مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الثالث والعشرون - المجلد الأول - علوم الحياة - آذار 2024 م
doi.org/10.52866/esj.2023.01.23.11

قياس تركيز عامل نخر الورم وعلاقته بالاصابة بطفيلي اللشمانيا الجلدية

نـور طلال علي[1*] ، انتصار غانم عبدالوهاب[1] ، هديل عبد الهادي عمير[2]
جامعة تكريت - كلية التربية للبنات[1]، كلية العلوم[2]
qi.ude.ut.ts@481ila.roon : liame *[1]

مستخلص

أجريت الدراسة الحالية في مدينه تكريت وللفترة من1-2-2022 الى 1-4-2023 وذلك لقياس تركيز عامل نخر الورم TNF نتيجة الإصابة بداء اللشمانيا الجلدية ، اذ تم فحص 60 حالة إصابة سريرية باللشمانيا الجلدية من المراجعين إلى مستشفى صلاح الدين العام. وبينت الدراسة ان المناطق الريفية هم اكثر اصابة باللشمانيا الجلدية وبالتالي ارتفاع في مستوى TNF حيث كان مستواه (a 436.7 ± 54.4 بيكو غرام / مل) بينما كانت المدينة هم اقل إصابة بالحبة لذا فيكون لديهم عامل نخر الورم اقل بالمقارنة مع مجموعة السيطرة حيث كان مستواه (b 351.0 ± 55.9 بيكو غرام / مل) حيث كان المصابين الذين يحملون (7-10) حبات هم اكثر ارتفاعا في مستوى عامل نخر الورم (TNF- α) حيث بلغ مستواه (460.0 ± 48.6 بيكو غرام / مل) بينما كان المصابين الذين لديهم (1-3) حبة هم اقل مستوى لعامل نخر الورم ، كما سجل عامل نخر الورم اعلى مستوى (a 459.0 ± 38.50 بيكو غرام / مل) عندما تكون الحبة في منطقة اليد بينما كان مستواه اقل عندما تكون الحبة في منطقة القدم حيث بلغ مستواه (e 28.53 ± 205.2 بيكو غرام / مل).

الكلمات المفتاحية: عامل نخر الورم – الفا، تعدد اشكال النيوكليوتيدة المفردة، داء اللشمانيا، تقنية – Tetra arms .

Measuring the concentration of tumor necrosis factor and its relationship to cutaneous leishmaniasis infection.

Noor Talal Ali [1*] , Intisar Ghanim Abdulwahhab [1] , Hadeel Abdel Hadi Omear [2]
Tikrit University -College of Education for women[1] , College of Sciences[2]
email : noor.ali184@st.tu.edu.iq[1*]

Abstract:

The current study was conducted in the city of Tikrit for the period from 2/1/2022 to 4/1/2023 in order to measure the concentration of tumor necrosis factor (TNF) as a result of cutaneous leishmaniasis ، were examined at Salahuddin General Hospital. the study revealed that rural areas had a higher incidence of cutaneous leishmaniasis, leading to an elevated level of TNF with a concentration of (436.7 a ±54.4 picograms/mL). In contrast, urban areas showed lower infection rates, resulting in a lower tumor necrosis factor level compared to the control group, with a concentration of (351.0 b ±55.9 picograms/mL). Where the affected individuals carrying (10-7) granules have a higher level of tumor necrosis factor TNF-α, reaching a level of (460.0 ± 48.6 picograms/mL). Meanwhile, those with (3-1) granules have a lower level of tumor necrosis factor, and the highest level recorded was 459.0 ± 38.50 picograms/mL when the granule is in the hand area. However, the level is lower when the granule is in the foot area, reaching (205.2 ± 28.53 picograms/mL).

Key words : TNF- α ،SNP ،Leishmnisis ،Tetra –arms.

