التغيرات المرضية والكيمياوية النسيجية في رئات الأرانب المصابة تجريبياً بجراثيم Pseudomonas aeruginosa

سهير حسن علي و محمد جويد علوان
فرع الأمراض والدواجن / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد

الخلاصـــة

لغرض معرفة التغيرات المرضية والكيمياوية النسيجية التي تسببها الإصابة بجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* استخدم 12 أرنباً قسمت عشوائياً إلى مجموعتين بالتساوي حقنت المجموعة الأولى داخل الخلب بجرعة مقدارها 10^8 CFU بينما حقنت المجموعة الثانية بنفس الطريقة بـ 1 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم ، وقتلت جميع الحيوانات في اليوم الثالث بعد الحقن .
أوضحت النتائج المرضية زيادة سمك الحواجز بين الأسناخ وكذلك بين الفصوص لارتشاحها بالخلايا الالتهابية ولاسيما العدلات والبلاعم السنخية إضافة إلى التكفيف الخلوي اللمفي حول الأوعية الدموية والممرات الهوائية . كذلك دلت نتائج الدراسة الكيمياوية النسيجية لرئات الأرانب المصابة تجريبياً بجراثيم *P. aeruginosa* فرط تنسب الغدد المخاطية والخلايا وفرط إفراز المادة المخاطية . لقد أظهرت هذه الدراسة بأن المادة المخاطية للخلايا الكأسية والخلايا تحت المخاطية لرئات الأرانب الطبيعية تتكون من المادة المخاطية المتعادلة وقليل من المادة المخاطية نوع المخاط اللعابي وتحولت إلى المادة الحامضية نوع المخاط اللعابي والحامضية الكبريتية في الحيوانات المصابة .

المقدمة

إن جراثيم *P. aeruginosa* تعتبر من الجراثيم الواسعة الانتشار في العالم حيث أنها تصيب الإنسان والحيوان وكذلك النباتات (1) . وهي جراثيم انتهازية تسبب التهابات ثانوية خطرة لاسيما للأشخاص المصابين بأمراض السرطان والتليف الكيسي والأمراض المثبطة للمناعة ولهذه الجرثومة طبيعة هجومية وسمية تنتج العديد من عوامل الضراوة متمثلة بالديفانات الخارجية و الأنزيمات والمستضدات الجسمية وبسبب تعدد عوامل الضراوة فأن من الصعب معرفة أمراضية هذه الجرثومة بوضوح (2) .
أن وجود الأحماض الأمينية الأساسية glutamic acid , aspartic acid في مكان الإصابة يحفز الجرثومة على إفراز الذيفانات الخارجية والتي تؤدي دوراً فاعلاً في امراضية الجرثومة (3) أن جرثومة *P. aoruginosa* تسبب التهاب الرئة في الأشخاص الطبيعيين حيث تؤدي إلى أحداث التكهف وتنخر الأسناخ إضافة إلى ذات الرئة القيحي (4) . أوضح الباحث Liu(3) بأن هذه الجرثومة تفرز الأنزيم المحلل للدهون الفوسفاتية والذي يعمل على تحليل الدهون الفوسفاتية الحاوية على مجاميع الأمونيوم الرباعية مثل sphingomyolin والذي يعتبر أحد مكونات عامل الشد السطحي للخلايا الرئوية وبذلك فأن هذا الأنزيم يؤدي دوراً حاسماً في امراضية ذات الرئة المتسببة عن هذه الجرثومة عن طريق تدمير عامل الشد السطحي (1) .أن التغيرات الكيمياوية النسيجية

تعطي مؤشراً هاماً لوجود التغيرات المرضية حيث تتغير طبيعة المادة المخاطية في الممرات الهوائية عندما تحدث تغيرات مرضية في الرئة وترجع إلى حالتها الطبيعية عندما تقل أو تختفي التغيرات المرضية بعد زوال العامل المسبب وظهور مقاومة الجسم ضد الإصابة (5) ولعدم وجود دراسات سابقة عن التغيرات الكيمياوية النسيجية في الممرات الهوائية المصابة بجراثيم *P. aeruginosa* صممت هذه الدراسة لتبيان ذلك في الأرانب بعد إصابتها بهذه الجرثومة .

