دراسة مقارنة لتمنيع الفئران ضد الأكياس المائية باستخدام المستضد الإخراجي / الإفرازي للرؤيسات الأولية ومستضد الأكياس المائية

II: نتائج التغير في نسب متوسطات خلايا الدم البيضاء

luctuation in average percentage of leukocytes

فتحي محمد علي عبد السلام موسى عبد ربه وحيده رشيد علي[1]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v21i1.776

الملخـــــص

إن داء الأكياس المائية الأحادي الفجوة في الإنسان (Unilocular cyst) عبارة عن إصابة طفيلية ذات دورة حياة مشتركة بين الإنسان والحيوان ناتجة عن الإصابة بالطور اليرقي الكيسي لدودة المشـــوكة الحبيبية *Echincoccus granulosus* . ويعد هذا المرض من الأمراض ذات الانتشار العالمي وهو يســـبب مشاكل صحية واقتصادية كبيرة .

إن الصعوبات التي تواجه العلماء في هذا المجال هو التشخيص المبكر والعلاج، ونظراً لذلك فقد وجه الاهتمام نحو إمكانية إنتاج لقاح له القدرة على تحفيز الاستجابة المناعية ضد الإصابة بالمرض، ولذلك فقد وجه هدف الدراسة بنفس الاتجاه ، فقد تم استخلاص ثلاث مستضدات من الطور اليرقي الكيســـي لدودة *E.granulosus* وهذه المستضدات هي :

1- مستضد السائل الكيسي Cyst fluid antigen (CF) .

2- المستضد الإخراجي – الإفرازي Excretion-Secretion antigen (ES) .

3- المستضدES/CF الذي هو عبارة عن مزيج من المستضدين أعلاه بنسبة 1 : 1 .

استخدمت هذه المستضدات الثلاثة في تمنيع الفئران البيض ، فقد حضرت ثلاث تراكيز من كل مستضد ، وقد استعملت جرعة تنشيطيه واحدة لعملية التمنيع . وفحصت فعالية المستضدات الثلاثـــة في

[1] كلية الطب البيطري ، جامعة عمر المختار ، ص.ب. 919 ، البيضاء – ليبيا .

©. المؤلف (المؤلفون) هذا المقال المجاني يتم الوصول إليه من خلال رخصة المشاع الإبداعي(CC BY-NC 4.0)

توليد المناعة ضد الإصابة بالأكياس المائية الثانوية عن طريق حساب النسبة المئوية للاختزال في إعداد هـذه الأكياس ، وأجريت مقارنة لكفاءة التمنيع للتراكيز المختلفة للمستضدات التي تم استعمالها .

أشارت نتائج عملية التمنيع إلى وجـود تذبـذب في معـدلات نسـب الخلايـا اللمفيـة (Lymphocyte) والعدلة (Neutrophil) وحيدة النواة (Monocyte) ، مـع بقـاء الخلايـا الحمضـة (Eosinophil) ضمن معدلاتها الطبيعية بعد 30 يوماً من عملية التمنيع ، وعند إجراء الفحص بعد 90 يوماً من حقن جرعة التحدي كان هنالك انخفاض واضح في معدلات نسب الخلايا اللمفية وارتفاع واضح في الخلايا العدلة مع تذبذب في الخلايا وحيدة النواة والخلايا الحمضة ، في الحيوانات الممنعة التي احتوت على الأكياس .

لم تلاحظ في حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة أية تغيرات في معدلات نسب خلايا الدم البيض (w.b.c) مقارنة بنسبها في الفئران الممنعة ويرجع ذلك إلي أن حيوانات هذه المجموعة لم تحقن باي جرعـة تمنيعية. وعند تكرار الفحص بعد 90 يوماً لوحظ وجود انخفاض واضح في الخلايا اللمفيـة وارتفـاع في معدلات نسب الخلايا العدلة وزيادة معدل الخلايا الحمضة والوحيدة النواة .

أظهرت مجموعة البشر المصابين بالأكياس المائية تغيرات في معدلات نسب الخلايـا الحمضـة وظهور حالة فرط الخلايا الحمضة ، و لم تُظهر المجاميع الأخرى للخلايا تغيرات مهمة في نسـب الخلايـا الأخرى .

المقدمـــة

يعد مرض الأكياس المائية من الأمراض الواسعة الانتشار والمشتركة بين الإنسان والحيوان ومن الممكن أن تحدث المناعة لدى المضيف بشكل صناعي، فقد ثبت أن التعـرض المفـرد لبيـوض *E.granulosus* وكذلك *E.multilocularis* ربما يعطي زيادة في المقاومة للإصابات اللاحقة، وقد تم التمنيع ضد هاتين الدودتين عن طريق حقن بيوض وأجنة هذه الطفيليات (بعد تنشـيطها بواسـطة العصارات الهاضمة الصناعية) (Abdussalam *et al.*, 1968) .

إن الكائنات المضـعفة أو المسـحوقة والمحولة لمستخلصـات ، والمستضـدات المنقـاة تستخدم جميعاً كممنعات بدرجات نجاح مختلفـة، وعموماً فإن استخدام طفيليات حية يعطى أفضـل مناعة ولكن مثل هذه اللقاحـات غـير مقبولـة الاستعمال في الإنسان وبالرغم من هذه الصعوبات تم تحقيق نجاح جزئي في حقل الطب البيطري حيث استخدمت المنتجات الأيضـية للأطـوار اليرقيـة

للديدان الشريطية وخصوصاً الجنين في تمنيع الخراف ضد الطور اليرقي ، إذ يشير (1997) Heath *et al.* (1981); Heath & Holcman إلى أن الأغنام أكتسبت مناعة عالية ضد إختبار التحدي ببيوض *E. granulosus* بعد تمنيعها قبل حقن اليرقة الجنينية تحت الجلد وتزداد درجة التمنيع هذه بزيادة عدد الجرعات .

