تقييم الاستجابة المناعية الخلطية في الهامستر الذهبي المخمج تجريبيا باللشمانيا الاحشائية

حيدر زهير علي السامرائي*

تاريخ قبول النشر 2007/10/2

الخلاصة:

تضمنت هذه الدراسة تقييم الاستجابة المناعية الخلطية للهامستر الذهبي المخمج تجريبيا باللشمانيا الاحشائية و ذلك باعتماد فحص التلازن الدموي غير المباشر او المنفعل (Indirect or passive haemagglutination test) فضلا عن متابعة بعض معاييرتقدم الخمج في الحيوانات المخمجة من خلال متابعة التغيرات الامراضية التي يسببها الطفيلي على كبد و طحال الحيوان المخمج ، اذ تم قياس وزن الكبد و وزن و طول الطحال و حساب اعداد الطفيليات في الطحال و اعتماد اربعة اوقات للمتابعة (90،60،30،15) يوم بعد الخمج ، و بينت النتائج وجود زيادة في الاضداد لمستضدات الطفيلي خلال فترات المتابعة الاربع اذ وصلت عيارية الاجسام المضادة الى اعلى قيمة لها وهي 512 في المجموعة الرابعة (اليوم 90 بعد الخمج) ، و من خلال متابعة الخمج و مؤشراته فقد اظهرت النتائج وجود زيادة في معدل طول الطحال و وزن الطحال و الكبد منذ اليوم الاول للمتابعة (15 يوم) ووصل طول الطحال الى اعلى معدل له في المجموعة الثالثة مقارنة مح مجموعات السيطرة فضلا عن ازدياد اعداد الطفيليات في طحال الحيوانات المخمجة على مدى فترات المتابعة الاربع .

المقدمة :

داء اللشمانيات من الامراض المتوطنة في العراق لا سيما في المناطق الجنوبية (1) كما ان هناك حوالي عشرين نوعا ممرضا من جنس اللشمانيا و احد هذه الانواع هو اللشمانيا الاحشائية Leishmania donovani (2) و ان عدد الاصابات في العراق كانت 11155 و 9348 حسب تقرير منظمة الصحة العالمية لعامي 1993 و 1994 على التوالي (3) و لهذا فأن الدراسات حول هذا المرض نالت اهتماما واسعا في العراق نظرا لما يحدثه الطفيلي من تثبيط واضح في الجهاز المناعي للمضيف المخمج (4) و اغلب حالات الاصابة في العراق كانت بين الاطفال دون السبع سنوات (5) و يهاجم طفيلي اللشمانيا الاحشائية خلايا الجهاز الشبكي البطاني للانسان Reticuloendothelial system (الطحال ، نخاع العظم ، الكبد و اعضاء اخرى) (6) و يتمثل داءِ اللشمانيات الحشوي او الكالا ازار بحمى متقطعة و تضخم في الكبد و الطحال و دنف (Cachexia) مع فقر دم و ضعف و جفاف و قد يصاحب ذلك تغير في لون البشرة (7) و في بعض الحالات تعتبر زيادة نسبة الغلوبيولين / الالبومين في الدم صفة تشخيصية لهذا المرض (8) و يرتبط الخمج باللشمانيا الاحشائية الذي يصيب الانسان بتثبيط مناعي شديد للمريض (9) كما ان النشاط المتعدد النسائل للخلية البائية B-cell يمكن تمييزه و بصورة ملحوظة في خمج

اللشمانيا الاحشائية عند الانسان او الخمج التجريبي لدى الحيوان (10) و تلعب العوامل الخلطية دورا دفاعيا ضد الاشكال امامية السوط لطفيلي اللشمانيا Promastigote (11) .ومن الجدير بالذكر ان ان الخلايا المساعدة الثانية (Th2) هي المسؤولة عن الاستجابة المناعية الخلطية من خلال افرازها للمدورات اللمفاوية (IL-4, IL-5,IL-10) (12).