المواد وطرق العمل

استخدم في هذه الدراسة (12) أرنباً من كلا الجنسين ، قسمت عشوائياً إلى مجموعتين بالتساوي حقنت المجموعة الأولى بجرعة مقدارها 10^8 من جراثيم *P. aeruginosa* داخل الخلب واستخدمت المجموعة الثانية كحيوانات سيطرة حيث حقنت بـ 1 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم بنفس الطريقة . قتلت جميع الحيوانات بعد (3) يوم من الإصابة و أخذت عينات من الرئة للعزل الجرثومي والفحص المرضي حيث تم تثبيت هذه العينات في الفورمالين الدارئ المتعادل بنسبة 10% وكذلك اخذ عينات من الرئة وثبتت في محاول الكارنويز لدراسة التغيرات الكيمياوية النسيجية واستخدمت الصبغات التالية لدراسة هذه التغيرات :

1- صبغة حامض فوق ايوديك شف حسب طريقة (6) Mowry .
2- صبغة السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني 2.5 حسب طريقة (6) Mowry
3- صبغة السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني (1) حسب طريقة (7) Spicer
4- السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني 5.2 تبعتها صبغة حامض فوق ايوديك شف (8) Spicer et al
5- صبغة السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني 1 تبعتها صبغة حامض فوق ايوديك شف (8)
6- صبغة الديهايد فوكسين – السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني 5.2 حسب طريقة Spicer and Mayor (9)

العترة الجرثومية

استعملت في هذه الدراسة عترة *P. aeruginosa* المرضية المعزولة من نعجة هلكت بفعل إصابتها بذات الرئة القيحي من فرع الأحياء المجهرية في كلية الطب البيطري / بغداد

وقد تم التأكد من صفاتها الكيموحيوية و البايولوجية بأجراء الفحوصات الخاصة بذلك حسب ما ذكره الباحثون (10) Quinn et al., .

ولقد تم تحديد الجرعة القاتلة لنصف العدد من الحيوانات لهذه الجرثومة حسب الطريقة الموصوفة من قبل الباحثين (11) Reed and Muench وتم عد الخلايا الحية للجرثومة بطريقة (12) Miles et al., حيث كانت الجرعة المستخدمة للحقن $^{8}10$ CFU

النتائـــــج

أظهرت الحيوانات المصابة فقدان الشهية والخمول والانطواء في مكان واحد من القفص ولقد هلك أحد هذه الحيوانات في اليوم الثالث بعد الإصابة .

لقد تم عزل جرثومة *P. aeruginosa* من النسيج الرئوي في اليوم الثالث بعد الإصابة وقد أوضح الفحص المرضي العياني للرئة وجود منطقة متكبدة غامقة مرتفعة عن مستوى سطح الرئة وقد أوضح المقطع العرضي لها خروج نضحة التهابية . لقد تميزت التغيرات المرضية المجهرية للرئة بالارتشاح الشديد للخلايا الالتهابية ولاسيما العدلات و البلاعم السنخية في النسيج الخلالي للرئة أدى إلى زيادة سمك الحواجز بين الأسناخ وضيق تجاويف الأسناخ إضافة إلى احتقان الأوعية الدموية الشعرية مع تكفيف خلوي لمفي حول الأوعية الدموية التي تعاني من وجود خثرة دموية (صورة رقم 1) . كذلك لوحظ تكفيف خلوي حول جدران الممرات الهوائية والتي تحوي بداخلها نضحة التهابية متمثلة بارتشاح العدلات فضلاً عن انسلاخ وتوسف ظهارة القصبات والقصيبات مع فرط تنسج الطبقة العضلية للأوعية الدموية وارتشاحها بالعدلات ووجود انزفة متعددة داخل تجاويف الأسناخ فضلاً عن فرط تنسج التجمعات اللمفية حول القصبات وشخصت الحالة على إنها ذات الرئة القصبية الحادة (صورة رقم 2) .