وقد جرت دراسات عديدة لإيجاد سبل علاجية كيماوية (Okelo,1986) إلا أن الجراحة لاستئصال الأكياس تعد من أكثر الوسائل المستخدمة وأفضلها (Mosimann,1980) غير إنه يمكن أن يصاحب إجراء العملية الجراحية لإزالة الأكياس المائية تسرب بعض من محتويات هذه الأكياس على الأنسجة المحيطة بها ويتسبب عن ذلك تكون أكياس ثانوية جراء انغراس الرؤيسات الأولية الحيوية في الأنسجة والأعضاء الأخرى. كما أن هناك حالات معينة من الإصابة يصعب إجراء الجراحة لها كتواجد الأكياس في العظام والقلب والدماغ وكذلك صعوبة إجراء الجراحة للأكياس المائية السنخية لانتشارها وتفرعها في أعضاء مختلفة في الجسم (Anonymous,1979) .

ونتيجة لما سبق فإن هذه الدراسة تهدف إلى إمكانية إحداث مناعة نوعية لدى المضيف قد تمنع حصول الإصابة أو تعمل على إمكانية تحجيم نمو وتطور الطفيلي داخل جسم المضيف الوسطي وبالتالي التقليل من الإمراضية التي تنجم عن الإصابة بالطفيلي ، وذلك من خلال استخلاص المستضدات من الطور اليرقي للطفيلي وحقنها في الفئران البيض ومتابعة تطور المرض فيها ، وهذه الفئران تمثل المضيف الوسطي كبديل مشابه للإنسان وحيواناته الداجنة المعرضة للإصابة بالمرض.

المواد وطرق البحث

الحيوانات المعملية

أجريت التجارب على 150 فأر أبيض من سلالة Albino Swiss mice بعمر 30-35 يوماً وبأوزان تراوحت بين 25-30 غم . تمت تربية الحيوانات في ظروف البيت الحيواني الثابتة بدرجة حرارة لا تتعدى25 م .

جمع العينات وعزل الرؤيسات الأولية وفصلها وجمع السائل الكيسي

جمعت عينات الأكياس المائية من أكباد ورئات الأغنام المصابة من السلخانة المركزية ببنغازي وتم عزل الرؤيسات الأولية وفصلها وجمع السائل الكيسى وعزل وتحضير المستضدات الإخراجي الإفرازي (ES) ومستضد السائل الكيسى (CF) كما ذكر علي (2005) .

تجارب التمنيع

1- التجربة الأولى

استعمل في هذه التجربة 108 فأر من الذكور وأجري فيها التمنيع باستخدام المستضد ES و المستضد CF و المستضد ES/CF الذي هو عبارة

عن مزيج من كليهما، وحضرت ثلاثة تراكيز لكل مستضد من هذه المستضدات الثلاثة ومنعت كل ثلاث مجاميع ثانوية بأحد المستضدات وأعطيت كل مجموعة منها أحد تراكيز المستضد المستعمل وكانت هذه التراكيز 12.5 ، 25 ، 50 مايكروغرام /مل وبجرعة مقدارها 20 مايكروغرام/غم من وزن الحيوان، وبعد 21 يوماً حقنت الفئران بجرعة تنشيطيه مقدارها نصف جرعة التمنيع الأولي أي بمقدار 10 مايكروغرام/غم وذلك بالحقن تحت الجلد Subcutaneous route وإجراء عملية التمنيع ، وبعد ثمانية أيام من التمنيع الثاني حقنت كل المجاميع بجرعة التحدي Challenge dose البالغة 3000 رؤيس حيوي في جوفها الخلبي Intraperitoneally ، وقسمت الفئران كما في الجدول التالي :

المجموعة 1 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CDES
المجموعة 2 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CD_1ES
المجموعة 3 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CD_2ES
المجموعة 4 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CDCF
المجموعة 5 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CD_1DF
المجموعة 6 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CD_2CF
المجموعة 7 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CD ES/CF
المجموعة 8 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CD_1ES/CF
المجموعة 9 تتكون من 12 فأراً منعت بـ	CD_2ES/CF

ملاحظة : رمز للتركيز Concentration بحرف C ، ورمز للتخفيف المحضر في التركيز الأصلي بحرف D من كلمة Dilution وتشير الأرقام التي بجانب الأحرف إلى تسلسل التراكيز .

2- التجربة الثانية (بمجموعة السيطرة)

ستعمل في هذه التجربة 45 فأراً ذكور قسمت كما يلي :

المجموعة الأولى تتكون من 25 فأراً استعملت كمجموعة سيطرة موجبة حقنت بجرعة التحدي مباشرة .

المجموعة الثانية تتكون من 20 فأر تركت كمجموعة سيطرة سالبة (طبيعية) .