المقدمة

تعد داء اللشمانيا الجلدية Cutaneous leishmani-asis احد الإمراض الطفيلية الناتجة عن حيوان ابتدائي Protozoa ينتمي الى السوطيات الدموية Haemofla-gellate من الجنس *Leishmania* التي تتطفل إجباريا داخل خلايا الجهاز البطاني الشبكي Reticuloendo-thelial system للجلد، وخلايا البلاعم الكبيرة Mac-rophage هي الخلايا المضيفة لطفيلي اللشمانيا الجلدية (Ghosh, 2018). يعد داء اللشمانيا leishmaniasis من الأمراض الطفيلية الواسعة الانتشار والمتوطنة في أكثر من 92 بلداً، بما فيها لعراق وإيران والبرازيل وأفغانستان وسوريا والهند وبنغلاديش والسودان، وتسجل أكثر من مليون حالة أصابه بداء اللشمانيا (WHO 2020,).

ويمر طفيلي اللشمانيا *Leishmania* بدورة حياة غير مباشرة، إذ يكتمل دورة حياتها بطورين ، يسمى الطور الاول بالطور عديم السوط Amastigote الذي يتطفل داخل خلايا البلاعم الكبيرة للمضيف الفقري المتمثل بالإنسان والثدييات) القوارض، العائلة الكلبية، القطط(أ اما الطور الثاني فيتمثل بالطور أمامي السوط promastigote الذي يوجد في المضيف اللافقري المتمثل بالحشرة الناقلة انثى ذبابة الرمل Sand fly من جنس (Jamal *et al.*, 2020; Desjeux, *Phlebotomus*. 2004 .).

يتم انتاج الـ α- TNF. بواسطة مجموعة من الخلايا، والتي تشكللا الخلايا القاتلة NK ، والخلايا الباية والخلايا التائبة والخلايا البدينة والخلايا الليفية والبلاعم ، حيث يرتبط α– TNF بمستقبلين TNFR1 و TNFR2 ، يتم التوسط في التأثيرات المؤيدة للالتهابات من خلال تفاعلها مع TNFR1 عند التعامل، ينشر تفاعل مستقبلات α-TNF الالتهاب بعدة طرق اعتمادًا على نوع خلية المستجيب التي تستقبل الرسالة (Lewis *et al.*, 2019).

بينت الدراسات التي أجريت على البشر عن وجود علاقة بين عدوى الليشمانيا وTNFα. وقد وجد ان التعبير عن زيادة α- TNF عند الإصابة في الآفات الجلدية والمخاطية وكانت مستويات α-TNF مرتفعة في الأمصال المرضى أثناء المرض النشط (Nateghi et al.,2016)، تمت الأشارة الى دور السيتوكينات α-TNF المسببة للالتهابات من خلال عدة طرق مستقلة في داء الليشمانيات الجلدي، حيث أدى العلاج بـ α-TNF إلى تقليل حجم الآفة والطفيليات المحمولة (Liew *et al.*, 1990).

المواد وطرق العمل

تم سحب (5) مل من الدم الوريدي باستعمال محقنة طبية معقمة وضعت (2) مل من الدم في انابيب اختبار حاوية على مادة مانعة للتخثر ethyl- EDTA (ene diamin tetraacetic acid) لغرض قياس المعايي ر الدموية اما الـ (3) مل وضعت في انابيب اختبار خالية من المادة المانعة للتخثر لغرض الحصول على المصل se-rum بجهاز الطرد المركزي centrifuge بسرعة 3000 دورة / 15دقيقة بعد ذلك سحب المصل بواسطة ماصة دقيقة micropipette ، وقد تم تقسيم المصل في انابيب ابندروف Eppendrof tube بحجم 1.5 مل لكل انبوبة، وتم حفظ العينات مجمدة بدرجة (20–) لحين اجراء الاختبارات المناعية والجزيئية . تم اجراء الفحوصات في المختبرات المركزية / جامعة تكريت.

طريقة قياس تركيز عامل نخر الورم (α -TNF).

لغرض قياس تركيز عامل نخر الورم (α -TNF) بتقنية Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) استخدمت العدة المجهزة (كت) من شركة sunlong .