استخدمت الطرق الكيمياوية النسيجية لمعرفة التركيب الكيمياوي للمادة المخاطية للمسالك الهوائية في الأرانب المصابة تجريبياً بجراثيم *P. aeruginosa* وكما موضح في الجدول رقم (1) .

إن المادة المخاطية للممرات الهوائية موجبة التفاعل مع صبغة حامض فوق ايوديك شف حيث أخذت اللون الأحمر الأرجواني . إن حبيبات الخلايا الكأسية والغدد تحت المخاطية لرئات الأرانب المصابة بجرثومة *P.aeruginosa* أخذت اللون الأزرق عند تعاملها مع صبغة السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني (2.5) (صورة رقم 3) إلا إنها أظهرت اللون الأزرق في بعض حبيبات خلاياها في حيوانات السيطرة عند استخدام نفس الصبغة ، وعند استخدام هذه الصبغة في أس هيدروجيني (1) أخذت بعض حبيبات الخلايا الكاسية والغدد تحت المخاطية اللون الأزرق في الحيوانات المصابة ولم تتفاعل هذه الصبغة في حيوانات السيطرة (جدول 2) .

وباستخدام صبغة السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني (5.2) تبعتها صبغة حامض فوق ايوديك شف أخذت حبيبات بعض الخلايا اللون الأزرق في الحيوانات المصابة بينما اخذ قسم من هذه الخلايا اللون الأحمر الأرجواني والقسم الآخر اللون الأزرق في حيوانات السيطرة .

ولتمييز المادة المخاطية الحامضية نوع اللعابية عن المادة المخاطية الحامضية الكبريتية استخدمت صبغة الديهايد فوكسين – صبغة السين الزرقاء حيث أخذت بعض الخلايا اللون الوردي والقسم الآخر اخذ اللون الأزرق في الحيوانات المصابة (صورة 4) بينما أخذت حبيبات بعض الخلايا اللون الأزرق في حيوانات السيطرة .

المناقشـــــة

إن الارتشاح الشديد لخلايا العدلات وحدوث الآفة القيحية في النسيج الرئوي يرتبط بما تفرزه جرثومة *P.aeruginosa* للأنزيم المحلل للدهون الفوسفاتية نوع س إذ يعمل هذا الأنزيم على تنشيط عملية تحرر عوامل الالتهاب و عوامل الجذب الكيماوي وعلى وجه الخصوص Louketriene B4 الذي يعد أحد عوامل الجذب الكيماوي القوية للعدلات (14) لذلك فأن جرثوم *P.aeruginosa* تعد من الجراثيم المكونة للقيح الذي يعتبر مادة غذائية لها .

إن حدوث الآفة النخرية في النسيج الرئوي إضافة إلى الوهط والنفاخ الرئوي يرجع لعمل الأنزيم المحلل للدهون الفوسفاتية الذي يعمل على تحلل الدهون المكونة للشد السطحي للخلايا السنخية فضلاً عن إحداث الآفات النخرية في النسيج الرئوي . أن هذه النتائج كانت مطابقة لما ذكره الباحثون(15 و 16) .

إن تكون الخثرة الدموية داخل الأوعية الدموية المغذية للرئة مع احتقان الشعيرات الدموية السنخية يمكن أن يرجع إلى :

1-حدوث حالة تجرثم الدم أدى إلى احتقان الأوعية الدموية وارتشاح جدرانها بالخلايا الالتهابية وخاصة العدلات .

2- جرثومة *P. aeruginosa* تسبب آفات مرضية في العضلة القلبية وتؤدي إلى قصور عمل القلب وبالتالي تكون الخثرة الدموية (17) .