حساب النسبة المئوية للعد التفريقي لكريات الدم البيض للفئران

تم الحصول على قطرات الدم خلال مدة التجربة عن طريق إحداث جرح أو قطع بسيط في ذنب الفئران أما بعد تشريح الحيوانات استخدمت قطرة من الدم المسحوب من القلب مباشرة. ووضعت قطرة الدم على شريحة زجاجية وتحضير مسحة رقيقة وذلك بوضع قطرة الدم على أحد جوانب الشريحة ثم يتم سحبها بالشريحة الأخرى التي تكون بوضع مائل بزاوية حادة حتى يتم انتشار القطرة بالكامل مع مراعاة أن تكون حواف الشريحة سليمة ونظيفة وفي الوضع النموذجي تتكون طبقة ثخينة في البداية ثم طبقة رقيقة خفيفة يتم فيها العد والتمييز، وتركت لتجف في الهواء ثم ثبتت بإضافة قطرات من الكحول الميثيلي لمدة 3 دقائق وتم الصبغ بصبغة جمزا لمدة 5 دقائق ثم تغمر الشريحة بالماء المقطر لمدة 10-15 دقيقة للتخفيف، وغسلت بماء الحنفية وتركت لتجف تماماً وفحصت تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية ويتم عد 100 كرية للمجموع الكلي وحسبت النسبة المئوية لأنواع خلايا الدم البيض حسب طريقة (1987) Sood وقد أجري هذا الفحص لجاميع الفئران بعد 30 يوم من التمنيع وبعد 90 يوم من حقن جرعة التحدي أي في نهاية مدة الإصابة التجريبية .

حساب النسبة المئوية للعدد التفريقي لخلايا الدم البيض للإنسان

تم جمع عد 46 عينة دم من المرضى المصابين بالأكياس المائية والموجودين بأقسام الجراحة في مستشفي 7 أكتوبر ومستشفي الفاتح لطب وجراحة الأطفال ومستشفي الجلاء بمدينة بنغازي.سحبت 3 عينات دم مباشرة من المرضى المصابين قبل إجراء العملية الجراحية سنة 2005 وباقي العينات أخذت من سجلات المستشفيات من سنة 2001-2004 .

أما فيما يتعلق بمجموعة السيطرة فقد تم اختيار مجموعة من البشر الأصحاء بحيث تم التأكد من سلامتهم من الإصابة بالأكياس المائية أو الإصابة بطفيليات أخري وذلك عن طريق إجراء الفحص العام للبراز ، وسحب منهم 4 مل من الدم .

تم تحضير مسحة رقيقة من الدم وحسبت النسبة المئوية للعدد التفريقي لخلايا الدم البيض للمريض في حين أجري لعينة الدم المتبقية عملية طرد مركزي لفصل المصل منه وحفظ عند درجة -20°م لحين إجراء فحص الانتشار المناعي المزدوج عليه .

النتائج والمناقشة

نتائج التغيرات في إعداد خلايا الدم البيض

1- نتائج تمنيع الفأران وبجاميع السيطرة الموجبة والسالبة

أظهرت نتائج النسبة المئوية للعدد التفريقي لخلايا الدم البيض في الفئران الممنعة وجود تذبذب في متوسطات نسب الخلايا العدلة

والوحيدة النواة وأحياناً اللمفية في حين كانت متوسطات نسب الخلايا الحمضة دون متوسطاتها في بعض المجاميع وضمن المتوسطات الطبيعية في المجاميع الأخرى ، وذلك عند إجراء المقارنة مع مجاميع خلايا الدم البيض في حيوانات السيطرة السالبة في الفترة التي أعقبت نهاية مدة التمنيع (اليوم 30 بعد التمنيع) .

عند إجراء الفحص بعد 90 يوماً من حقن جرعة التحدي كان هنالك انخفاض في متوسطات نسب الخلايا اللمفية وارتفاع واضح في متوسطات نسب الخلايا العدلة والوحيدة النواة مع بقاء متوسطات نسب الخلايا الحمضة ثابتة وكانت هذه القيم في بعض المجاميع مشابهة لمثيلاتها في مجموعة السيطرة الموجبة .

وكانت متوسطات نسب الخلايا الدم البيض العدلة واللمفية والوحيدة النواة والحمضة في الفئران الممنعة التي لم يظهر التشريح وجود الأكياس المائية فيها والفئران التي ظهرت فيها أورام حبيبية فقط والمسماة بالنمط الثالث للإصابة (صوره رقم 3) كما هو موضح في الجدول رقم 1 ، ويوضح الجدول رقم 2 التغيرات الحاصلة في مجاميع الفئران الممنعة التي أظهر التشريح وجود الأكياس المائية من النمط الثاني للإصابة (صوره رقم 2) .

تم إجراء تحليل التباين ذي المعيار الواحد one way – Anova للنتائج المتحصل عليها من هذا الفحص في مجاميع الفئران الممنعة واعتمدت فترات 30-90 يوماً، أجراء الفحص أساساً للمقارنة بين مجاميع الفئران الممنعة في المرة الأولى، واعتمدت مجاميع المستضدات و المجاميع الثانوية ضمن كل مستضد أساساً للمقارنة في المرة الثانية ، ثم اعتمد التحليل في المرة الثالثة على نمط الإصابة بالأكياس المائية في الفئران أساساً للمقارنة بين مجاميع الخلايا وكانت النتائج كما في الجدولين 2 و 3 وعند اعتماد نمط الإصابة أساساً للمقارنة أظهرت مجاميع الخلايا العدلة واللمفية والحمضة وجود فروق معنوية في متوسطات نسبها $P < 0.01$ ، بينما لم تظهر الخلايا الوحيدة النواة وجود فروق معنوية في متوسطات نسبها وذلك في مجاميع الفئران التي تحمل النمط الثالث للإصابة ، في حين أظهرت مجاميع الخلايا العدلة واللمفية والوحيدة النواة فروق معنوية $P < 0.01$ في المجاميع التي تحمل النمط الثاني للإصابة ، و لم تظهر لديها فروقاً معنوية في متوسطات نسب الخلايا الحمضة .

