

استخدام الغشاء اللقائقي المشيمي لأجنة بيض الدجاج المخصب كنموذج داخل الجسم الحي لدراسة تأثير الديكساميثازون على صورة الدم

محمد خالد شندالة

كلية الطب البيطري/ جامعة الموصل

محمود بشير محمود المشهداني

كلية الطب البيطري/ جامعة دهوك

الخلاصة

تهدف دراستنا الحالية الى امكانية استخدام اختبار الغشاء اللقائقي المشيمي لاجنة بيض الدجاج المخصب كنموذج داخل الجسم الحي لدراسة تأثير عقار الديكساميثازون على العد التفرقي لخلايا الدم البيض . اظهرت نتائج دراستنا الحالية احتواء المسحة الدموية من اجنة بيض الدجاج وبعمر 13-15 يوم من الحضن على جميع انواع خلايا الدم البيضاء الناضجة () . وبسبب فترة الحضانة القصيرة لاجنة بيض الدجاج المخصب بعد المعاملة بالديكساميثازون والتي كانت 90 دقيقة فقط لذلك لم يلاحظ حدوث اي فروقات معنوية في اعداد خلايا الدم البيضاء (الخلايا اللمفية والخلايا الهيتروفيل والخلايا الحمضات والخلايا القعدات والخلايا وحيدة النواة) بين المجاميع المعاملة بالجرع المختلفة بالديكساميثازون (2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 مايكروغرام/غرام من وزن البيضة ، موضعيا)، نستنتج من دراستنا الحالية امكانية استخدام الغشاء اللقائقي المشيمي كنموذج داخل الجسم الحي لدراسة التغيرات في العد التفرقي لخلايا الدم البيضاء وذلك لاحتواء المسحة الدموية على جميع انواع خلايا الدم البيضاء لاسيما ان تكاليف هذا النموذج منخفضة مقارنة بالحيوانات المختبرية

المقدمة

بالديكساميثازون للكشف عن التأثيرات المثبطة للعقار على الجهاز المناعي وبسبب التكاليف الباهضة التي يتم صرفها على الحيوانات المختبرية من تغذية وتربية وعناية وتوفير البيئة المناسبة لتربيتها عند اجراء الأبحاث عليها لذلك اتجه العلماء بالبحث عن بدائل عن هذه الحيوانات المختبرية حتى توصلوا الى نسيج حي بيولوجي يحتوي على شبكة كثيفة من الأوعية الدموية ، شفاف وذو لون ساطع وهو الغشاء اللقائقي المشيمي لاجنة بيض الدجاج المخصب (Hen's Egg Test - Chorioallantoic membrane test) (6,7,8,9,10) لذلك كان الهدف من الدراسة الحالية هو امكانية استخدام الغشاء اللقائقي المشيمي لاجنة بيض الدجاج المخصب كنموذج داخل الجسم الحي لدراسة تأثير عقار الديكساميثازون على العد التفرقي للخلايا الدم البيضاء Differential leukocyte count.

يعد الديكساميثازون (Dexamethasone) من القشرانيات السكرية (Glucocorticoids) والتي تنتمي الى مجموعة الستيرويدات القشرية الصناعية (Synthetic corticosteroid) (1) والمستخدم سريريا في مجال الطب البيطري كمضاد للالتهاب (Anti-inflammatory effect) وفي حالة الإصابات التحسسية والجلدية (2, 3). يمتلك عقار الديكساميثازون التأثيرات المثبطة للجهاز المناعي بسبب التغيرات التي يحدثها في الصورة الدموية وخاصة المتعلقة بخفض أعداد الخلايا اللمفاوية lymphopenia والتي تلعب دور كبير في الاستجابة المناعية مما يؤدي الى تعرض الحيوانات المعاملة بالديكساميثازون ولفترات طويلة الى الإصابة بالامراض الفطرية والبكتيرية والناجمة عن تثبيط الجهاز المناعي لها (4,5) من هنا يتبين اهمية دراسة الصورة الدموية في الحيوانات المعاملة

المواد وطرائق العمل

الحضن حيث تكون الأوعية الدموية للغشاء اللقائقي المشيمي قد وصلت الى مرحلة النضوج الكامل (8,11) . لقد تم التأكد من احتواء ألبیضة على الجنين بواسطة الفحص الضوئي (Candling) وبعدها حدد جهة الغشاء اللقائقي المشيمي الواقع تحت الغرفة الهوائية وتأشيرها بقلم رصاص ثم أزيل المقطع المحدد من قشرة البيضة الخارجية وبمساحة (1) سم مربع باستخدام جهاز ثقب البيض (Rotating dentist saw blade) ، رطب الغشاء الداخلي للقشرة بوضع قطرات من الماء المقطر وعند درجة حرارة 37°C وتركه لمدة قليلة من الزمن بعد ذلك تم رفع الغشاء الداخلي للقشرة بعناية باستخدام الملقط ليتم الحصول مباشرة على الغشاء اللقائقي المشيمي الحاوي على شبكة كثيفة من الأوعية الدموية (12) وقد تمت جميع هذه الخطوات في حجرة الزرع (Culture hood) وتحت ظروف معقمة . أجريت الدراسة في مختبر الأدوية/الدراسات العليا التابع لفرع

