وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

دراسة التغايرات النسجية والمناعية لمرضى اللشمانيا الجلدية في محافظة ديالى

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة–جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في

علوم الحياة/علم الحيوان (علم الطفيليات)

من قبل

منى حميد أحمد العزاوي

بكالوريوس علوم/ جامعة ديالى2010

بأشراف

أ. م. د. أسراء قاسم العبيدي

أستاذ مساعد كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة بغداد

جمادي الأولى 1436هـ

آذار 2015م

المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
	الفصل الأول Chapter One	
1-1	المقدمة Introduction	1
	الفصل الثاني Chapter Two	
2	استعراض المراجع Literature review	6
1-2	جنس اللشمانيا *Leishmania*	6
2-2	تصنيف جنس اللشمانيا Classifaction of *Leishmania*	7
3 -2	المظهر الخارجي للشمانيا Morphology of *Leishmania*	8
4-2	دورة حياة طفيلي اللشمانيا Life cycle of *Leishmania*parasite	9
5 -2	الأشكال السريرية Clinical Features	11
1 - 5 -2	داء اللشمانيا الأحشائي Visceral Leishmaniasis	11
2 - 5 -2	داء اللشمانيا الجلدي Cutaneous Leishmaniasis	11
1 -2 -5 - 2	داء اللشمانيا الجلدي حيواني المصدر (الريفي) Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis(ZCL) Rural	12
2-2 -5 -2	داء اللشمانيا الجلدي بشري المصدر (المدني) Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis(ACL) Urbon	12
3-2-5-2	داء اللشمانيا الجلدي المحلي Localized CutaneousLeishmaniasis(LCL)	13
4-5-2- 2	داء اللشمانيا الجلدي المنتشر DiffusedCutaneousLeishmaniasis(DCL)	13
5-2-5-2	داء اللشمانياالرسيديفانز RecidivansCutaneous Leishmaniasis(RCL)	13
6 -2 -5-2	- داء اللشمانيا الجلدي مابعد الكالآزار PostKala-azar dermal Leishmaniasis(PKDL)	14
3-5 -2	داء اللشمانيا الجلدي – المخاطي MucocutaneousLeishmaniasis(MCL)	14
6-2	طرائق الإنتقال Methods of Transmission	15

15	المضائف الخازنة The Reservoir hosts	7-2
16	وبائية داء اللشمانيا الجلدي Epidemiology of cutaneous leishmaniasis	8-2
18	إمراضية اللشمانيا الجلدية Pathogenicity of cutaneous leishmaniasis	9-2
20	الجلد الطبيعي Natural skin	10-2
22	ميكانيكية دخول طفيلي اللشمانيا الى الخلايا البلعمية ومباغته للجهاز المناعي	11 -2
23	الأستجابة المناعية ضد اللشمانيا الجلدية Immune Response Against CutaneousLeishmaniasis	12-2
25	الحركيات الخلوية Cytokines	1-12-2
26	الانترفيرون كاما (IFN-γ)Interferon-gamma	1-1-12-2
27	عامل التنخر الورمي ألفا Tumour Necrosis Factor alpha(TNF-α)	2-1-12-2
28	الحركي الخلوي (IL-12) Interleukin-12	3-1-12-2
29	الحركي الخلوي (IL-17A)Interleukin-17A	4-1-12-2
30	البروتين الكيميائي الجاذب للخلية الوحيدة Monocyte Chemotactic Protein -1(MCP-1)	5-1-12-2
31	طرائق التشخيص Methods of Diagnosis	13-2
31	التشخيص السريري Clinical Diagnosis	1-13-2
32	الفحص المجهري المباشر The direct microscopic examination	2-13-2
32	طريقة الزرع Culture method	3-13-2
33	الطرائق المناعية Immunological Methods	4-13-2
33	الإختبار الجلدي Skin test	1- 4 -13 -2
33	إختبار التلازن المباشر(DAT) Direct Agglutination Test	2 -4-13-2
34	إختبار التلازن الزجاجي(LAT)Latex Agglutination Test	3 -4-13 -2
34	إختبار الضد المتألق المناعي Immunoflorescent Assay Test(IFAT)	4-4-13 -2