طريقة الكشف عن تعدد اشكال الجين TNF-α للموقع (G- 308) باستخدام تقنيه Tetra _ ARMS PCR .

صممت البادئات الاربعة خاصة لهذه الدراسة لغرض الكشف عن تعدد اشكال الجينعامل نخر الورم ((TNF-α في الموقع G- 308)) مجهزه من شركة (Mac-rogene) الكورية.

النتائج والمناقشة :

معدل TNF- α لدى الاشخاص المصابين بداء اللشمانيا حسب السكن مقارنة بالسيطرة .

أوضحت نتائج الدِّراسة الحالية بأن المناطق الريفية هم اكثر اصابة باللشمانيا الجلدية وبالتالي ارتفاع في مستوى TNF حيث كان مستواه (436.7 54.4± a بيكو غرام / مل) بينما كانت المدينة هم اقل إصابة بالحبة لذا فيكون لديهم عامل نخر الورم اقل بالمقارنة مع مجموعة السيطرة حيث كان مستواه (351.0 55.9± b بيكو غرام / مل)، اتفقت الدراسة الحالية مع بعض الدراسات) ; AL-Atabi, 2014; Al-Difaie, 2013 ; Qader *et al.*, Khudhur, 2018 ; Al-) 2009 ; Akkafa *et al.*, 2008 ;Jashamy, 2018 ; Al-Hassani, 2016 . الذين اشارو بان المرض اكثر شيوعا في المناطق الريفية في العراق.

كما اتفقت الدراسة مع نتائج دراسة (الحساني، 2020) الذي سجل ارتفاعاً في معدل عامل نخر الورم TNF-α لدى الاشخاص المخمجين بداء اللشمانيا الجلدية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة ، حيث بلغ معدله في المرضى المخمجين 0.103 ±0.201 بيكوغرام / مل مقارنةَ بالسيطرة 0.026±0.031 بيكو غرام / مل .

ويعزى سبب ارتفاع نخر الورم في المخمجين باللشمانيا في المناطق الريفية الى وجود الناقل الرئيسي للإصابة (ذبابة الرمل) في المناطق الريفية المكتظة؛ وذلك لتوفر الظروف الملائمة للمعيشة والتكاثر للطفيلي، لذا تكون المناطق الريفيَّة موبوءة أكثر من المناطق الحضرية، ولان المضيف الناقل البالغ لا يستطيع الطيران لمسافات بعيدة لعدة امتار ؛ لذا يستبعد وجوده بعيدا عن موطن معيشته في الأرياف، (Al-Samarai & Al-Obaidi,2009) فضلاً عن كثرة وجود المضائف الخازنة (القوارض والكلاب) في المناطق الريفيَّة والأقضية، وعدم مكافحتها بصورة مستمرة؛ ويمكن القول ان المناطق الريفية من المناطق المناسبة لنمو الحشرة وتكاثرها بسبب كثرة المزارع والمسطحات المائية وحضائر الحيوانات .

جدول (1) معدل TNF- α لدى الاشخاص المصابين بداء اللشمانيا حسب السكن مقارنة بالسيطرة.

السكن	مصابين (Mean±SD) Pg / ml	غير مصابين (Mean±SD) Pg / ml
ريف	54.4 ± 436.7 a	38.1 ± 231.8 d
مدينة	55.9 ± 351.0 b	22.7 ± 295.9 c
p-value	ذ *0.048	

معدل TNF- α لدى الاشخاص المصابين بداء اللشمانيا حسب عدد الحبات مقارنة بالسيطرة.

أظهرت النتايج ان عدد القرح التي يحملها المصابين بداء اللشمانيا الجلدية تتراوح من حبة واحدة الى عشر حبات ، وكان المصابين الذين يحملون عدد قرح (7–10) هم اكثر ارتفاعا في مستوى عامل نخر الورم (TNF- α) حيث بلغ مستواه (460.0 48.6± بيكو غرام / مل) بينما كان المصابين بالحبة الذين لديهم عدد قرح (1–3) هم اقل مستوى لعامل نخر الورم وبفارق معنوي إحصائي عند مستوى احتمال $p< 0.05$ كما مبين بالجدول (10–4). اتفقت دراستنا مع AL-Saady (2014) عند تسجيله وجود 43 حالة مع قرح متعددة مقارنة مع 41 حالة لقرحة مفردة.