لقد تم في هذه الدراسة استخدام الغشاء اللقائقي المشيمي لأجنة بيض الدجاج المخصب كنموذج داخل الجسم الحي لدراسة تأثير عقار الديكساميثازون (الشركة العامة للأدوية والمستلزمات الطبية - في نينوى/العراق) على صورة الدم وعند الجرع (2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 مايكروغرام/غرام من وزن البيضة ، موضعيا)

- تحضير الغشاء اللقائقي المشيمي لاجنة بيض الدجاج المخصب لأجراء التجربة

تم الحصول على بيض الدجاج المخصب نوع روز 308 من مفسس الأخوين في مدينة الموصل /محافظة نينوى/العراق وبعمر خمسة أيام من الحضن ثم تم متابعة الحضن في الحاضنة (Karl Kolb-Scientific Technical Supplies D.6072 Dreieich.Germany) حتى يصل الجنين الى العمر المطلوب لأجراء التجربة وهي الأيام من 13-15 من

7- المجموعة السابعة: تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بعقار الديكساميثازون وبالجرعة (128 مايكروغرام/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) .

8- المجموعة الثامنة : تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بمحلول البروبلين كلايكول (Propylene glycol) وبحجم جرعة (0.01 مل/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) . أدخلت هذه المجموعة ضمن تصميم التجربة وذلك لان محلول البروبلين كلايكول كان هو المذيب (Solvent) للعقار الديكساميثازون . لقد تمت إضافة عقار الديكساميثازون او البروبلين كلايكول على احد الأوعية الدموية الكبيرة (vessels 1st order) للغشاء اللقائقي المشيمي وبحجم جرعة (0.01 مل/غم من وزن البيضة الكلي) (13) ثم تم غلق الفتحة بلاصق شفاف وأعيدت البيضة المعاملة الى الحاضنة وبعد مرور 90 دقيقة تم أخراج البيضة من الحاضنة وتم سحب الدم وعمل مسحة دمويه وثبتت باستخدام الكحول المثلي 70% وبعدها غمرت بصبغة كيمزا (Gimza stain) ثم جففت كي تكون جاهزة لإجراء العد التفريقي لخلايا الدم البيض عليها Differential Leukocyte Count حيث تم حساب النسبة المئوية لكل نوع من خلايا الدم البيض والتي تضمنت الخلايا اللمفية Lymphocyte والخلايا الهيتروفيل Hetrophil والخلايا القعدات Basophiles والخلايا وحيدة النواة Monocytes (14).

الفسلجة والكيمياء الحياتية والأدوية/ وكذلك فرع الصحة العامة البيطرية/ كلية الطب البيطري /جامعة الموصل)

- معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي

تصميم التجربة: قسمت مجاميع التجربة الى 8 مجاميع بحيث ضمت كل مجموعة 5 بيضات لكل مجموعة

- 1- المجموعة الأولى: تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بعقار الديكساميثازون وبالجرعة (2 مايكروغرام/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) .
- 2- المجموعة الثانية : تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بعقار الديكساميثازون وبالجرعة (4 مايكروغرام/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) .
- 3- المجموعة الثالثة : تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بعقار الديكساميثازون وبالجرعة (8 مايكروغرام/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) .
- 4- المجموعة الرابعة : تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بعقار الديكساميثازون وبالجرعة (16 مايكروغرام/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) .
- 5- المجموعة الخامسة : تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بعقار الديكساميثازون وبالجرعة (32 مايكروغرام/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) .
- 6- المجموعة السادسة : تمت معاملة الغشاء اللقائقي المشيمي بعقار الديكساميثازون وبالجرعة (64 مايكروغرام/غم من وزن البيضة الكلي ، موضعياً) .