2-13-4-5	أختبار الامتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)	34
2-14	تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)	35
2 – 15	العلاج Treatment	35
	الفصل الثالث Chapter Three	
3	المواد وطرائق العمل Material and methods	38
3-1	الأجهزة والمواد والعدد المختبرية المستخدمة Laboratory using kit and materials	38
3-1-1	الاجهزة المستخدمة Instruments	38
3-1-2	المستلزمات المختبرية الطبية المستخدمة Laboratory medical materials	39
3-1- 3	المواد الكيميائية المستخدمة Chemical materials	40
3-1-3	العِدد المختبرية Laboratory Kits	41
3-2	موقع الدراسة Study place	42
3-3	جمع المعلومات The data collection	42
3-4	جمع العينات Samples Collection	42
3-4- 1	جمع عينات الدم Collection of blood samples	43
3-5	الفحوصات السريرية Clinical tests	43
3-6	الفحوصات المختبريةLaboratory tests	43
3-6-1	طريقة الطبعات Impression Method	43
3-6- 2	الزرع Culture	44
3-6-2-1	الوسط الزرعي الهلامي (شبه صلب) Semi Solid Medium	44
3-6-2-2	طريقة الزرع Culture Method	46
3-6-3	الدراسة النسجيةHistological study	47
3-6-3-1	المحاليل والصبغات المستخدمة Solutions and Stains	48

7-3	قياس مستويات الحركيات الخلوية والتي شملت كل من INF-γ,TNF-α, IL-12, IL-17A و MCP-1 في المصل	51
3- 7- 1	محتويات العدة Kit Contents	51
3-7-2	مبدأ الإختبار Principle of test	52
3-7-3	طريقة العمل Method	52
3-8	التحليل الاحصائي Statistical analysis	57
	الفصل الرابع Chapter four	
4	النتائج Results	58
4-1	تحديد نسبة الإصابة باللشمانيا الجلدية وعلاقتها بالبيانات الوصفية	58
4-2	نتائج طرائق تشخيص اللشمانيا الجلدية والمقارنة بين كفاءتها	64
4-2-1	نتائج طريقة التشخيص السريري Results of clinical diagnosis	64
4-2-2	نتائج عزل طفيلي اللشمانيا الجلدية Results of isolation parasite	64
4-2-3	نتائج المسحات Results of smears	65
4-2-4	نتائج التشخيص النسجي Results of histological diagnosis	66
4-2-5	نتائج دراسة التأثيرات المرضية النسجية Results of histological study	67
4-2-6	نتائج الحركيات الخلوية INF-γ , TNF-α, IL-12, IL-17A و MCP- Results of cytokines	75
	الفصل الخامس Chapter Five	
5	المناقشة Discussion	91
	الإستنتاجات Conclusions	104
	التوصيات Recommendations	105
	المصادر العربية Arabic refernces	106
	المصادر الاجنبية English refernces	108
	الملاحق Appendixes	
ملحق رقم 1	استمارة معلومات Information table	A

قائمة الجداول

رقم الجدول	أسم الجدول	الصفحة
1-3	الأجهزة المستخدمة والشركات والدول المنتجة لها	38
2-3	المستلزمات المختبرية الطبية والشركات والدول المنتجة لها	39
3-3	المواد الكيميائية والشركات والدول المنتجة لها	40
4-3	العُدد المختبرية والشركات والدول المنتجة لها	41
1-4	أعداد الذكور والإناث المصابين وغير المصابين (السيطرة) للعينةالمدروسة والنسب المئوية.	58
2-4	توزيع أعداد الإصابة ونسبها بمرض اللشمانيا الجلدية وفقاً للعمر	59
3-4	توزيع أعداد الإصابة ونسبها وفقاً لعدد القرح للمرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية.	60
4-4	توزيع أعداد الإصابة ونسبهابااللشمانيا الجلدية وفقاً لموقع الإصابة من جسم المصاب.	61
5-4	يوضح أعداد الإصابة ونسبهابااللشمانيا الجلدية وفقاً للمهنة.	63
6-4	يوضح أعداد الإصابة ونسبهابااللشمانيا الجلدية وفقاً لقطر القرحة مقاساً بالسنتمتر(سم).	63
7-4	نتائج مقارنة طرائق التشخيص المختلفة لدى اللشمانيا الجلدية في عينة الدراسة.	66
8-4	تراكيز IFN- γ مقدرة بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة.	75
9-4	أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـINF-γ.	77
10-4	تراكيز TNF-α مقدرة بالبيكوغرام في المجاميع المدروسة.	79
11-4	أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لل TNF-α.	80
12-4	تركيز IL-12 بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة	82
13-4	أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـIL-12.	83
14-4	تركيز IL-17A بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة.	85
15-4	أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـIL-17A.	86