المواد و طرائق العمل :

استخدمت عزلة اللشمانيا الاحشائية احادية النسيلة المعزولة من قبل (Al-Bashir, 1992) و المرقمة(AA3) و الموجودة في مختبرات قسم علوم الحياة / جامعة بغداد ، و تمت تنميتها في الوسط ثنائي الطور biphasic media (13) و يسمى ايضا (NNN media) و يتألف من طورين صلب و سائل .

الحيوانات المختبرية : تم توفير 60 هامستر ذهبي *Mesocricetus auratus* من الذكور تتراوح اعمارهم بين (8 – 10) اسابيع تم الحصول عليهم من مركز الرقابة الدوائية و البايولوجية و قسمت الى اربعة مجموعات تتكون كل مجموعة من 15 حيوان، تم احداث الخمج في كل 10 حيوانات من كل مجموعة باللشمانيا الاحشائية اذ حقن كل حيوان بـ 1×10^7 طفيلي و حقنت 5 حيوانات من كل مجموعة بمحلول اللوك (13) و اعتبرت كمجموعة سيطرة و تمت عملية الحقن في التجويف الخلبي Intraperitoneal و قد تم التعامل مع المجموعة الاولى بعد اسبوعين من احداث الخمج و المجموعة الثانية بعد شهر و المجموعة الثالثة بعد

*مدرس مساعد / كلية العلوم – قسم علوم الحياة / جامعة بغداد

شهرين و المجموعة الرابعة بعد ثلاثة اشهر ، و تم اعتماد اختبار فحص التلازن الدموي غير المباشر Passive or Indirect haemagglutination test و ذلك باستخدام عدة لتشخيص الكالا ازار تم الحصول عليها من مركز الرازي للبحوث و العدد التشخيصية لغرض تقييم المناعة الخلطية و ذلك بقياس عيارية الاجسام المضادة تجاه جنس اللشمانيا الاحشائية على مدى فترات المتابعة الاربع ، و تم متابعة تقدم الخمج في الحيوانات المخمجة من خلال تشريح الحيوانات و ملاحظة التغيرات الحاصلة في وزن الكبد و وزن و طول الطحال ومقارنتها مع حيوانات السيطرة كما تم حساب اعداد الطفيليات في في طحال الحيوانت المخمجة و ذلك بعمل طبعات للطحال على شرائح زجاجية و تثبيتها باستخدام كحول مطلق (96 %) صبغت بعد ذلك بصبغة جيمزا Gimsa stain و تم حساب عدد الطفيليات تحت المجهر حسب طريقة ستاوبر (14) باستخدام القانون :

عدد اجسام اللشمانيا في الطحال = وزن الطحال (ملغم) X معدل عدد الطفيليات في خلية الطحال X معامل ستاوبر للتحويل (200000) ، اذ حسب عدد الطفيليات في 1000 خلية تم اختيارها عشوائيا .

التحليل الاحصائي : اعتمد اختبار تحليل التباين (ANOVA table) للمقارنات المتعددة بحساب الفرق المعنوي الاصغر في تحليل النتائج (15).

النتائج :

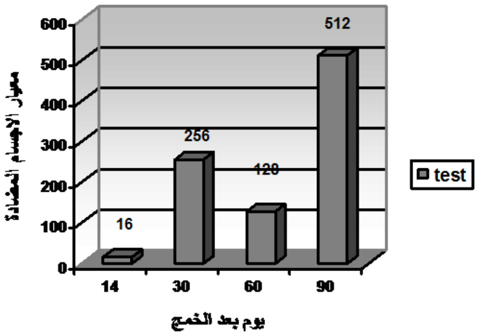
1. تم قياس معيار الاجسام المضادة للشمانيا الاحشائية اعتماداً على اختبار التلازن الدموي غير المباشر (المنفعل) وأظهرت النتائج وجود فروق معنوية (P < 0.001) ما بين مجموعات الحيوانات المخمجة وكذلك بين كل مجموعة مخمجة والسيطرة الخاصة بها وكان معيار الاجسام المضادة للمجموعات المخمجة الاربع (16، 256، 128، 512) على التوالي، شكل(1) .