3- أن جرثومة *P. aeruginosa* تفرز انزيم البروتيز والذي يؤدي إلى تمزيق وجرح بطانة الأوعية الدموية وتكوين الخثرة (10) . أن حدوث فرط التنسج اللمفي حول الأوعية الدموية والممرات الهوائية يشير إلى نمو الاستجابة المناعية ضد الإصابة بهذه الجرثومة ويتفق مع ما ذكره (17) عند دراسة التغيرات المرضية في رئات القرود المصابة بهذه الجرثومة .

أظهرت الدراسة الكيمياوية النسيجية لرئات الأرانب المصابة تجريبياً بجراثيم *P. aeruginosa* فرط تنسج الغدد المخاطية والخلايا الكأسية وفرط إفراز المادة المخاطية ، إن فرط تنسج هذه الخلايا غير معروف ولربما يرجع إلى بعض العوامل المحفزة التي تنتج من الاستجابة النمطية للالتهاب .

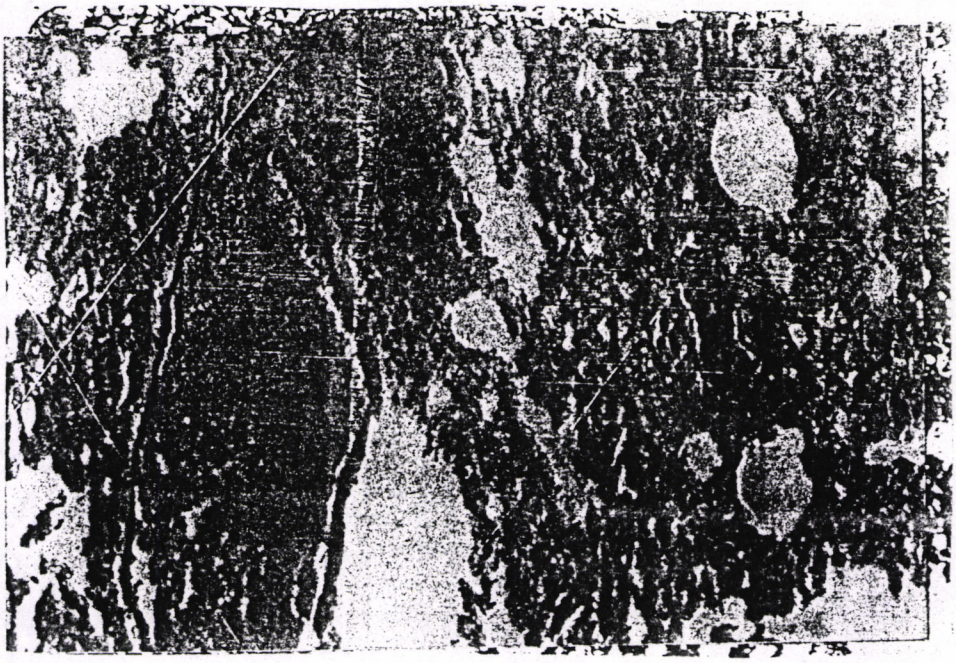
أظهرت هذه الدراسة بأن المادة المخاطية في الخلايا الكأسية والغدد تحت المخاطية لرئات الأرانب الطبيعية تتكون من المادة المخاطية المتعادلة وقليل من المادة المخاطية الحامضية نوع المخاط اللعابي وتحولت إلى المادة الحامضية نوع المخاط اللعابي والحامضية الكبريتية في الحيوانات المصابة .