ويوضح الجدولان رقم 3 و 4 نتائج التغيرات الدموية وتحليل الـ ANOVA لمجموعة السيطرة الموجبة والسالبة، ومن ملاحظة هذين الجدولين يلاحظ إنه عند اعتماد نمط الإصابة بالمرض أساساً للمقارنة في الجدول رقم 3 كانت هناك فروقاً معنوية في كل مجاميع الخلايا وفي كل الحيوانات عند مستوى احتمالية $P < 0.01$ و $P < 0.05$ ، بينما أظهرت نتائج تحليل

ANOVA في الجدول 4 اعتماداً على نمط الإصابة 0.05 و لم تظهر الخلايا الحمضة ووحيدة النواة أية وجود فروق معنوية في متوسطات الخلايا العدلـــة فروق معنوية .
واللمفية عند مستوى احتماليـــة$P < 0.01$ و $p >$

جدول 1 متوسط النسب المئوية للعدد التفريقي لخلايا الدم البيض للفئران الممنعة التي تحمل النمط الثالث ونتـــائج تحليـــل التباين ذي المعيار الواحد (ANOVA-one-way) لهذا الفحص

مجاميع الفئران / مجاميع خلايا الدم البيض		المستضد ES (−)	المستضد CF (−)	المستضد Es/FC (−)	مقياس التباين ذو المعيار الواحد		
					الوقت	المجموعة	النمط الثالث
اليوم 30 بعد التمنيع	N	22	29	30	*	*	**
	L	75	68	70	*	NS	**
	M	2	2	0	*	*	NS
	E	1	1	0	NS	NS	**
اليوم 90 بعد الإصابة	N	23	27	33	*	*	**
	L	70	65	60	*	*	**
	M	6	7	6	*	NS	NS
	E	1	1	1	NS	NS	**
		(0)	(0)	(0)			
اليوم 30 بعد التمنيع	N	20	30	28	*	*	**
	L	75	70	70	*	NS	**
	M	3	0	2	*	*	NS
	E	2	0	0	*	NS	**
اليوم 90 بعد الإصابة	N	32	30	27	*	*	**
	L	67	68	73	*	*	**
	M	1	2	0	*	*	NS
	E	0	0	0	*	NS	**

Neutrophil = N Lymphocyte = L
Monocyte = M Eosinophil = E

* عند مستوى احتمالية $P < 0.05$

** عند مستوى احتمالية $P < 0.01$

NS = لا توجد فروق معنوية

(−) فئران ليس لديها أكياس حقيقية ولكن توجد بها أورام

(0) فئران لا تحمل أي شيء . وهذه الرموز (−) ، (0) تمثل مجموعة النمط الثالث والتي لا يوجد بها أكياس مائية

جدول 2 متوسط النسب المئوية للعد التفريقي لخلايا الدم البيض للفئران الممنعة التي تحمل النمط الثاني للإصابة ونتائج تحليل التباين ذي المعيار الواحد (ANOVA-one way) لهذا الفحص

مجاميع الفئران / مجاميع خلايا الدم البيض		المستضد ES (☼ X)	المستضد CF (☼ X)	المستضد Es/FC (☼ X)	مقياس التباين ذو المعيار الواحد		
					الوقت	المجموعة	النمط الثاني
اليوم 30 بعد التمنيع	N	28	28	26	*	*	**
	L	69	70	71	*	*	**
	M	2	1	2	*	NS	**
	E	1	1	1	NS	NS	NS
اليوم 90 بعد الإصابة	N	35	37	44	*	*	**
	L	62	61	55	*	*	**
	M	3	1	1	*	*	**
	E	0	1	0	NS	NS	NS

* عند مستوى احتمالية $P<0.05$

** عند مستوى احتمالية $P<0.01$

NS = لا توجد فروق معنوية

(☼ X) هذا الرمز يمثل مجموعة النمط الثاني والتي بها أكياس ولكنها أقل عدد وأصغر حجم من مجموعة النمط الأول ، حيث يرمز (☼) للفئران التي بها أكياس عددها من 2-4 بينما (X) يرمز للفئران التي بها أكياس أقطارها من 1-4ملم

جدول 3 متوسط النسب المئوية للعدد التفريقي لخلايا الدم البيض لفئران السيطرة الموجبة (المصابة)التي تحمل النمط الأول ونتائج تحليل التباين ذي المعيار الواحد (ANOVA-one way) لهذا الفحص

