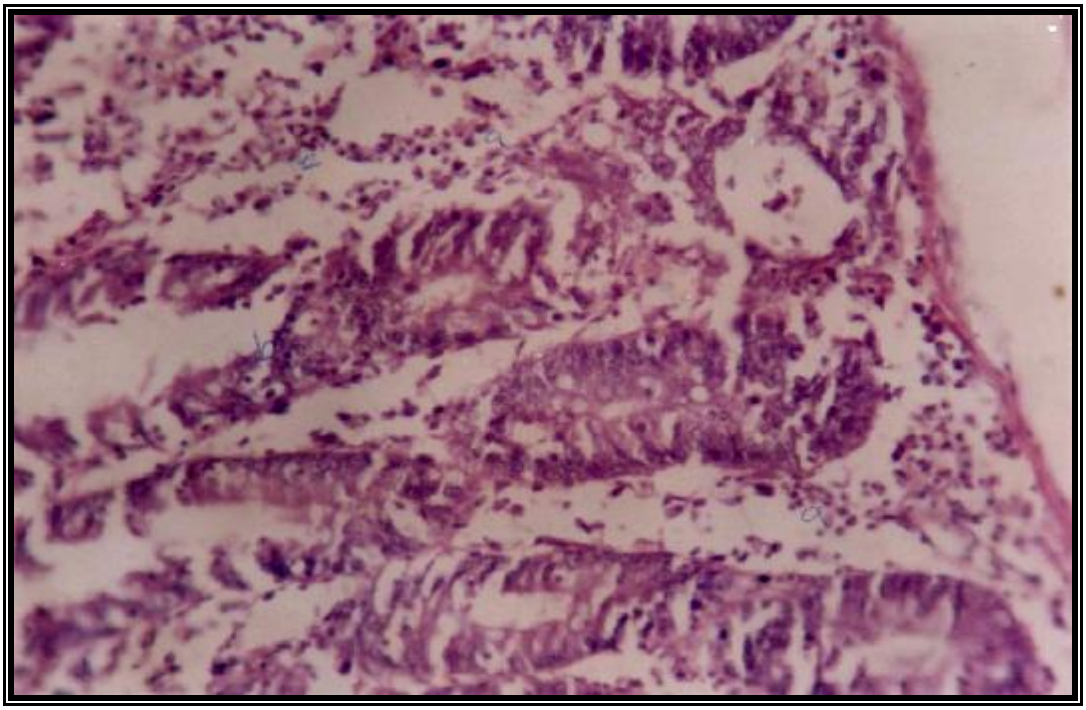
– تفاعل سالب



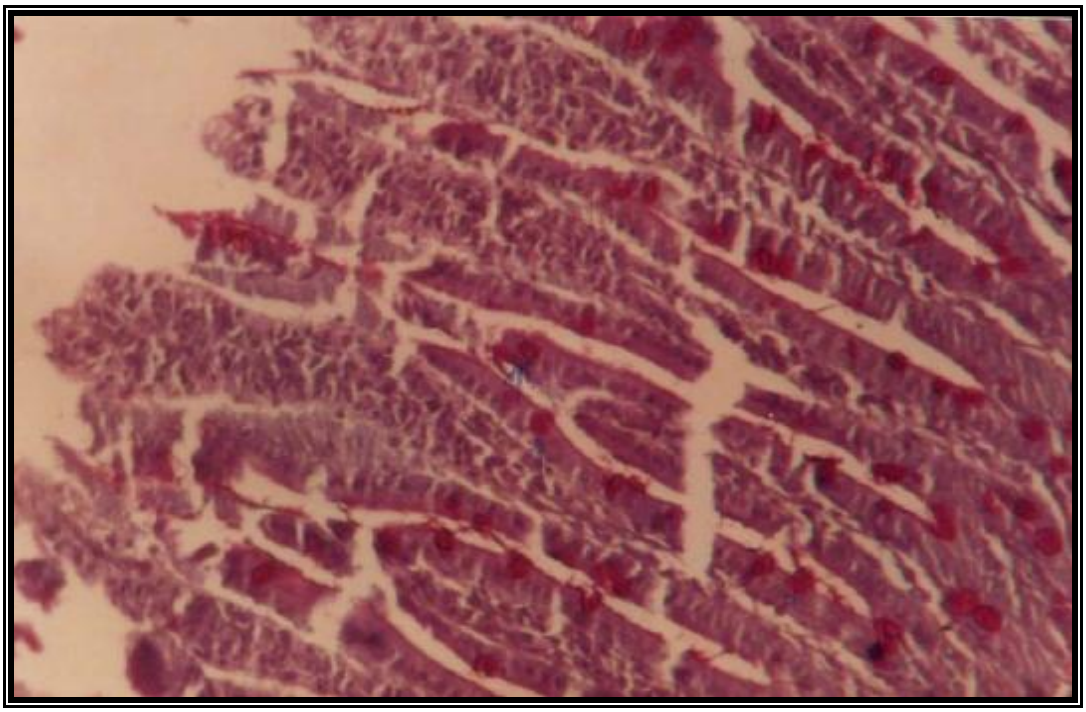
صورة(1) مقطع عرضي لقولون الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*، يوضح وجود النخر والتوسف للخلايا الظهارية في الطبقة المخاطية (¬) 200x H&E



