

## العد التفريقي لكريات الدم البيضاء في الهامستر الذهبي المخمخ تجريبيا باللشمانيا الاحشائية

فوزية احمد الشنوي، علاء حسين العمران، حيدر زهير السامرائي

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد، العراق.

الاستلام: 2004/10/2 القبول: 2005/10/31

### الخلاصة

يعد داء اللشمانيا الاحشائية من الأمراض المتوطنة في العراق وخاصة في المناطق الجنوبية و من ابرز العلامات المرضية لهذا الخمج هو التثبيط المناعي الذي يعاني منه المريض والذي ينعكس بصورة واضحة على صورة الدم وقد هدفت هذه الدراسة إلى متابعة التغيرات الدموية لدى الهامستر الذهبي المخمخ باللشمانيا الاحشائية خلال فترات متابعة مختلفة تضمنت الأوقات (20,35,65,100) يوم بعد الخمج وذلك باعتماد العد التفريقي لكريات الدم البيضاء إذ لوحظ انخفاض عام في العدد الكلي لكريات الدم البيضاء و زيادة ملحوظة في النسبة المئوية للكريات الحمضه ووحيدات النوى في الشهر الأول من الخمج أما للمفاويات فقد لوحظت زيادة معنوية في النسبة المئوية لهذه الخلايا في الشهر الأول والثاني بعد الخمج أما النسبة المئوية للخلايا العدلة فقد انخفضت انخفاضاً معنوياً في الأوقات (20,35,65) يوم بعد الخمج وعادت إلى النسبة الطبيعية في الشهر الثالث بعد الخمج و من ملاحظة النتائج يمكن الاستنتاج بان الخمج باللشمانيا الاحشائية قد اثر بصورة واضحة على النسب المئوية للكريات البيضاء .

### Abstract

Visceral leishmaniasis is one of the endemic diseases in Iraq & one of clinical symptoms of this disease is the immunosuppression.

This study has demonstrated some of the hematological changes of golden hamsters experimentally infected with *L.donovani* for 100 days (20,35,65,100 days) post infection; Differential count of blood leukocytes showed lymphocytosis at the 20<sup>th</sup> & 35<sup>th</sup> days following infection, while neutropenia was noticed at the 20<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup> & 65<sup>th</sup> days following infection & also monocytosis & eosinopenia was noticed at the 20<sup>th</sup> & 35<sup>th</sup> days following infection, thus it may be concluded that infection with *L.donovani* may affect hematopoietic progenitor cells influence & that oppose on the percentage of blood leukocytes.

### المقدمة

يعد داء اللشمانيات مشكلة مهمة من مشكلات الصحة العمومية في منطقة شرق المتوسط لما لهذا الداء من اثر كبير في معدلات الخمج ولقدرته على الانتشار بأبعاد وبائية تلقي أعباء ثقيلة على الخدمات الصحية الوطنية، ويعود سبب ارتفاع معدلات الإصابة بهذا الداء إلى عدة أسباب

أهمها انتقال الأفراد غير الممنعين إلى داخل البؤر الطبيعية لانتقال العدوى والتغيرات في بيئة نواقل الخمج والمستودع النوي [1] . وفي العراق طفيلي اللشمانيا متوطن في معظم المناطق خصوصا الوسطى و الجنوبية منها [2] واحد أنواع جنس اللشمانيا هو اللشمانيا الاحشائية المسببة لخمج الحمى

عدم التلوث ثم حصدت الطفيليات (Harvesting) ورسبت بجهاز الطرد المركزي 4000 دورة / دقيقة وغسلت 3 مرات بمحلول اللوك المعقم وفي الغسلة الأخيرة علق الراسب بمحلول اللوك إذ أصبح تركيز الطفيليات  $(5 \times 10^7)$  طفيلي / مل وحقن 15 هامستر من كل مجموعة بـ 0.2 مل من التركيز السابق في التجويف الخلي (Intraperitoneal) (كأحسن موقع يعطي افضل تحسيس مناعي [9] أما مجموعات السيطرة فقد حقنت بـ 0.2 مل من محلول اللوك [10] في التجويف الخلي أيضاً؛ و قد تم جمع عينات الدم من المجموعات المخمة والسيطرة في الأوقات (100,65,35,20) يوم بعد الخمج وكآلاتي:

سحب الدم من قلب الحيوان بوساطة سرنجة سعة 1 مل و وضع في أنابيب تحوي على هيبا رين لمنع تخثر الدم وعملت مسحات الدم وصيغت بصيغة لشممان (Leishman stain) وحسب العد التفريقي لكريات الدم البيض تحت المجهر باستخدام شريحة عد كريات الدم البيضاء Haemocytometer .

#### النتائج :

##### 1. اللمفاويات Lymphocytes:

أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في النسب المئوية للخلايا اللمفاوية لمجموعة الحيوانات المخمجة الثانية والثالثة إذ كانت (72%، 78%) على التوالي بالمقارنة مع النسبة المئوية للسيطرة ( $5 \pm 66.7$ ) % إما بالنسبة لمجموعة الحيوانات المخمجة الأولى والرابعة فلم تظهر فروقات معنوية عما هو موجود في النسبة المئوية لحيوانات السيطرة إذ كانت النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية لكل منهما (65%، 62%) على التوالي، (شكل 1).

##### 2. وحيدات النوى Monocytes:

أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية للخلايا وحيدة النوى لدى حيوانات المجموعة المخمجة الأولى والثانية إذ كانت (8%، 5%) على التوالي مقارنة مع النسبة المئوية لحيوانات السيطرة ( $1.5 \pm 2.5$ ) % أما بالنسبة لمجموعة الحيوانات المخمجة الثالثة والرابعة فلم تظهر فروق معنوية عما هو موجود في النسبة المئوية لحيوانات السيطرة إذ كانت النسبة المئوية لخلايا وحيدة النوى لكل منهما (2.1%، 3%) على التوالي، (شكل 2) .

##### 3. الخلايا العدلة Neutrophils:

السوداء الذي خص بالعديد من الدراسات خصوصاً المناعية منها لما يحدثه هذا الطفيلي من تثبيط واضح للجهاز المناعي للمضيف المخمج [3] ومن المعروف ان طفيلي اللشمانيا حال دخوله الى جسم المضيف فإنه يهاجم من قبل خلايا الجهاز الشبكي البطاني (خلايا البلاعم العملاقة Macrophages) والتي يستخدمها كيوارة للتكاثر [4] وبالتالي فإن كريات الدم البيضاء والتي تعد الخط الأمامي للجهاز المناعي سوف تتأثر بصورة ملحوظة عند الخمج باللشمانيا الاحشائية، إذ يعاني المريض من نقصان في العدد الكلي لكريات الدم البيض عموماً يصاحبه زيادة في النسبة المئوية لوحيدات النوى واللمفاويات و قله في عدد الصفائح الدموية (Thrombocytopenia) وفقر دم يعود الى قصر دورة حياة الكرية الحمراء بالإضافة الى انعكاس نسبة الألبومين إلى الغلوبولين في بلازما الدم [5,6] ولذلك فقد هدفت الدراسة الحالية إلى متابعة التغيرات التي تطرأ على كريات الدم البيض في الهامستر الذهبي المخمج تجريبياً باللشمانيا الاحشائية خلال نمو وتطور الخمج و ذلك باعتماد فحص العد التفريقي لكريات الدم البيض (Differential count of W.B.C) في الأوقات (100,65,35,20) يوم بعد الخمج بالمقارنة مع مجموعات السيطرة.

#### المواد وطرائق العمل

استخدم الهامستر الذهبي *Mesocricetus auratus* كأفضل حيوان مختبري يعطي نموذجاً مثالياً للكالازار المتقدم كما هو الحال مع الإنسان [7] إذ استخدم 60 ذكر من الهامستر بعمر 4-6 أسابيع، وقسمت إلى أربعة مجموعات كل مجموعة تتكون من عشرة حيوانات حقنت باللشمانيا الاحشائية و خمسة حيوانات حقنت بمحلول اللوك واعتبرت كمجموعة سيطرة وتم التعامل مع هذه المجموعات في الأيام (100,65,35,20) يوم بعد الخمج.