مجاميع الفئران مجاميع	مجموعة السيطرة الموجبة		مقياس التباين ذو المعيار الواحد	
خلايا الدم البيض	(√ ◊)		الوقت	النمط الأول
اليوم 30 من الإصابة	N	29	*	**
	L	70	*	**
	M	1	*	**
	E	0	*	**
اليوم 36 من الإصابة	N	30	*	**
	L	68	*	**
	M	1	*	**
	E	1	*	**
اليوم 90 من الإصابة	N	38	*	**
	L	57	*	**
	M	3	*	**
	E	2	*	**
		(√ +)		
اليوم 30 من الإصابة	N	31	*	**
	L	68	*	**
	M	1	*	**
	E	0	*	**
اليوم 36 من الإصابة	N	32	*	**
	L	68	*	**
	M	0	*	**
	E	0	*	**
اليوم 90 من الإصابة	N	37	*	**
	L	58	*	**
	M	4	*	**
	E	1	*	**

* عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ ** عند مستوى احتمالية $P < 0.01$

NS = لا توجد فروق معنوية

(√ ◊) و (√ +) هذه الرموز تمثل مجموعة النمط الأول الأكثر عدداً وحجماً من الأكياس ،حيث أن (√) ترمز للفئران التي بها أكياس أقطارها من 5-8 ملم و(◊) ترمز للفئران التي بها أكياس عددها من 5-10 و (+) ترمز للفئران التي بها أكياس عددها أكثر من 10

جدول 4 متوسط النسب المئوية للعد التفريقي لخلايا الدم البيض لفئران السيطرة السالبة (الطبيعية) ونتائج تحليل التباين ذي المعيار الواحد (one way- ANOVA) لهذا الفحص

مجاميع الفئران / مجاميع خلايا الدم البيض		مجموعة السيطرة السالبة (O)	مقياس التباين ذو المعيار الواحد	
			الوقت	النمط الثالث
اليوم 30 من التجربة	N	28	*	**
	L	71	*	**
	M	1	NS	NS
	E	0	NS	NS
اليوم 36 من التجربة	N	28	*	**
	L	71	*	**
	M	1	NS	NS
	E	0	NS	NS
اليوم 90 من التجربة	N	30	*	**
	L	69	*	**
	M	1	NS	NS
	E	0	NS	NS

* عند مستوى احتمالية $P<0.05$

** عند مستوى احتمالية $P<0.01$

NS = لا توجد فروق معنوية

2- مجموعة المرضى البشر ومجموعة السيطرة

أوضحت نتائج النسبة المئوية للعد التفريقي لخلايا الدم البيض للمرضى المصابين بالأكياس المائية وجود ارتفاع واضح في متوسطات الخلايا الحمضة (Eosinophilia) ، بينما بقيت مجاميع الخلايا العدلة واللمفية والوحيدة النواة والقعدة عند متوسطاتها الطبيعية مقارنة مع مجموعة السيطرة (الأشخاص السليمين) وقد تم إجراء الفحص للمرضى في نهاية مدة الإصابة أي قبل استئصال الكيس المائي، وتوضح الجداول 5 و 6 و 7 متوسطات هذه الخلايا عند هؤلاء المرضى، ويبين الجدول 8 متوسطاتها عند الأشخاص السليمين .

تم إجراء تحليل التباين ذي المعيار الواحد للجداول السابقة واعتمد نمط الإصابة أساساً للمقارنة بين متوسطات نسب الخلايا لدى المرضى الذين يحملون النمط الأول للإصابة وتبين من خلال ذلك وجود فروقات معنوية في متوسطات

الخلايا العدلة واللمفية والوحيدة النواة والحمضة والقعدة عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ كما في الجدول رقم 5 . أما المرضى الذين يحملون النمط الثاني للإصابة فقد أظهر تحليل ANOVA لنتائج الفحص فيهم وجود فروقات معنوية في كل مجاميع الخلايا عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ كما في الجدول رقم 6 . وأظهر المرضى الذين كانوا يحملون النمط الثالث للإصابة وجود فروق معنوية لكل مجاميع الخلايا عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ كما في الجدول رقم 7 .

جدول 5 متوسط النسب المئوية للعد التفريقي لخلايا الدم البيض للمرضى المصابين بأكياس مائية من النمط الأول للإصابة ونتائج تحليل التباين ذي المعيار الواحد لهذا الفحص

المرضى / مجاميع خلايا الدم البيض	المتوسط	النمط الأول
N	62	*
L	27.7	*
M	2.7	*
E	6.3	*
B	1.3	*

* عند مستوى احتمالية $P<0.05$

جدول 6 متوسط النسب المئوية للعد التفريقي لخلايا الدم البيض للمرضى المصابين بأكياس مائية من النمط الثاني للإصابة ونتائج تحليل التباين ذي المعيار الواحد لهذا الفحص

المرضى / مجاميع خلايا الدم البيض	المتوسط	النمط الثاني
N	67.2	*
L	26.4	*
M	4	*
E	1.1	*
B	0.6	*

* عند مستوى احتمالية $P<0.05$

جدول 7 متوسط النسب المئوية للعد التفريقي لخلايا الدم البيض للمرضى المصابين بأكياس مائية من النمط الثالث للإصابة و نتائج تحليل التباين ذي المعيار الواحد لهذا الفحص

المرضى / مجاميع خلايا الدم البيض	المتوسط	النمط الثالث
N	56	*
L	33.5	*
M	5	*
E	5.5	*
B	0	*

* عند مستوى احتمالية $P<0.05$

جدول 8 متوسط النسب المئوية للعد التفريقي لخلايا الدم البيض للبشر الطبيعيين في مجموعة السيطرة السالبة و نتائج تحليل التباين ذي المعيار الواحد لهذا الفحص