التحليل الاحصائي

LSD - significant difference) وكان مستوى الاختلاف المعنوي عند مستوى احتمال (>0.05) (15)

حللت البيانات إحصائياً باستخدام تحليل التباين (Two way analysis of variance) وبعدها طبق عليها اختبار الفرق المعنوي الأدنى (Least

النتائج والمناقشة

المختلفة بالديكساميثازون (2، 4، 8، 16، 32، 64، 128، مايكروغرام/غرام من وزن البيضة ، موضعياً) . (جدول رقم 1) حيث انه من غير الممكن خلال هذه الفترة القصيرة ان يحدث تغيرات في توزيع خلايا الدم مابين جهاز الدوران والنسيج اللمفاوي حيث اشار (3) ان سبب التغيرات في اعداد خلايا الدم البيضاء يعود الى اعادة في توزيع الخلايا من مجرى الدوران الى النسيج اللمفاوي وقد جاءت هذه النتيجة متفقه مع ماتوصل اليه (16) من عدم حصول أي فروقات معنويه في العد التفريقي لخلايا الدم البيضاء بعد مرور (120) دقيقه من حقن الكورتزول في الخيول . نستنتج من دراستنا الحالية امكانية استخدام الغشاء اللقائقي المشيمي كنموذج داخل الجسم الحي لدراسة التغيرات في العد التفريقي لخلايا الدم البيضاء وذلك لاحتواء المسحة الدموية على جميع انواع خلايا الدم البيضاء لاسيما ان تكاليف هذا النموذج منخفضة مقارنة بالحيوانات المختبرية .

لقد كان الهدف من الدراسة الحالية هو امكانية استخدام الغشاء اللقائقي المشيمي لاجنة بيض الدجاج المخصب كنموذج داخل الجسم الحي لدراسة تأثير عقار الديكساميثازون على العد التفريقي لخلايا الدم البيضاء . لقد أظهرت نتائج دراستنا الحالية امكانية عمل مسحات دموية من اجنة بيض الدجاج المخصب وبعمر 13- 15 من الحضن حيث احتوت المسحة الدموية على جميع أنواع الخلايا الدم البيضاء (الخلايا اللمفية والخلايا الهيتروفيل والخلايا الحمضات والخلايا القعدات والخلايا وحيدة النواة) والتي كانت شبيهة بالمسحة الدموية لللافراخ البالغة مما يعكس اهمية هذا النموذج في كشف التأثيرات الجانبية للمركبات الدوائية على صورة الدم . وبسب فترة الحضانة القصيرة لاجنة بيض الدجاج المخصب بعد المعاملة بالديكساميثازون والتي كانت 90 دقيقة فقط لذلك لم يلاحظ حدوث اي فروقات معنوية في اعداد خلايا الدم البيضاء (الخلايا اللمفية والخلايا الهيتروفيل والخلايا الحمضات والخلايا القعدات والخلايا وحيدة النواة) بين المجاميع المعاملة بالجرع

جدول رقم (1) يمثل تأثير عقار الدكساميثازون على العد التفرقي لخلايا الدم البيضاء لاجنه بيض الدجاج.

Compound Dose	Lymphocyte % after 90 min.	Heterophile % after 90 min	Monocyte % after 90 min	Esinophile % after 90 min	Basophile % after 90 min
Propylen glycol 0.01 ml\g	0.33± 55.9	2.14 ± 35.9	0.39± 5.9	0.18± 1.5	0.13± 0.8
128 mg\g	1.95 ± 55.9	1.88± 36.2	0.40 ± 5.1	0.23± 2.1	0.14± 0.7
64 mg\g	2.31 ± 54.9	1.80± 36.3	0.37 ± 6.1	0.13± 1.9	0.14± 0.8
32 mg\g	2.81 ± 54.0	1.80± 38.1	0.40± 4.9	0.36± 2.0	0.21± 1.0
16 mg \g	2.40 ± 52.8	2.39± 39.4	0.39 ± 5.1	0.32± 2.0	0.14± 0.6
8 mg\g	2.53± 52.3	0.72± 40.1	0.39± 5.6	0.20 ± 1.5	0.17± 0.6
4 mg\g	1.45 ± 53.0	3.94 ± 38.6	1.01± 5.7	0.27± 1.9	0.13± 0.8
2 mg\g	0.54 ± 55.8	2.74± 37.0	0.37± 4.7	0.18± 1.7	0.11± 0.8

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي (خمسة بيضات مخصبة/جرع

شكر وتقدير

نقدم شكرنا وتقديرنا الكبير الى كلية الطب البيطري اجمعه الموصل لدعمها المادي والمعنوي في تسهيل انجاز هذا البحث.