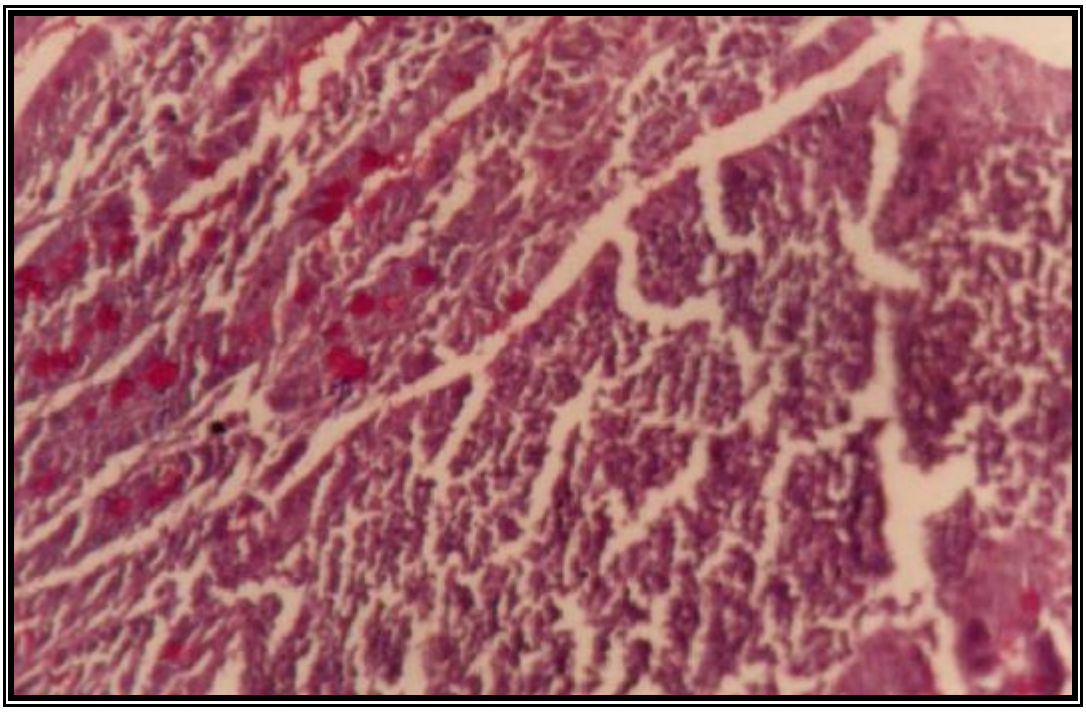
صورة (2) مقطع عرضي لاعور الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* ، يوضح وجود فرط نسيج ظهارة الغدد المعوية(a) مع وجود الناشطات (b) 459x AB