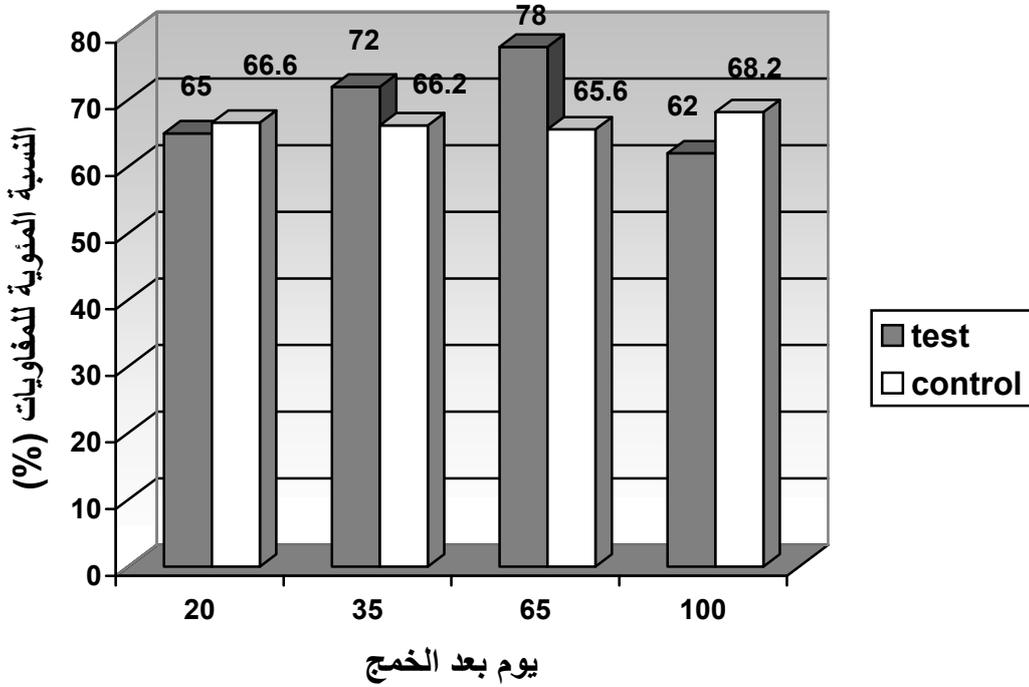
#### إحداث الخمج في الحيوانات باللشمانيا الاحشائية

تم تحضير 500 مليلتر من الوسط ثنائي الطور (NNN Medium) و وزع في قناني محكمة الغلق ومعقمة، وتم تلقيح الوسط باللشمانيا الاحشائية من مزروع نقي غير ملوث وحفظ المزروع في الحاضنة بدرجة 26م [8] وفي اليوم الخامس بعد الزرع فحصت المزارع مجهرياً للتأكد من

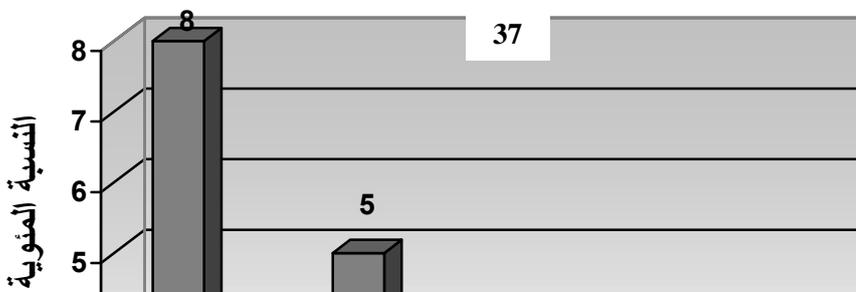
أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية للخلايا الحمضة لمجموعة الحيوانات المخمجة الأولى والثانية إذ كانت (9%، 8%) على التوالي مقارنة مع النسبة المئوية لحيوانات السيطرة ( $1.6 \pm 2.8$ ) % أما بالنسبة لمجموعة الحيوانات المخمجة الثالثة والرابعة فلم تظهر فروقات معنوية عما هو موجود في النسبة المئوية لحيوانات السيطرة إذ كانت النسبة المئوية للخلايا الحمضة لكل منهما (3.6%، 2%) على التوالي، (شكل 4).

أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية للخلايا العذلة لمجموعة الحيوانات المخمجة الأولى والثانية والثالثة إذ كانت (17%، 13%، 11%) على التوالي مقارنة مع النسبة المئوية لحيوانات السيطرة ( $28.3 \pm 5.36$ ) % أما بالنسبة لمجموعة الحيوانات المخمجة الرابعة فلم تظهر فروق معنوية عما هو موجود في النسبة المئوية لحيوانات السيطرة إذ كانت النسبة (26.5%) وهي قيمة ضمن النسبة المئوية للسيطرة، (شكل 3).

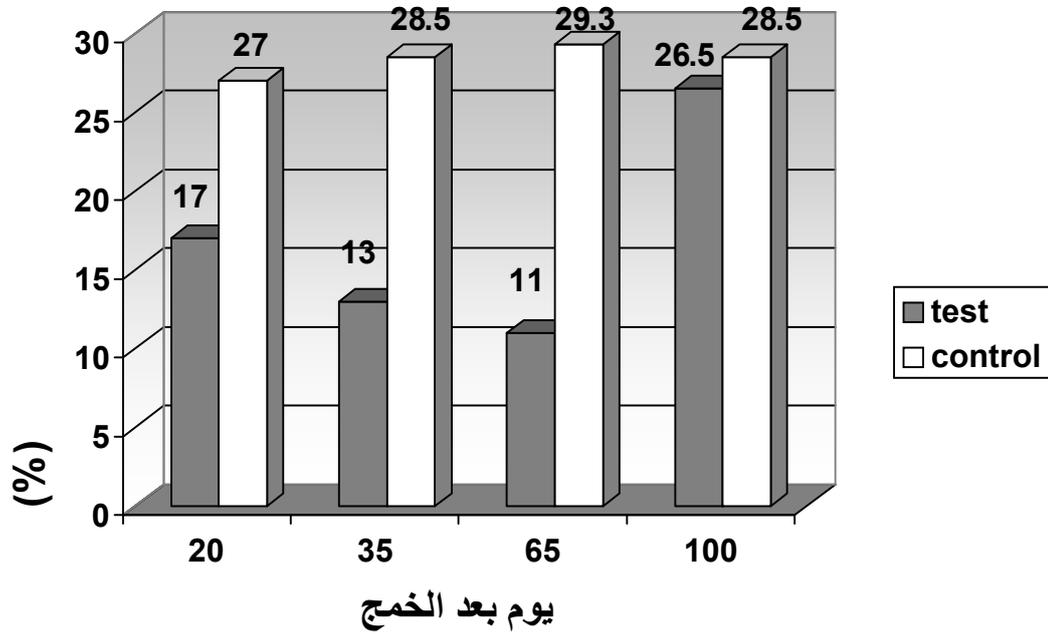
#### 4. الخلايا الحمضة Eosinophiles:



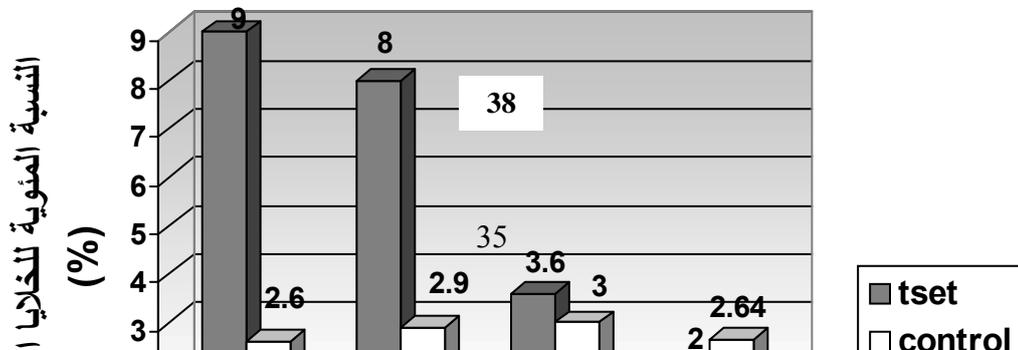
شكل (1): النسبة المئوية للمفاويات لدى مجموعات الحيوانات المخمجة والسيطرة خلال فترات المتابعة الأربع.