واتفقت دراستنا أيضا مع (Neetu *et al* ., 2018) الذي اوضح بان اللشمانيا قادرة على إصابة الخلايا الوحيدة والتي لها القدرة على انتاج IL-6 وارتفاع TNF- α على الرغم من انخفاض مستواها في الدم وهذا يؤكد على انتاج السايتوكينات الالتهابية. ربما يعود السبب الى انه كلما كان عدد القرح اكثر كلما زاد ارتفاع مضادات الالتهاب (السايتوكاينات) وذلك للقضاء على الالتهاب بشكل اسرع لانه هناك بعض الحبات تشفى ذاتياً.

جدول (2) معدل TNF- α لدى الاشخاص المصابين بداء اللشمانيا مقارنة بالسيطرة حسب عدد الحبة.

عدد الحبات	TNF (Mean±SD) Pg / ml
3-1	258.3c ± 30.7
6-4	390.4b ± 52.1
10-7	48.6 ± 460.0
p-value	*0.036

معدل TNF- α لدى الاشخاص المصابين بداء اللشمانيا حسب موقعها في الجسم .

شملت الدراسة الحالية على توزيع الخمج في مواقع مختلفة من الجسم ولوحظ وجود فروق معنوية على مستوى احتمالية $p< 0.05$ حيث تم قياس مستوى عامل نخر الورم في مصل المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية حسب موقع الحبة في الجسم ، اذ سجل عامل نخر الورم في اعلى مستوى (a 459.0 ± 38.50) بيكو غرام / مل) عندما تكون الحبة في منطقة اليد بينما كان مستواه اقل عندما تكون الحبة في منطقة القدم حيث بلغ مستواه (28.53 ± 205.2 e بيكو غرام / مل) كما مبين في جدول (3)، اتفقت النتائج مع (علي ، 2020) حيث بلغت 12.06±46.53 بيكو غرام / مل للمصابين باللشمانيا الجلدية مقارنة مع مجموعة السيطرة 4.86±23.0 بيكو غرام / مل .

وكذلك اتفقت الدراسة مع (Macpi *et al* ., 2016) ان الإصابة بداء اللشمانيا الجلدية يؤدي الى زيادة انتاج TNF- α الذي يزداد انتاجها من قبل الخلايا الضامة للتخلص من الطفيلي حيث يقوم بإنتاج أوكسيد النتريك NO الذي يساعدها في إزالة اللشمانيا ، ولعامل نخر الورم دور في تعزيز الاستجابة INF – γ و Th1 وخصوصا عند L. major.

ومن الممكن تفسير ارتفاع عامل نخر الورم عند الإصابة بمنطقة اليد الى ان اليد تكون اكثر منطقة مكشوفة عن باقي الجسم وبالتالي تكون اكثر عرضة للسع بواسطة ذبابة الرمل ليلاً عندما تصبح الحشرات اكثر نشاطاً مسببه احمرار وتورم في المنطقة.

جدول (3) معدل TNF- α لدى الاشخاص المصابين بداء اللشمانيا حسب موقعها في الجسم .