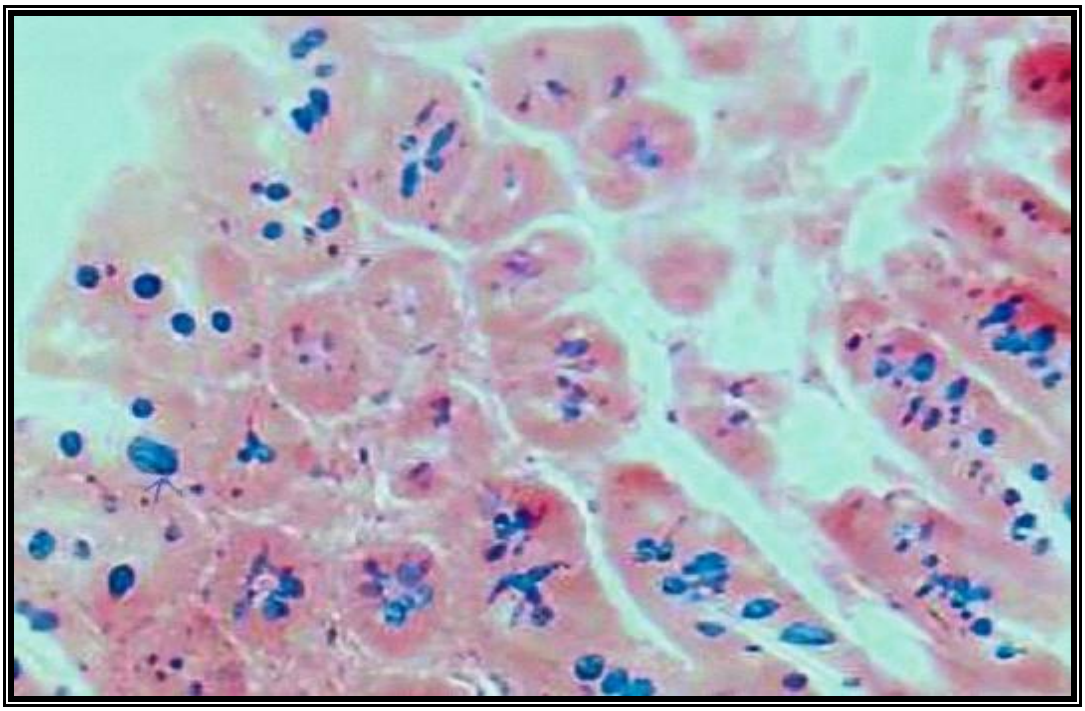
صورة (3) مقطع عرضي لمستقيم الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* ، يوضح النزف (a) والنخر (b) في ظهارة الطبقة المخاطية مع ارتشاح الخلايا الالتهابية وحيدة النواة (c) 400x H&E