شكل (2): النسبة المئوية للخلايا وحيدة النوى لدى مجموعات الحيوانات المخمجة والسيطرة خلال فترات المتابعة الأربع.



شكل (3): النسبة المئوية للخلايا العدلة للمجموعات المخمجة بالمقارنة مع مجموعات السيطرة خلال فترات المتابعة الربع.



شكل (4): النسبة المئوية للخلايا الحمضة لدى مجموعات الحيوانات المخمجة و السيطرة (خلال فترات المتابعة الأربع).

#### المناقشة

عند دخول الطفيلي جسم المضيف الفقري فإن أول خطوة دفاعية يواجهها هي كريات الدم البيض وقد أظهرت نتائج العد التفريقي لكريات الدم البيض فروقا مهمة إحصائيا في النسب المئوية لهذه الكريات لدى الحيوانات المخمجة عند مقارنتها مع السيطرة، إذ لوحظ انخفاض معنوي في الكريات العدلة، ومن المعروف أن الخمج بالشمانيا الاحشائية يؤدي إلى زيادة في النسبة المئوية للمفاويات و وحيدات النوى Monocytosis & Lymphocytosis وحدوث انخفاض في النسبة المئوية للخلايا العدلة Neutropenia فضلا عن حدوث انخفاض عام في العدد الكلي لكريات الدم البيضاء [5,11] كما أن الخمج بالكالا أزار يؤدي إلى زيادة في عدد البلاعم العملاقة والمفاويات [12,13] وأوضحت دراسة سابقة أن العد التفريقي لدى مرضى الكالا ازار اظهر أن النسبة المئوية للمفاويات قد ازدادت زيادة ضئيلة أي أنها كانت مقارنة للطبيعي ولكن اختبار التورد Rosette technique اظهر أن هناك انخفاضا واضحا في عدد المفاويات التائية وزيادة في عدد المفاويات البائية وهذا ما يفسر ظاهرتان ترافقان الخمج بالكالا ازار وهما النتيجة السالبة لفرط الحساسية المتأخرة في المرحلة المتقدمة من الخمج وفرط الغلوبولينات المناعية نوع كما [14].

وفي دراسة سابقة على الأطفال المخمجين بالكالا ازار وفي مرحلة متقدمة من الخمج كانت لديهم نسبة للمفاويات مقارنة للطبيعي لكن القيمة المطلقة absolute value للخلايا التائية كانت قليلة بشكل ملحوظ فضلا عن انخفاض النسبة المئوية للخلايا العدلة وهذا الاختزال المطلق في نسبة الخلايا للمفاوية التائية والخلايا العدلة يعود إلى العزل الانتقائي لهذه الخلايا في الطحال [3] وما يعزز ذلك هو ما وجدته Greenwood وجماعته [15] إذ أشاروا إلى أن المخمجين بالملايا كانت نسبة الخلايا للمفاوية التائية طبيعية لدى أولئك الذين لم يعانون من تضخم في الطحال في حين كانت النسبة المئوية للخلايا للمفاوية التائية قليلة لدى أولئك الذين كانوا يعانون من تضخم في الطحال نتيجة الخمج.

وفي دراسة لخمسة و أربعين طفلا مخمجا بالكالا ازار وجد أن صورة الدم قد تميزت بفقر دم حاد وانخفاض عام في عدد كريات الدم البيضاء وخصوصا في الخلايا العدلة [16] وقد عزا Musumeci وجماعته [17] سبب انخفاض نسبة الكريات البيضاء إلى هجرة هذه الخلايا وفشل تكوينها في الطحال.