أن المادة المخاطية تؤدي دوراً مهماً في تثبيط التصاق جرثومة *P. aeruginosa* على سطح خلايا الرغامي وخلايا ظهارة الفك الأسفل حيث تبين أن

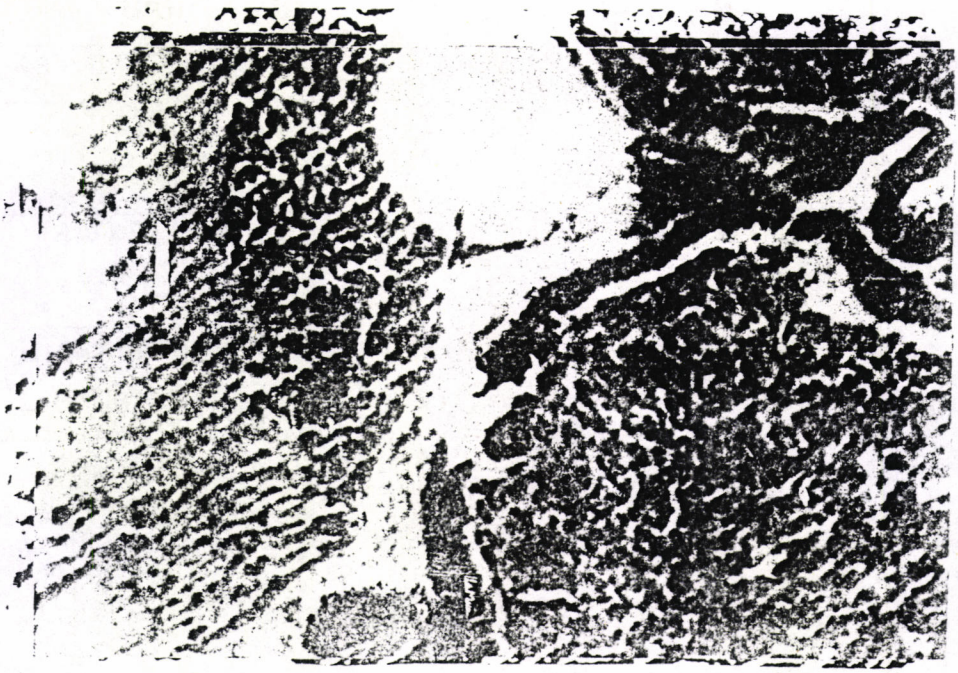
تركيب المادة المخاطية هذه مكون من خمس سكريات والتي من ضمنها مادة Neuraminic acid التي تعد ذات تأثير قوي في تثبيط التصاق الجرثومة على سطح الخلايا عن طريق ارتباط هذه المادة بموقع الارتباط الموجود على الجرثومة (18) .

إن التغيرات في طبيعة المادة المخاطية للرئة تتوافق مع شدة التغيرات المرضية وكذلك مع نمو الاستجابة المناعية ضد الإصابة (19) هنالك العديد من الدراسات الكيمياوية النسيجية السابقة أوضحت تضخم الغدد تحت المخاطية والخلايا الكأسية وفرط افراز المادة المخاطية وتغير خواصها الكيمياوية والوظيفية في المسالك الهوائية عند تعرضها للعوامل الكيمياوية والفيزياوية والبايلوجية إذ سبق أن لاحظ الباحث علوان (5) إذ المادة المخاطية في رئات خنازير غينيا تتغير طبيعتها الكيمياوية عند الإصابة بجراثيم *Nocardia asteroides* . إن سبب تغير طبيعة المادة المخاطية غير واضح ، هنالك أنزيمات خلوية تعرف بالسكريات الناقلة تلعب دوراً مهماً في إنتاج المادة المخاطية من الخلايا الإفرازية وتزداد هذه الخلايا عند الأنزيمات عند فرط تنسج الخلايا الإفرازية (19) مما يؤدي إلى فرط إفراز المادة المخاطية .

لقد أوضح الباحثان Ganatwinon and Korhnon (20) بأن إفراز المادة المخاطية يؤدي إلى تغير في طبيعتها الكيمياوية وتزداد كمية إفراز الحامض اللعابي الذي يسبب زيادة لزوجة المادة المخاطية (21) . إن زيادة لزوجة المادة المخاطية للممرات الهوائية يقلل سرعة ضربات الأهداب وانسداد الممرات الهوائية بالنضحة المخاطية ويوفر الظروف الملائمة للنمو الجرثومي وهلاك الحيوان بسبب الإصابات الثانوية والاختناق (22) .