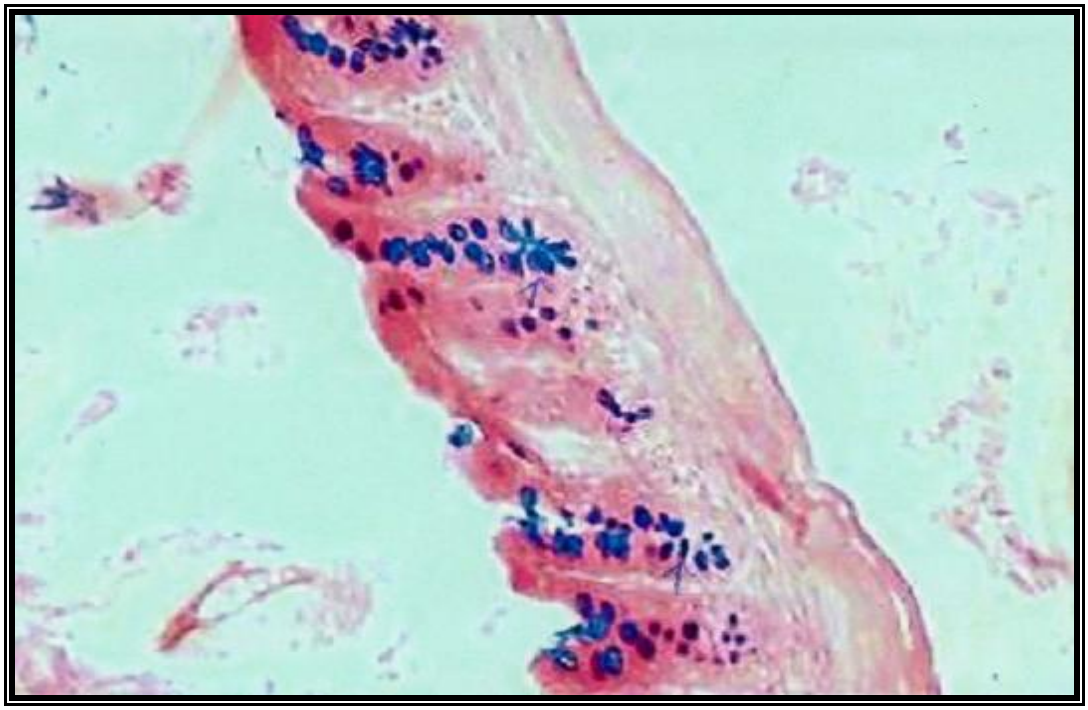
صورة (4) مقطع عرضي لقولون الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*، يوضح التفاعل الموجب الشديد جدا مع صبغة PAS (¬) 400x



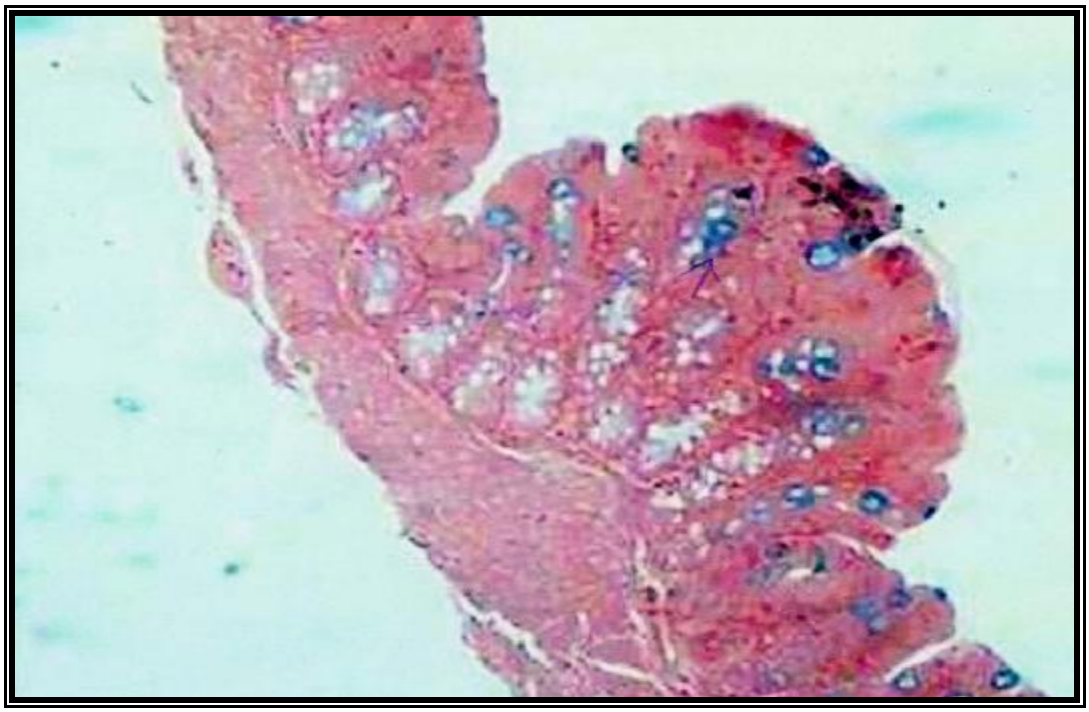
صورة (5) مقطع عرضي لقولون الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*، يوضح التفاعل الموجب الشديد جدا مع تقنية PAS (¬) 400x