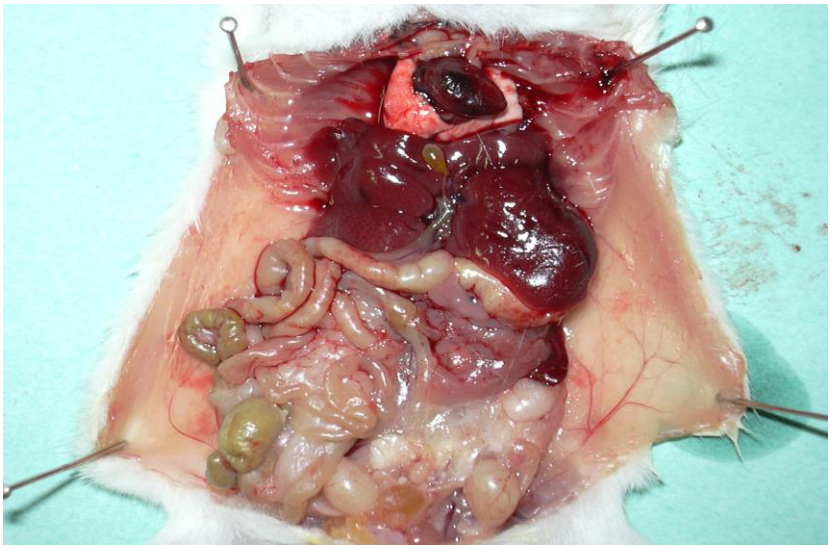
الأشخاص السليمين / مجاميع خلايا الدم البيض	المتوسط	النمط الرابع O
N	61	NS
L	33	*
M	4	*
E	2	*
B	1	NS

* عند مستوى احتمالية $P<0.05$

NS = لا توجد فروق معنوية

(O) ترمز للنمط الرابع وهو مجموعة البشر الطبيعية السليمة والذين يتم مقارنتهم بالأشخاص المصابين في الأنماط الثلاثة

صورة 1 توضح فأر مصاب بالأكياس المائية من النمط الأول (لديه أكياس يتراوح قطرها ما بين 5–8 ملم وعددها أكثر من 10 أكياس)



صورة 2 توضح فار مصاب بالأكياس المائية من النمط الثاني للإصابة (لديه أكياس يتراوح قطرها ما بين 1–4 ملم وعددها يتراوح ما بين 2–4)

صورة 3 توضح أحد الفئران الممنعة وهو من النمط الثالث للإصابة (يحتوي على أورام حبيبية فقط)

إن محاولة إيجاد لقاح يُمنّع البشر والحيوانات الاقتصادية ضد الإصابة بالأكياس المائية حظيت بالاهتمام الكبير من قبل العديد من الباحثين، وقد تركزت البحوث على محاولة إيجاد المستضدات التي لها القابلية على تحفيز مكونات الجهاز المناعي الخلوية والخلطية بكفاءة عالية وخصوصية كبيرة ، ونتيجة لهذه البحوث وجد أن المستضدات الإبرازية الإفرازية تنطبق عليها هذه المواصفات نظراً لكثرة المكونات الطفيلية فيها كما أكد ذلك Matossion (1977); Auer & Aspock (1986) ، كما يعد السائل الكيسي مصدراً ملائماً للمستضدات وله استضدادية قوية وجيدة، إلا إنها تتباين حسب محتواه من الرؤيسات الأولية (Kagan & Agosin,1968). أما المستضد ES / CF فهو ذو استضدادية أعلى من كلا المستضدين السابقين عند استخدامهما لوحدهما،إضافة إلى الفعالية الاستضدادية للسائل الكيسي الذي عزل من أكياس البشر والذي كان يحتوي على محتوى عال من بروتين أضيف إليه المستضد ES الذي عزل ونقّي وركّز في المعمل ،

وهو يحتوي على نسبه من البروتين أعلى وخصوصية أكبر مما في المستضد CF لكونه استخلص من تنمية عدد من الرؤيسات الأولية النشطة جداً في الزجاج والمعزولة من أكياس أكباد ورئات الأغنام العالية الخصوبة وهو يحتوي على مستضداتها الجسمية والأيضية .

وأجريت محاولتان لمعرفة التغيرات التي تطرأ على متوسطات أعداد ونسب خلايا الدم البيض في الفئران التجريبية البيض وكذلك من المرضى المصابين بالأكياس المائية. وعند إجراء الفحص في الفئران الممنعة بعد نهاية مدة التمنيع تبين وجود زيادة في متوسطات نسب الخلايا اللمفية والوحيدة النواة، ويعود سبب ذلك إلى أن الخصوصية المناعية تترسخ عند معاملة المستضد وتقديمه مما يؤدي إلى تحفيز واسع في مجاميع الخلايا المناعية للتعرف على الجسم الغريب الذي وصل إليها و يحافظ على هذه الخصوصية المناعية عن طريق إنتاج خلايا ذاكرة بائية وتائية تستمر بالدوران طويلاً بعد اختفاء المستضد . وهذا يفسر ارتفاع نسب الخلايا اللمفية بالذات في الدم المحيطي بعد التمنيع ، وتكون النتيجة النهائية لكل هذا بعد حقن جرعة التحدي حصول عملية تنشيط أو تحفيز للخلايا البائية والخلايا التائية السامة خلوياً (Tc) والبلاعم الكبيرة ($M\Phi$) والتي تمثل معاً الأذرع الثلاثة للاستجابة المناعية، وإن هذا سيؤدي إلى إنتاج الأجسام المضادة وحصول عمليات التحلل الخلوي Cytolysis والقتل الخلوي الذي تتوسطه خلايا ($M\Phi$) والتي تعمل معاً على إحراز المناعة، ويمكن زيادت المقاومة ضد الإصابة مره أخرى عن طريق تنشيط خلايا الذاكرة الدائرة،وذلك بحقن جرعه تنشيطية وهذا ما أشار إليه(1994) Cox، أما ارتفاع نسب الخلايا الحمضة فهو أمر طبيعي ينتج عن تحسسها بمستضدات الطفيلي الذي حقنت بجسم الحيوان والذي أدى إلى تكاثر أعدادها في الدوران المحيطي ، في حين لم تلاحظ لدى حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة أية تغيرات في متوسطات نسب خلاياها البيض مقارنة بنسبها في الفئران الممنعة ويعود ذلك إلى كون حيوانات هذه المجموعة لم تحقن بأي جرعة تمنيعية .