صورة رقم –1 : مقطع في رئة أحد أرانب مجموعة الحقن داخل الخلب في اليوم الثالث بعد الحقن . لاحظ ارتشاح جدران الأسناخ بالخلايا الالتهابية مع وجود الخثرة الدموية . (H&E X20)



صورة رقم –2 : مقطع في رئة أحد أر أنب مجموعة الحقن داخل الخلب في اليوم الثالث بعد الحقن . لاحظ فرط التنسخ وانسلاخ وتوسف ظهارة القصبات ، مع فرط تنسج التجمعات اللمفية حول القصبات(H & E X20) .

جدول رقم (1)

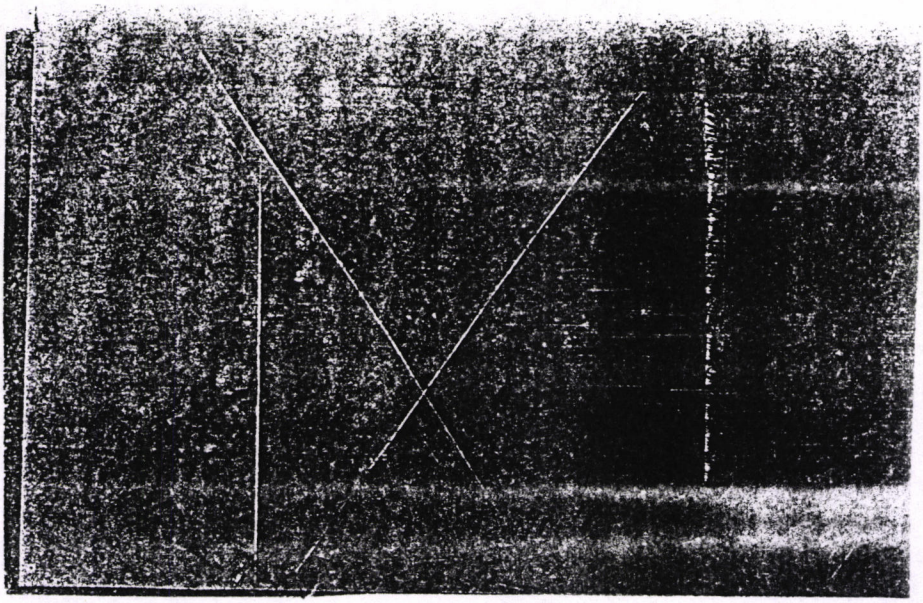
الصفات الكيميائية النسيجية للخلايا الكاسية والغدد تحت المخاطية في المسالك الهوائية لمجاميع الأرانب المصابة تجريبياً بجرثومة الـ *P. aeruginosa*

الصبغة	الخلايا الكأسية	الغدد تحت المخاطية
PAS	احمر	احمر
Ab P^H2.5	ازرق	ازرق
Ab P^H1.0	ازرق -	ازرق -
Ab P^H2.5-PAS	ازرق -	ازرق -
Aldehyde Fuchsin-Ab2.5	ارجواني ازرق	ارجواني ازرق