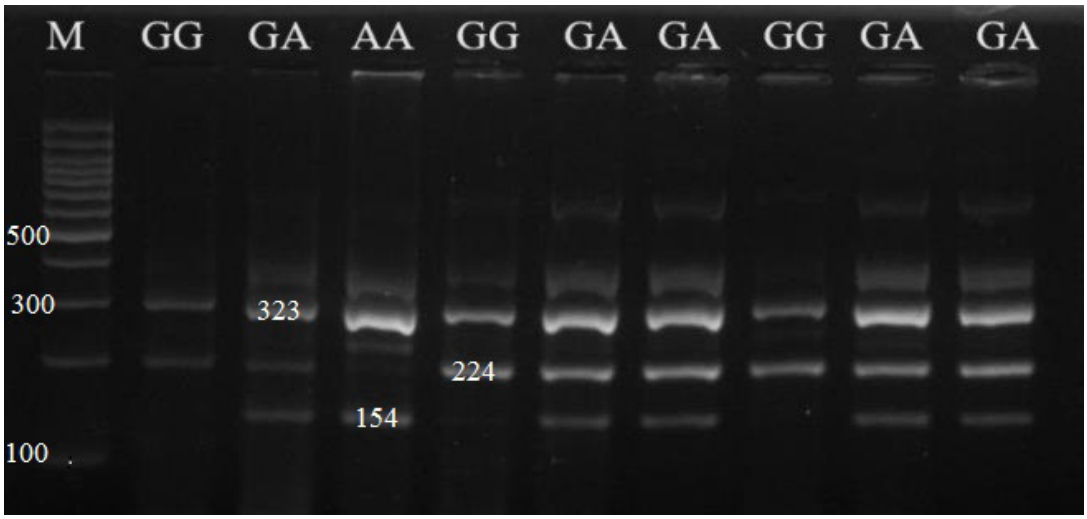
	TNF					
موقع الحبة	الوجه	اليد	الاذن	ساق	قدم	في أماكن متعددة
(Mean±SD) Pg / ml	c 355.8 ±31.69	a 459.0 38.50 ±	d 271.2 21.99 ±	e 223.4 36.50 ±	e 205.2 28.53 ±	b 412.0 ±38.30
p-value	*0.038					

الاستنتاج :

ارتفاع عامل نخر الورم في المناطق الريفية المصابة باللشمانيا اكثر من المناطق الحضرية وكذلك يرتفع عامل نخر الورم كلما كانت عدد الحبات كثيرة في الأشخاص المصابين باللشمانيا وكذلك يرتفع عندما تكون الحبة في المناطق المكشوفة من الجسم (اليد).

تحديد تعدد اشكال الجين (TNF- α موقع G- 308)

تم الكشف عن تعدد أشكال جين الـ ـ TNF- α باستخدام تقنية Tetra ARMS-PCR اذ تم ترحيل ناتج تفاعل PCR على هلام الاكاروز بتركيز 2 ٪ فظهرت ثلاث طرز وراثية فالطراز الوراثي المتماثل الطبيعي (GG) الذي يتمثل بالحزمة (224bp) والطراز الوراثي الثاني الغير متماثل (GA) الذي يتمثل بالحزمة (323 bp) والطراز الوراثي الثالث المتماثل الطافر (AA) الذي يتمثل الذي يتمثل بالحزمة (154 bp). وكما موضح في الشكل (1).



شكل (1) نتائج الترحيل الكهربائي لتقنية TARMS – PCR على هلام الاكاروز بتركيز ٪2 للكشف عن الجين (TNF- α) للموقع (308 -G)، حيث يبين الطراز الوراثي المتماثل (GG) يتمثل بالحزمة (224 bp) والطراز الوراثي غير المتماثل (GA) يتمثل بالحزم (323 bp) والطراز الوراثي الطافر المتماثل ((AA يتمثل بالحزمة) 154 bp) مع الدليل الحجمي 100 Marke bp.

Qadisya.