ومما تقدم يمكن الاستنتاج بان الخمج بالشمانيا الاحشائية قد اثر بصورة كبيرة على نقي العظم و انعكس ذلك على النسب المئوية لكريات الدم البيضاء لدى الهامستر الذهبي، محاكيا بذلك ما يحدث عند خمج البشر بالشمانيا.

- References** **المصادر**
1. Neouimine, N. I. (1996). *Leishmaniasis in the eastern Mediterranean region*, Eas. Medit. Heal. J., 2(1): 94–101.
  2. أبو الحب، جليل كريم (1979). *الحشرات الطبية و البيطرية في العراق (القسم النظري)*. مطبعة جامعة بغداد.
  3. May Ho, D. K.; Koech, D. W. I. & Bryceson, A. D. M. (1983). *Immunosuppression in Kenyan visceral leishmaniasis*. Clin. Exp. Immunol., 51: 207–214.
  4. Stauber, L. A. (1966). *Charactization of strains of Leishmania donovani*. Exp. Parasitol., 18: 1 – 11.
  5. Brown, H. W. & Neva, F., A. (1983). *Basic clinical parasitology, 5<sup>th</sup> edition*, Appleton – Century – Crofts, U. S. A., PP: 67 – 76.
  6. Pearson, R. D; Sousa, A. Q. & Jeronimo, S. M. B. (2000). *Leishmania species: Visceral (kala-azar), Cutaneous & mucoCutaneous leishmaniasis*. In: *Principles & practice of infectious diseases*. By: Mmandell, G. L. 5<sup>th</sup> edition. Churchill Livingstone, philadelphia, PP: 2831 – 2834.
  7. Evans, T. G.; Smith, D. & Pearson, R. D. (1990). *Humoral factors & non– specific immune suppression in hamsters infected with Leishmania donovani*. J. Parasitol. 76 (2): 212 – 217.
  8. El-Hashimi, W.; Al – Shanawi, F. A. & Yanzeel, J. (1997). *Observation on thermal tolerance of Leishmania donovani*. Iraq.J.Biol. Sci.,16:31–39.
  9. سعيد، إرادة عبد الجبار (1989). *دراسة تأثير اثنين من المضادات الجرثومية على الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية*. رسالة ماجستير علوم في علم الأدوية والسموم البيطرية/جامعة بغداد، كلية الطب البيطري/العراق.
  10. Dawson, R. M.; Elliott, D. C.; Elliott, W. H. & Jones, K. M. (1969). *Data for biochemical research*. Clarendon Press, Oxford, PP: 805.
  11. Herwaldt, B. L. (1999). *Leishmaniasis*, *Lancet*, 354: 1191–1199.
  12. Faust, E. C.; Beaver, P. C. & Jung, R. C. (1975). *Animal agents & vectors of human disease*, 4<sup>th</sup> edition, Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., PP: 35–45.
  13. Dennis, V. A.; Lujan, R; JR, W. L. C. & Hanson, W. L. (1986). *Leishmania donovani: cellular & humoral immune response after primary & challenge infections in squirrel monkeys, Saimiri sciureus*. Exp. Parasitol., 61: 319–334.
  14. Rezai, H. R.; Aadehali, S. M.; Amirhakimi, G. & Kharazmi, A. (1978). *Immunological features of kala-azar*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27 (6): 1079–1083.
  15. Greenwood, B.M.; Oduloju, A. J & Stratton, D. (1977). *Lymphocyte changes in acute malarie*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 70(516): 500-503.
  16. Patil, S. B. & Rodrigues, O. P., (1990). *Visceral leishmaniasis in children*. Saudi Med. J., 11 (2): 99–104.
  17. Musumeci, S.; D'agata, A.; Schiliro, G. & Fisher, A. (1976). *Studies of the neutropenia in kala-azar. Results in two patients*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 70 (516): 500–503.