وعند تكرار الفحص بعد 90 يوماً من حقن جرعة التحدي في الحيوانات الممنعة لوحظ انخفاض واضح في متوسطات نسب الخلايا اللمفية وارتفاع واضح في متوسطات نسب الخلايا العدلة وتذبذب في متوسطات الخلايا الحمضة والوحيدة النواة.أما في مجموعة السيطرة الموجبة فقد حصلت تغيرات واضحة في متوسطات نسب خلاياها البيض، حيث حصل ارتفاع ملحوظ في متوسطات نسب خلاياها العدلة وانخفاض واضح في متوسطات نسب الخلايا اللمفية وارتفاع متوسطات نسب الخلايا الحمضة والوحيدة النواة وتذبذبها أحياناً ، وقد أظهرت الفئران الممنعة التي

أظهر التشريح وجود الأكياس المائية الثانوية لديها مشابهة لها موجود في هذه المجموعة . وقد يعود سبب هذه النتائج إلى هجرة الخلايا اللمفية من الدوران المحيطي إلى أماكن تواجد الطفيلي لتنشيط الاستجابة المناعية بنوعيها،بينما قد يكون سبب زيادة الخلايا الوحيدة النواة إلى إثراء الدوران المحيطي بالخلايا المتولدة حديثاً في نخاع العظم والتي أدت الإصابة بالرؤيسات الأولية واستجابة الخلايا اللمفية لها إلي تحفيز عملية تخليقها بأعداد كبيرة في النخاع، أما تذبذب متوسطات نسب الخلايا الوحيدة النواة والحمضة في الحيوانات الممنعة المصابة فقد يفسر بهجرة مجموعه من هذه الخلايا إلى مناطق وجود الطفيلي لتحجيم نموه مع تعويض الدوران المحيطي بأعداد جديدة تضاف إليه،ولأن الحاجة لهذه الخلايا مستمرة لتثبيط عملية رسوخ الإصابة نلاحظ تذبذب نسبها بين زيادة ونقصان لاستمرار عملية هجرتها إلى الجزء المصاب برغم تعويض النقص الحاصل في أعدادها في الدوران المحيطي .

كما قد يعود ارتفاع نسبها في حيوانات السيطرة إلى رسوخ الإصابة في الحيوان مع استمرار تحسسها بمستضدات الطفيلي وبالتالي استمرار الحاجة إلى إنتاج أعداد أكثر منها للسيطرة على الإصابة (Ali Khan,1974a) .

أما في الإنسان فقد أجري الفحص في المرحلة النهائية للمرضى فقط لعدم وجود مجاميع ممنعة بينهم وتمثلت هذه المرحلة بفترة إجراء الجراحة للمرضى وقورنت هذه الفترة مع فترة إجراء الفحص لمجاميع الفئران بعد نهاية مدة الإصابة التجريبية فيها، وعلى الرغم من أن بعض المرضى كان المتوسط الزمني للإصابة فيهم متباين إلا إننا اعتبرنا هذه البيانات بمثابة الاختلاف في تطور ونمو الأكياس في مجموعة السيطرة الموجبة للفئران ، وقد كشفت نتائج الفحص عن وجود تغيرات دموية في بعض مجاميع الخلايا البيض وبشكل أوضح في الحيوانات التجريبية،إلا أن السمة الواضحة في البشر كانت في حدوث فرط الخلايا الحمضة (Eosionphilia) والتي تعد إحدى الأعراض المهمة للإصابات الطفيلية خصوصاً إصابات الديدان، بينما لم تظهر المجاميع الأخرى للخلايا تغيرات كبيرة في نسبها حيث إنه بالرغم من تذبذب قيمها إلا إنها كانت ضمن متوسطاتها الطبيعية . وكان هنالك ارتباط بين شدة الإصابة في المرضى ومتوسط التغير في الخلايا الحمضة وبشكل اقل منه الخلايا اللمفية والعدلة إلا أن الأخيرتين كانت تغيراتهما ضمن المدى الطبيعي ، وقد يعود سبب قلة وضوح التغيرات في الخلايا اللمفية والعدلة لدى المرضى إلى كون مدة الإصابة لديهم كانت أكبر من الحيوانات التجريبية والذي نتج عنه عودة مجاميع هذه الخلايا إلى متوسطاتها الطبيعية بعد أن استقرت حالة الإصابة لديهم وفشلت عملية مقاومة الجسم للطفيلي واختزلت عملية وصول

مستضدات الطفيلي لمجرى الدم، أمـــا اســـتمرار المتوسطات العالية للخلايـــا الحمضـــة فيعـــود إلى تحسسها الكبير بمستضدات الطفيلي الذي وصل إلى مرحلة متقدمة جداً من النمو برغم قلة المستضدات المحسسة الواصلة إليها ، وقد يكشف عن وجـــود ثقب في جدار الكيس المـــائي وحصـــول عمليـــة تسرب لمواد الكيس المائي إلى أنسجة ودم المريض .