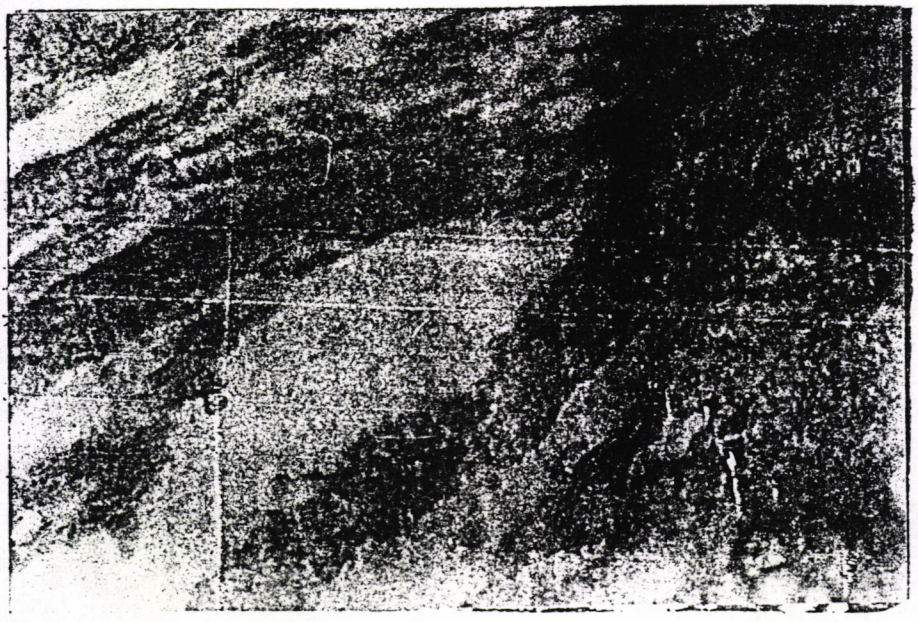
جدول رقم (2)

الصفات الكيميائية النسيجية للخلايا الكأسية والغدد تحت المخاطية في المسالك الهوائية لمجاميع أرانب السيطرة

الصبغة	الخلايا الكأسية	الغدد تحت المخاطية
PAS	احمر	احمر
Ab P^H2.5	ازرق -	ازرق -
Ab P^H1.0	-	-
Ab P^H2.5-PAS	احمر ارجواني ازرق	احمر ارجواني ازرق
Aldehyde Fuchsin – Ab2.5	ازرق -	ازرق -



صورة رقم –3 : تبين حبيبات الخلايا الكأسية في ظهارة قصبات أحد أرانب مجموعة الحقن داخل الخلب في اليوم الثالث بعد الحقن وقد أخذت اللون الأزرق باستخدام صبغة السين الزرقاء ذات الأس الهيدروجيني 2.5(X10)



صورة رقم –4 : تبين حبيبات الخلايا الكأسية وقد أخذت بعض الخلايا اللون الأزرق والبعض الآخر اللون الأرجواني في ظهارة قصبات أحد الحيوانات المصابة باستخدام صبغة الديهايد فوكسين – السين الزرقاء P^H 2.5 (X20) .

References

1- Vasil,M.L.(1986). *Pseudomonas aeruginosa*; Biology mechanism of virulence, epidemiology. J.Podiat. 108 : 800-805 .

2-Noas, T.I. and Glewski, B.H.(1985) . the contribution of exoproducts to virulence of *P.aeruginosa* . Can. J.Microb. 31:387-392 .

3-Liu, P.V.(1974) . Extracellular toxins of *P. aeruginosa* J.Infect. . Dis. 130:594-599.

4-Richards, M.J.; Edwards, J.R.; Culure, D.H. and Gaynes, R.P.(1999) . Nosocemial infection in pediatric intensive care units in the United State,Pediatrics. 103:39-40 .

5-Alwan, M.J. (1997) . Histopathological and histochomical changes in the pulmonary tissues of cattle infected with hydatid cyst. Iraqi Vet. Med.J.21:80-92 .

6-Mory, R.W.(1956) . Alciablue techniquos for the histochomical study of acidic carbehydrates .J. Histochem. 4:407-414 .

7-Spicer, S.S. (1960) . The use of various catinunic reagent in histochemical of mucapolysacchrides. Am.J. Clin. Path. 36:393-400 .

8-Spicer, S.S. ; Horn , R.G. and Loppi , T.J.(1967) . Histochomistry of connective tissue mucepolysacchrides. In the C.T. intornational academy of pathology, monograph No. 7 . Williams Co. Baltimoro, PP. 251-303.