2. أظهرت الصفة التشريحية وجود فروق معنوية ما بين مجموعات الحيوانات المخمجة وكذلك ما بين كل مجموعة مخمجة ومجموعة السيطرة الخاصة بها وكانت الفروق المعنوية بمستوى P < 0.01 وكانت نسبة تضخم الطحال في المجموعة الاولى (2.20 ملغم/غم) وفي المجموعة الثانية(2.45 ملغم/غم) ووصلت نسبة تضخم الطحال إلى أعلى قيمة لها في المجموعة الثالثة إذا كانت (2.88 ملغم/غم) في حين كانت نسبة تضخم الطحال في المجموعة الرابعة (2.30 ملغم/غم) في حين كانت نسبة تضخم الطحال لدى مجموعات السيطرة الأربع (1.90، 2.00، 2.04، 2.08) ملغم/غم على التوالي، شكل (2).

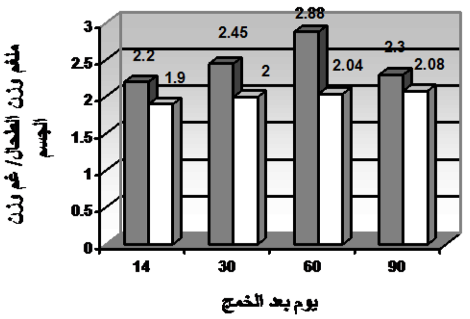
3. أما بالنسبة إلى طول الطحال فقد أظهر التحليل الاحصائي وجود زيادة معنوية في معدل الطحال ما بين المجموعات المخمجة وكذلك ما بين كل مجموعة مخمجة ومجموعة السيطرة الخاصة بها، إذ كان معدل طول الطحال في مجموعات الحيوانات المخمجة الاربع (31، 33، 34.1، 33.5) ملم على التوالي بالمقارنة مع معدل طول الطحال لدى مجموعات السيطرة الاربع اذ كان (29.5، 29.4، 29.8، 30) ملم على التوالي، شكل (3).

4. أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في معدل وزن الكبد ما بين مجموعات الحيوانات المخمجة وما بين كل مجموعة مخمجة ومجموعة السيطرة الخاصة بها وخلال فترات المتابعة الأربع ، وكانت الفروق المعنوية بمستوى P>0.001 ، اذ ان معدل وزن الكبد لدى مجموعات الحيوانات المخمجة الأربع كان (423، 457، 500، 470) ملغم على التوالي بالمقارنة مع وزن لكبد لدى مجموعات حيوانات السيطرة الأربع إذ كان (390، 400، 410، 410) ملغم على التوالي، شكل (4).

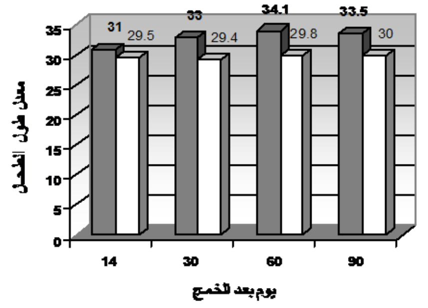
5. أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية (0.01> P) في معدل عدد الطفيليات للمجموعات الأربع، إذ كان معدل عدد الطفيليات في المجموعة المخمجة الأولى 3.2 × 106 طفيلي وفي المجموعة الثانية 1.1 × 107 طفيلي خلال أسبوعين وهي أعلى زيادة سجلت خلال فترات المتابعة، في حين وصل عدد الطفيليات في المجموعة الثالثة (بعد شهرين) إلى 1.7 × 107 طفيلي وفي المجموعة الرابعة(بعد 3 أشهر) وصل معدل عدد الطفيليات إلى 2.01 × 107 طفيلي، شكل (5).



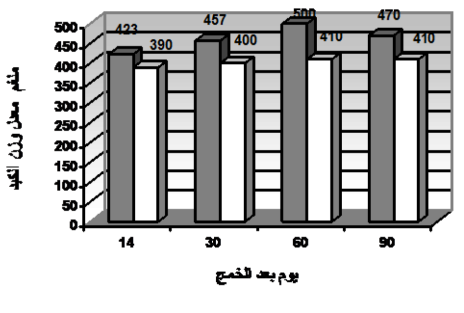
شكل (1) يوضح معيار الاجسام المضادة للشمانيا الاحشائية باختبار التراص الدموي غير المباشر لمجموعات الحيوانات المخمجة خلال فترات المتابعة الاربع.