- **Al-Jashamy,H.(2018).**Serological and Immunological Diagnosis of visceral Leishmaniasis among patients with cutaneous leishmaniasis in Baghdad city, Msc. Thesis. collage of Medicine. university of Tikrit.
- **AL-Saady, Q. (2014).** Measurement Cytokines IL-4, IL-17A, IP-10 and MIP–1αof Immune Response in Patients of Cutaneous leishmaniasis, MSc. Thesis submitted to Education for Pure science, University of Diyala.
- **Al-Samarai, A. M. and AlObaidi, H. S. (2009).** Cutaneous leishmaniasis in Iraq. J. *Infect. Dev. Ctries.* **13(2):** 123- 129.
- **Desjeux, P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 27(5):305-318 .
- **Ghosh, S. (ed.), (2018).** Paniker's textbook of medical parasitology. Jaypee, The Health Sciences Publisher, New Delhi: 256pp.
- **Jamal, Q.; Shah, A.; Rasheed, S. B.; Adnan, M. (2020).** In vitro assessment and characterization of the growth and life cycle of *Leishmania tropica*. Pakistan Journal of Zoology, 52(2): 447-455
- **Khudhur, H. R. (2018).** Determination of the Gene Polymorphism of MIF and NRAMP1 Gene and their effect On TNF alpha, MIF and IL-1beta Level among Patient of Cutaneous Leishmaniasis, PhD. thesis. College of Medicine,University of Al-Qadisiya.

Reference

- **الحســـاني، محمد كامل كريم** (2020) . دراسة مستويات بعض العناصر النزرة لمصل الدم وعلاقتها مع بعض انزيمات مضادات الاكسدة والعوامل المناعية لدى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية والجرذان البيض . أطروحة دكتوراه ، كلية التربية / جامعة القادسية.
- **علي، هدى مولود طاهر**. (2020). دراسة وبائية مناعية وجزيئية لطفيلي اللشمانيا الجلدية في محافظة كركوك. أطروحة دكتوراه . كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة تكريت.
- **Akkafa, F.; Dilmec, F. and Alpua, Z. (2008).** Identification of *Leishmania* parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region, Sanliurfa province, in Turkey. Parasitology research, 103(3): 583.
- **AL-Atabi, B.A. (2014).** Epidemiological and Molecular Study of Cutaneous Leishmaniasis Using RT-PCR in Wasit province – Iraq Msc. Thesis. College of Science, University of Wasit.
- **Al-Difaie, R. S. (2013).** Prevalence of Cutaneous Leishmaniasis in AL-Qadissia province and the evaluation of treatment response by pentostam with RTPCR., M.Sc. Thesis, AL-Qadisiya Univirsty.
- **Al-Hassani, M. K. (2016).** Epidemiological Molecular and Morphological Identification of cutaneous leishmaniasis and, It's insect vectors in Eastern Al-Hamzah district, Al-Qadisiya province, Msc. Thesis. collage of science. University of Al-

- **Lewis, S. M., Williams, A., & Eisenbarth, S. C. (2019).** Structure and function of the immune system in the spleen. Science immunology,4(33).
- **Liew FY, Li Y, Millott S (1990)** . Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. J Immunol 145:4306–4310.
- **Maspi, N.; Ghaffarifar, F.; Sharifi, Z., & Dalimi, A. (2016).** Codelivery 112 of DNA vaccination encoding Le IF gene and IL-12 increases protection against Leishmania major infection in BALB/c mice. Parasite immunol, 38(4): 228-235.
- **Nateghi Rostami M, Seyyedan Jasbi E, Khamesipour A, Mohammadi AM2016)).** Tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) and its soluble receptor type 1 (sTNFR I) in human active and healed leishmaniases. Parasite Immunol 60–255:(4)38.. doi:10.1111/pim.12305.
- **Neetu , S . ; Rajiv , K . Shashi , B . (2018)** . Peripheral Blood Monocytes with Anti inflammatory phenotype Display limited phagocytosis and oxidative Burst inpatients with visceral leishmaniasis , Oct 1 ; 218 (7) : 1130 -1141 .
- **Qader, A. M. ; Abood, M. K. and Bakir, T. Y. (2009).** Identification of Leishmania parasites in clinical samples obtained from Cutaneous Leishmaniasis patients using PCR technique in *Iraq. Iraqi Journal of Science*. 50(1): 32-36.
- **WHO. (2020).** "Leishmaniasis and *Leishmania*/ HIV Co- infection." Fact Sheet No. 116.