9-Spicer, S.S. and Moyer, D.B. (i1960) . Technical section . histochomical diffeenatiatien acid Mucepolysacchrides. by means of combined aldehyed fuchsin-alcian blue staining . Am.J. Clin.Path. 33:435-460 .

10-Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.K. and Carter, G.R.(1994) . In : Clinical Vet. Microbiol. Mosby , London . Philadolphia. St. louts. Sydney. Tokyo .

11-Reed, D.J. and Muench, H.(1938) . Asimple of estimating fifty percent endpoints . Am. J.Hyg . 27: 493-497 .

12-Miles, A.A.; Misra, S.S. and Irwin, J.O. (1938) . The estimation of bactericidal power of blood .J. Hyg. 38:732-749 .

13-Konig , B.; Vasil, M.L. and Koing , W. (1997) . Role of hemolytic and nonhemolytic phosholipasec from *P. aeruginosa* for inflammatrory modiater release from human granulecytes. Int . Arch , Allergy . Immun. 112:115-124 .

14-Coalsen , J.J.; Junjii, H.H. and Mary, L.W. (1986) . Morphologic and microbiologic features of *P.aeruginosa* Pneumonia in normal hamsters . Experm . and Moloc. Path. 45:193-602 .

15-Tam, N.; Snipes, G.J. and Sterensan , M.M. (1999). Characterization of chronic bronchopulmonary *P. aeruginosa* infection in resistant and susceptible in brod mouse strains . Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 20;710-719 .

16-AL-Kutbi, S.H. (2000) . Study on some aspects of pathogenesis of *P. aeruginosa* in rabbits M.Sc.. Thesis submitted to Coll. Vet. Med. University of Baghdad .

17-Choung , A.T. Mess, R.B. ; Kurland , G. andnevick , W.J. (1993) . Chrenic *P. aeruginosa* endobronchitis in rhesus monkeys 11. A histopathological analysis. J. Med. Primatol . 22:257-262 .

18-Ramphal , R. and Pyle, M. (1983) . Evidence for mucins and Sialic acid as receptor for *P. aeruginosa* in the lower repiratory tract infect. Immun . 83 : 500-504 .

19-Baker, J.R. ; Moyer, B.B. and Summer, A.T. (1973) . Effect of chronic sulpher dioxide inhalation on the carbohydrato histochomistry . Am. Rev. Resp. Dis .110:13-21.

20-Ganatwinon, A. and Korhnon, C.B. (1969) . The action of mucinin in promoting infection in goats . Brit. J. Exp. Path. 47: 355-357 .

21-Gibbons , R.A. (1959) . Chemical properties of two mucoides from bovine cervical muein . Biochem. J. 73:209-214

22-Groften , J. and Douglas , A. (1981) . Respiratory disease, 3rd edd. Oxford, London .

Pathological and histochemical changes in the lungs of rabbits experimentally infected with *P.seudomonas aeruginosa*

AL. Kutbi, S.H. and Alwan, M.J.

Dept. of Vet. Pathology and Poultry, College of Vet. Med. University of Baghdad, Iraq .

Summary

The main objective to this study is to demonstrate certain aspects of pathological and histochomical changes in the lungs of rabbits experimentaly infected with *P.aeruginosa* .

Twelve white Newzoland rabbits of 12-16 weeks old were used . they were randomaly divided into two groups. The first group (6 animals) were given single intraperitoneal, dose of 10^8 CFU of *P. aeruginosa* . The second group (6 animals) maintained as a control and was inoculated with 1 ml of sterial normal saline by the same route of the first group. All the animals were sacrificed on day three post – inoculation .

The pathological exmination showed acute suppurative reaction in pulmonary tissue together with lymphocytic aggregation around airways and blood vessels . The histochomical study revealed that the granules of goblet cells and submucesal glands of the lung in normal rabbits were of neutral mucopolysaecharides and little sialomucin, these substances changed to sulfated acid mucopolysaccharide and sialomucin in the infected animals .