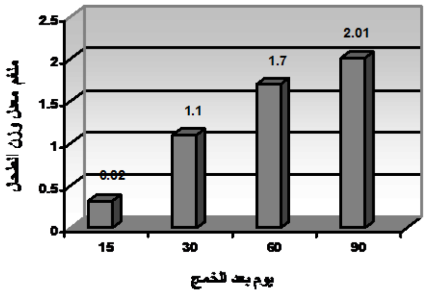
شكل (2) يبين نسبة تضخم الطحال (ملغم معدل وزن الطحال / غم معدل وزن الجسم) للحيوانات المخمجة باللشمانيا الاحشائية(الاعمدة الغامقة) والسيطرة(الاعمدة الفاتحة) خلال فترات المتابعة الاربع.



شكل (3) يبين معدل طول الطحال للحيوانات المخمجة باللشمانيا الاحشائية (الاعمدة الغامقة) والسيطرة (الاعمدة الفاتحة) خلال فترات المتابعة الاربع.



شكل (4) يبين معدل الزيادة في وزن الكبد للحيوانات المخمجة باللشمانيا الاحشائية (الاعمدة الغامقة) والسيطرة (الاعمدة الفاتحة) خلال فترات المتابعة الاربع.



شكل (5) يبين معدل اعداد طفيلي اللشمانيا الاحشائية في الطحال لدى مجموعات الحيوانات المخمجة الأربع .

المناقشة :

اظهرت هذه الدراسة ان هناك ازدياد واضح في مستوى الاجسام المضادة تجاه مستضد اللشمانيا الاحشائية لدى حيوانات الهامستر المخمجة خلال فترات المتابعة الاربع و بنسب متفاوتة ، و من الملاحظ ان اعلى معيار للاجسام المضادة كان في المجموعة الرابعة (512) يليه في المجموعة الثانية (256) ثم الجموعة الثالثة (128) و سجلت اوطأ عيارية لدى المجموعة الاولى (17) و التي تم التعامل معها بعد اسبوعين من احداث الخمج ، و في الوقت نفسه نلاحظ ايضا من معايير تقدم الخمج المعتمدة ان الخمج باللشمانيا الاحشائية اظهر تقدما واضحا في جسم الحيوان المصاب وذلك عند قراءة نتائج نسبة تضخم الطحال و طول الطحال و وزن الكبد ، فضلا عن ازدياد عدد الطفيليات في جسم الحيوان المصاب كلما تقدمنا في فترات المتابعة ، اذ ان اليات المناعة الخلطية تلعب دورا ثانويا في المناعة المكتسبة للشمانيا الاحشائية (15) و طبيعة الاستجابة المناعية لكل شخص هي التي تحدد مدى حدوث و تقدم الخمج بداء اللشمانيات (16) ، فخلال الخمج باللشمانيا الاحشائية فان نسبة الغلوبيولينات المناعية IgG , IgM تزداد مما يودي الى انعكاس نسبة الالبومين / الغلوبيولين (18) و في دراسة على الهامستر الذهبي المخمج تجريبيا باللشمانيا الاحشائية وجد بانه يعاني من ارتفاع في نسبة الاجسام المضادة للشمانيا و فرط الغلوبيولينات المناعية نوع كاما Hypergammaglubulenimea و يعود ذلك الى النشاط متعدد النسائل للخلية البائية Polyclonal activation of B cell (19) و على الرغم من هذه الزيادة في مستوى الاجسام المضادة لكن معظم هذه الاجسام المضادة غير متخصصة للطفيلي non-specific antibodies (20) و بذلك فأن هذا الارتفاع في مستوى الاجسام المضادة لا يؤدي الى انحلال الخمج في الانسان او الخمج التجريبي في