Comparative Study of Immunization of White Mice Cells Against Hydatid Cysts Using Excretion/Secretion and Cyst Fluid Antigens

II: Fluctuation in average percentage of Leukocytes

Fathi M. Ali **Abdulsalam M. A. Aboelhaj** **Waheeda R. Ali***

Abstract

Human cystic echinococcosis is a cyclozoonotic infection by larval stage of *Echinococcus granulosus* . This disease has a world-wide distribution and it causes a big health and economic problems. The difficulties that met scientists in the field are the early diagnosis and treatment of the infection . Therefore , the attentions were directed toward the possibility of producing a vaccine that has the ability to stimulate the immune response against the infection.

The aim of this work was also directed in this way. Three antigens were extracted and used in our experimental works, These were :

1- Highly antigenic antigen, the Cyst Fluid (CF) antigen.
2- Highly antigenic-highly specific antigen, the Excretion–Secretion(ES) antigen .
3- The third antigen is a mixture of a (1 : 1) proportion of the above two antigens and called ES/CF antigen.

These three antigens were used to immunize the experimental animals (white mice). Three concentrations from each antigen were prepared . The three concentrations were used in white mice in addition to booster dose to stimulate immunity .

The percentage of Neutrophils, Lymphocyte, and Monocytes showed fluctuations, while the percentage of the Eosinophils remained in the normal range after 30 days of the immunization . After 90 days of the injection of the challenge dose, there was a clear depression in the percentage of lymphocytes and clear rising in that of Neutrophilis with fluctuation in the percentage of Monocytes and Eosinophils in the immunized animals that had cysts .

The results in the positive control of mice before the injection of the challenge dose (the same times of the test in the immunized groups) showed that there were no changes in the average percents of white blood cells. However, there were clear differences after 90 days of infection. There was acute depression in the lymphocytes and acute rise in the Neutrophils and a moderate rise in the Eosinophils and Monocytes, the changes sometimes proportional with the infectivity .

The results of the test in infected patients with hydatid cysts showed a clear changes in the average percentages of Eosinophils with a clear increase in these cells , while there were no significant changes in the averages of the other cells.

* Department Of Zoology, Faculty of Science, University of Omar EL-Mokhtar, Elbeida-Libya.

المراجـــــع

علي ، فتحي محمد (2005). دراســـة مقارنـــه لتمنيع الفئران ضـــد الأكيـــاس المائيـــة باستخدام المستضد الإبرازي / الإفرازي للروئيسات الأولية ومستضد الأكيـــاس المائية .رسالة ماجستير ، قســـم علـــم الحيوان ، كليه العلوم ، جامعـــه عمـــر المختار . البيضاء –ليبيا .

Abdussalam , M; Acha , P.N; Agosin , M; Blood , D.B; Gemmell , M.A. and Kagan , I.G.(1968). Research needs in Echinococcosis (Hydatidosis). Bull. WId. HIth .Org., 39 :101- 113.

Ali – Khan , Z .(1974 a) . Host – Parasite relationship in Echinococcosis .I . Parasite biomass and antibody response in three strains of in breed mice against graded doses of *Echinococcus multilocularis* cysts .J. Parasitol., 60 :231-235.

Anonymus , S.(1979) .Medical treatment for hydatid disease Br. Med . J.11 : 563.

Auer, H. and Aspock , H. (1986). Studies on antigens from *in Vitro* cultivated protoscolices of *Echinococcus multilocularis* and their possible use in the serodiagnosis of human Echinococcosis Taeniasis (Cysticercosis) and Hydatidosis (Echinococcsis). Second lnt .Symp . (2-7) Dec : 7-15 .

Cox , F.E.G.(1994).Modern Parasitology , 2nd ed. Bluck-Well . Sci. Pul ., Oxford : 194-217 .

Heath , D.D. and Holcman, B.(1997). Vaccination against *Echinococcus* in perspective. Acta. Trop., 67: 37-41.

Heath, D.D.; Parmeter, S.N.; Osborn, P.J. and Lawrence, S.B.(1981). Resistance to *Echinococcus granulosus* infection in lambs. J. Parasitol., 67: 797-799.

Kagan, I.G. and Agosin, M.(1968). *Echinococcus* antigens. Bull. Wld. Hlth. Org., 39: 13-24.

Matossian, R.M.(1977). The immunological diagnosis of human hydatid disease. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg., 71 : 101-104.

Mosimann, F. (1980). Is alveolar hydatid of the liver incurable? Ann. Surg. 192 : 118-123.

Okelo, G.B.A. (1986). Hydatid disease : Research and control in Turkana, III. Albendazole in the treatment of inoperable hydatid disease in Kenya -a report on 12 cases Trans. Roy. Soc . Trop. Med. Hyg., 80:193-195.

Sood, R.(1987). Medical Laboratory technology methods and interpretations. 2nd .ed ., Jaypee Brother Medical Publ., India.