صورة (6) مقطع عرضي لقولون الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*، يوضح التفاعل الموجب الشديد مع تقنية ازرق الاليشيان (¬) 450x



صورة (7) مقطع عرضي لمستقيم الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*، يوضح التفاعل الموجب الشديد مع تقنية ازرق الاليشيان (¬) 350x



صورة (8) مقطع عرضي الأعور الفئران المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*، يوضح التفاعل الموجب الشديد مع تقنية الاليشيان الزرقاء (¬) 350x

References

1. Beauer, P. C. & Jung, R. C. (1985). Animal agents and vectors of human disease, 5thed , Lea and Febiger, Philadelphia. P. 1-281.
2. Rashidul, H.; Dinesh, M.; Beth, D.; Selim, A.; Barry, M.; Farr. R.; Bradley, S. & William, J. R. (2003). Epidemiologic and Clinical characteristics of acute diarrhea with emphasison *Entamoeba histolytica* infections in Preschool-Children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. Am. J. Trop. Med. Hyg., P.398-405.
3. Bennett, J. & Plum, F. (1996). Cecil textbook of medicine, 20thed W.B. Saunders Company., P. 1913-1915.
4. Hague, R.; Huston, C.; Hughes, M.; Houpt, E. & Petri, W. (1982). Amoebiasis: Review article. The New England J. of Med., 75:190-196.
5. Samuel, L.; Stanley, J.; Sharon, L. & Reed. (2001). Initval Microbes and microbial toxin: Paradigms for histolytica parasite-hostinteractions. Am. J. Phy. Gastrointest. Liver Physiol., 2806: 1049-1054.
6. Haque, R.; Huston, C. D. & Hughes, M. (2008). Amebiasis N. Eugl. J. Med.,384: 1565-1573.
7. Paul, F.; Kamini, G.; Melanie, F.; Charles, F.; Bilong, B. & Iris, B. (2005). Invitro Amoebicidal activity of some medicinal plants of the Bumun Region (Cameroon). Afr. J. Trad. CAM., 2: 113-121.
8. Drury, R. A. B. & Willington, E. A. (1983). "Carleton's' Histological Technique", 5thed, Oxford university press.
9. Pearse, A. G. E. (1985). Histochemistry, Theoretical and applied, 4th ed, vol. 1,2 . Analytical technology. Churchill living stone, Edinburg.
10. Culling, G. F. A.; Allison, R. T. & Barr, W. T. (1985). Cellules pathology techniques, 4thed. Butte-worth, London.

11. Tsutsumi, V.; Anaya, V. F. & Martinez, P. A. (1990). Experimental intestinal amoebiasis: Invasion and extension of amebic lesion. Archive of investing medicine., 21: 47-52.
12. AlSultan, I. I.; Al-Kennany, E. R. & Youkhan, A. S. (1991). The histochemical study of intestine naturally infected with *Eimeriatenella*. Iraq. J. Vet. Sci., 3: 89-93.
13. Al-Kennany, E. R.; Nabeel, E. S. & (2003). Al-Dabbagh, A. H. Histopathological and histochemical changes in the intestine of rats infected with *Giardia lumblia*. Rivista Di parassitologia; xx: 77-84.
14. Richards, K. S. (1984). Echinococcus granulose equines: The histochemistry of the laminated layers of hydated cyst. Foha Histoch - Cytobiologia Cryobiology, 22:21-23.