المصادر

1. Rang,H. P., M. M. Dale ., J. M. Ritter ., R. J. Flower and G. Henderson. 2011. Pharmacology .7th ed., Elsevier Ltd., London, United Kingdom, pp. 411-418,161-163.
2. Plumb, D.C. 2008. Plumbs Veterinary Drug Handbook , 6th ed., lackwell publishing professional, Iowa,U-AS,pp.354-360, 884-885m,464-467
3. Michelle, A. C., F. Richard., A.R. Jose and, W. Karen. 2012. Lippincotts illustrated reviews: Pharmacology. 6th ed., Wolters Kluwer \ Lippincott Williams and wilkins. Florida, USA,pp.25-27.
4. Schuld , A ., T. Kraus., M. Haack., D. Hinze-selch., A.W. Zobel., F. Holsboer and T. Pollmacher . 2001. Effect of dexamethasone on cytokineplasma levels and white blood cell counts in depressed patients. Psychoneuroendocrinology. 2
5. Anderson , B. H., D. L. Watson and I. G. Colditz. 1999. The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. Vet . Res. Commun. 23: 399- 413.
6. Maksimov, V. F. and I. M. Korostyshevsk-aia. 2007. Developmental peculiarities of gas transporting system in chick embryo under respiratory surface restriction Rossiski Fiziologicheskii Zhurnal ime ni I. M. Schenova, 93(12): 1413 -1422.

7. Ribatti, D. 2008. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis . *Int Rev Cell Mol Biol.*, 270: 181-224
8. Saw, C. L. L., P.W.S. Heng and C.V Liew. 2008. Chick chorioallantoic membrane an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation developmental review *Drug Development and Industrial Pharmacy.*, 34(11):1168-1177.
9. Gabrielli, M. G and D. Accili . 2010. The chick chorioallantoic membrane : a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*, Doi (10): 1-12 .
10. Knudsen, L. E., M. Leenaars., Savenize, B.S. and Ritskes-Moitinga, M. (2011): *Alter-natives: refinement, Reduction and Replacement of Animal Uses in Life Sciences*. In: Mau, j. and Schapiro, S.j.(eds). *Hand book of laboratory animal science*. 3rd ed., Taylor and Francis group, LLC, Florida, USA.pp: 635-652.
11. Pegaz, B., E. Debeve, J., G. Ballini. Wagnieres., S., V. Spaniol. D., Albrecht, Scheglmann., N. Nifantiev., H. Van den Bergh and Y.N. Konan-Kouakou. 2007. Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulation: preclinical assessment on chick chorioallantoic
12. Forough, R., Y. N. Wang., L. A Martinezemus., D. Thomas., Z. Sun., K. Motamed., J. L Parker and G.A . Meininger. 2003. Cell-based and direct gen transfer - induced angiogenesis via a secreted chimeric fibroblast growth factor-1(sp-FGF-1) in the chick chorioallantoic membrane (C M). *Angiogenesis.*, 6:47-54
13. Saw, C. L. L., M. Olivo, W. W. L Chin., K. C. Soo and P.W.S Heng. 2005. Transport of hypericin across chick chorioallantoic membrane and photodynamic therapy vasculature assessment. *Biol.Pharm. Bull.*, 28 (6):1054-1060.
14. Coles, E. H. 1986 . *Veterinary clinical pathplogy*. 4th ed. W.B Saunders Co. Philadelphia ,USA PP.46-62.
15. Katz, M. H.2006. *Study Design and Statistical Analysis a Practical Guide for Clinicians*, 1st ed., Cambridge University Press, United Kingdom, pp.88 -89.
16. Burquez, P . N., J. Ousey., R. S. G. Cash and P. D. Rossdale. 1983. Changes in blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals . *Equine Veterinary Journal*. 15: 58-60.

The use of the hen's Egg test – chorioallantoic membrane (HET- CAM) test as a novel in vivo model to study the effects of dexamethasone on a differential white blood cell counts.

M. Kh. Shindala

Coll. of Vet. Med./Unive. of Mosul

M. B. Al-Mashhadany

Coll. of Vet. Med./Unive. of Duhok

Abstract

The aim of the present study was to investigate the possibility to use the hen's Egg test – chorioallantoic membrane (HET- CAM) test as a novel in vivo model to study the effects of dexamethasone on a differential white blood cell counts. The result revealed that, the blood smeared of chick embryos in age 13- 15 days of incubation had to the all types of mature leukocytes . Because of the short period of chick embryos were treated with dexamethasone (90 minutes) only showed did not significantly changes in leukocyte counts (lymphocyte, Heterophil, Monocyte, Eosinophil and Basophil) in treated groups with different doses of dexamethasone (2 , 4 , 8 , 16 , 32 , 64 , 128 mcg\ gram of total egg weight, topically). We conclude for our study that, the (HET- CAM) test can be used as in vivo model to study the effects of dexamethasone on differential leukocyte counts ,because of the blood smear have all types of leukocyte, also this study manifested this model have low cost accompanied with other laboratory animals.