الحيوان و انما يؤثر سلبا على تفاعل الطفيلي مع البلاعم العملاقة للمضيف و يعدل استجابة المناعة المتواسطة بالخلايا ربما عن طريق اعتراض او حجب عمل المستضدات المؤثرة (21) و كما اشارت دراسات اخرى حول هذا الموضوع ان الفئران الفاقدة للخلايا اللمفاوية البائية بالتطفير الوراثي اظهرت مقاومة واضحة للشمانيا الاحشائية (22) و في دراسة ثانية اظهرت الحيوانات المخمجة باللشمانيا الاحشائية مقاومة ملحوظة للمرض بعد حقنها بـ Anti-IgM antibody و الذي يؤدي الى تقليل عمل الاضداد التي تنتجها الخلية اللمفاوية البائية (B cell) و عادت الحساسية تزداد تجاه المرض بعد نقل مزيد من الخلايا اللمفاوية البائية او المحرك اللمفاوي السابع (IL-7) الى هذه الحيوانات (10و23) و اشارت دراسات اخرى الى ان الخمول المناعي الذي تحدثه اللشمانيا الاحشائية يقتصر على المناعة الخلوية فقط و الدليل على ذلك هو امكانية الكشف عن الاضداد خلال الخمج (24) و مما يساعد على انتاج الغلوبيولينات المناعية هو وجود المحرك اللمفاوي الاول (IL-1) و الذي من المعروف انه يعمل على تنشيط الخلايا اللمفاوية البائية و انتاج الاضداد (6) كما ان النشاط متعدد النسائل للخلية اللمفاوية البائية هو ليس العامل الوحيد المسؤول عن فرط الغلوبيولينات المناعية نوع كاما في الهامستر و انما يرتبط ذلك مع عدم استجابة الخلية اللمفاوية للتحفيز بالمشطر (PHA Phytohaemagglutinin) و التثبيط الحاصل للخلية التائية المساعدة قد زاد من فعاليات الخلية البائية و نشاطها متعدد النسائل تجاه المكونات المحفزة لطفيلي اللشمانيا الاحشائية (25) .

و مما تقدم يمكن القول بان الخمج باللشمانيا الاحشائية في الهامستر الذهبي كان واضحا اذ استطاع فيه الطفيلي تاسيس الاصابة داخل جسم الحيوان و خصوصا في الاحشاء التي تمت دراستها (الكبد و الطحال) كما ان فرط التحفيز لاستجابة المناعة الخلطية لجسم المضيف كان واضحا ايضا من خلال ارتفاع مستوى الاجسام المضادة لمستضد للطفيلي لكنه لم يؤد الى القضاء على الخمج كون التحفيز الذي اصاب الخلية اللمفاوية البائية كان متعدد النسائل و ليس متخصصا لمستضد اللشمانيا الاحشائية مما لم يؤد الى انحسار المرض لدى الحيوان المصاب.

المصادر :

1. ابو الحب ، جليل كريم . (1979) . الحشرات الطبية و البيطرية في العراق (القسم النظري). مطبعة جامعة بغداد.

2. Marquardt, W.C; Demaree, R.S and Grieve, R.B. (2000). *Leishmania* and Leishmaniasis. Bull.Wld.Hlth.Org. 58: 807 – 818.

3. Neouimine, N.I (1996).Leishmaniasis in the eastern Mediterranean region, Eas. Medit. Heal. J., 2(1): 94–101.

4. May Ho, D. K.; Koech, D. W. I. & Bryceson, A. D. M. (1983). Immunosuppression in Kenyan visceral leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol., 51: 207–214.

5. السامرائي ، حيدر زهير (2001) . دراسة الاستجابة المناعية في الهامستر الذهبي المخمج تجريبيا باللشمانيا الاحشائية . دراسة ماجستير علوم في علم الطفيليات / جامعة بغداد ، كلية العلوم / العراق .

6. Pearson, R. D; Sousa, A. Q. and Jeronimo, S. M. B. (2000). *Leishmania* species: Visceral (kala-azar), Cutaneous & mucoutaneous leishmaniasis. In: Principles & practice of infectious diseases. By: Mmandell, G. L. 5th edition. Churchill Livingstone, philadelphia, PP: 2831 – 2834.

7. Ichhpujani, R.L & Bahatia, R. (1994).Medical parasitology, Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, India.

8. Asilian, A.; Khamesipour, A. & Modabber, F. (1998). Leishmaniasis. Postgrad. Doc. Med. Eas., 21 (5) : 174 – 181.

9. Havid, L.; Sorenser, A. L.; Kharazmi, A. & Theander, T. G. (1990). Functional & phenotypic changes in human lymphocytes after co- incubation with *Leishmania donovani* in vitro. Infect. Immun., 58 (10): 3163–3167.

10.H. Goto & J.A.L. Lindoso, (2004).Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Braz. J. Med. Bio. Res., 37: 615-623.

11. Kagan, I. G. & Norman, L. (1970).Manual of Clinical Microbiology. Am. Soc. Microbiol. Washington, PP: 479.

12. Mscorley, S.; Proudfoot, L; O'donnell, C. A. & Liew, F. Y. (1996).

Terr, A. I. & Parslow, T. G., 8th edition, Lange Medical publishing, U.S.A., PP: 666 – 679.

21. Pearson**,** R. D.; Cox, G.; Jeronimo, S. M. B; Castracane, J.; Drew, J. S.; Evans, T. & Aledcare, J. E. (1992). Visceral leishmaniasis: a model for infection–induced cachexia. Am. J. Trop. Med. Hyg., 47 (1): 8- 15.

22. Smelt**,** S. C.; Cotterell, S. E. J.; Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. (2000). B cell – deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil–mediated tissue pathology. J. Immunol., 164: 3681 – 3688.

23. Hoerauf A, Solbach W, Rollinghoff M. & Gessner A (1995). Effect Of IL-7 treatment on *Leishmania major* infected BALB.Xid mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cell & clinical aggravation of disease. *Inte*r. *immuno*l, 7: 1879-1884.

24. Mauel**,** J. & Behin, R. (1987). Immunity: clinical & experimental. In: The Lishmaniasis In Biology & Medicine, By: Peters, W. & Killick–Kendrick, R., Academic Press, London. , PP: 731 – 791.

25. Sacks**,** D. L.; Lal, S. L.; Shrivastava, S. N.; Blackwell, J. & Neva, F. A. (1987).An analysis of T cell responsiveness in Indian Kala – azar. J. Immunol., 138 (3): 908 – 913.

Immunology of Murine Leishmaniasis, Clin. Dermatol,14: 451 – 464.

13. Dawson, R. M.; Elliott, D. C.; Elliott, W. H. & Jones, K. M. (1969).Data for biochemical research. Clareden Press, Oxford, PP: 805.

14. Stauber**,** L. A. (1958).Host resistance to the Khartoum strains of *Leishmania donovani*. Rice. Inst. Pamph, 45: 80 – 96.

15. الغرابي ، سليم اسماعيل و سيفي ، علي محمد صادق. (1985) . مبادئ الاحصاء.مطبعة جامعة بغداد.

16.MC dw Almeida, V Vilhena, A Barral, M Barral- Netto (2003). Mem Inst Oswaldo Cruz, rio de janerio, vol. 98(7): 861 – 870.

17. 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.

18. 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.

19. Campos – Neto, A. & Bunn – Moreno, M. (1982). Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania.* Infect. Immun., 38 (3): 871 – 876.

20. Mckerrow**,** J. & Hymman, D. (1994).Parasitic disease. In: Basic & Clinical Immunology, by: Stites, D. P.;

Evaluation of humoral immunity in Golden Hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*

Hayder Zuhair Al-Samra'ay*

*Dept. of Biology, College of science, University of Baghdad

Abstract:

This study has evaluated the humoral immune response in Golden Hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani* along (4) times of follow up (15, 30, 60, 90) days after infection. Indirect haemagglutination test was used to determine the antibody titer through the various stages of the study. Also the progress of the infection was studied depending on some of the visceral changes caused by the parasite, like weight of liver, length & weight of spleen & the count of *Leishmania* parasites in spleen were measured. Results has shown that there was an increase in antibody titer & the maximum value was recorded at the 4^{th} day of follow up (90 days after infection) as well as that there was an increase in the length of the spleen, weight of liver & spleen comparing with the control animals, also the count of the parasites in the spleen was increasing gradually through the 4 times of follow up.