16-4	تركيز MCP-1 بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة	88
17-4	أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين للـMCP-1.	89

قائمة الأشكال

رقم الشكل	أسم الشكل	الصفحة
1-2	دورة حياة طفيلي اللشمانيا الجلدية	10
2-2	طبقات الجلد البشري الطبيعي	21
1-3	أخذ الدم الموضعي من حافة القرحة الجلدية	47
2-3	المنحني القياسي للإنترفيرونكاماγ-INF	54
3-3	المنحني القياسي لعامل التنخر الورمي TNF-α	55
4-3	المنحني القياسي للأنترليوكينIL-12	55
5-3	المنحني القياسي للأنترليوكينIL-17A	56
6-3	المنحني القياسي لجاذب الكيميائي MCP-1	56
1-4	قرحة جلدية جافة في الذراع الأيسر	62
2-4	قرح جلدية متعددة رطبة في الوجه	62
3-4	الطور أمامي السوط Promastigote لطفيلي اللشمانيا	65
4-4	الطور اللاسوطيAmastigoteلطفيلي اللشمانيا داخل الخلية البلعمية	65
5-4	طبقات الجلد الطبيعية غير المصابة	67
6-4	التأثيرات المرضية النسجية في البشرة Epidermis وتشمل فرط التقرن الجلدي Hyperkeratosis.	68
7-4	أرتشاح الخلايا الإلتهابية وفرط تكوين الأورام الخلايا الطلائية الكاذبة Pseudoepitheliomatous hyperplasia وزيادة الخلايا الصبغية Melanocyte.	68
8-4	الزيادة الكبيرة في أرتشاح الخلايا الألتهابية لطبقة الأدمة مكونة الورم الكاذب Pseudoepitheliomatous dermal change	70
9-4	أرتشاح خلوي لخلايا الأدمة يشمل الخلايا اللمفاوية Lymphocytes والخلايا النسجيةHistocytes وكريات الدم البيض الحمضةُ Eosinophil كما يظهر الشكل تجمعات دموية مشكلة الأحتقانCongestion	70
10-4	أرتشاح لخلايا الأدمة وخصوصاً الخلايا النسجيةHistocytes وقليل	71

	من الخلايا اللمفاوية	
11-4	الأشكال اللاسوطيةAmastigoteلطفيلي اللشمانيا داخل الخلايا العملاقةGiant cells	71
12-4	الأطوار اللاسوطيةAmastigotesداخل الخلايا البلعميةMacrophages	72
13-4	الأطوار اللأسوطيةAmastigotes داخل وخارج الخلايا البلعميةMacrophages	73
14-4	التنخر الأدمي المنتشر مع أرتشاح للخلايا العدلة Neutrophils والخلايا أحادية النواة Mononuclear cells	74
15-4	تكوين الألتهاباتالورمية الحبيبية Granulomatous inflammation	74
16-4	معدل تركيز الحركي الخلوي IFN- γ في مصل المجاميع المدروسة.	78
17-4	معدل تركيز الحركي الخلوي TNF-α في مصول المجاميع المدروسة.	81
18-4	معدل تركيزالحركي الخلوي IL-12 بيكوغرام/مل في مصول المجاميع المدروسة	84
19-4	معدل تركيز الحركي الخلوي IL-17A بالبيكوغرام/مل للمجاميع المدروسة	87
٢٠-٤	معدل تركيز الجاذب الخلوي MCP-1 بالبيكوغرام/مل في مصول المجاميع المدروسة	90

قائمة المختصرات

المختصر	الأسم الكامل
ACL	Anthroponotic cutaneous leishmaniasis
APC	Antigen presenting cell
CI	Cellular immunity
CL	Cutaneous leishmaniasis
CR1	Complement receptor 1
CR3	Complement receptor 3
DAT	Direct agglutination test
DCL	Diffuse cutaneous leishmaniasis
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FNR	Factors natural receptor
GFs	Growth factors s
HI	Humoral immunity
IFAT	Immunoflorecent assay test
IFN-α	Iterferon alpha
IFN-β	Iterferon beta
IFN-Y	Interferon gamma
IgG	Immunoglobuline Type G
IgM	Immunoglobuline Type M
ILs	Interleukines
IL-2	Interleukine-2
IL-4	Interleukine-4
IL-5	Interleukine-5
IL-6	Interleukine-6
IL-10	Interleukine-10
IL-12	Interleukine-12
IL-13	Interleukine-13
IL-17A	Interleukine-17A
iNOS2	Inducible Ntric Oxide Synthetase type-2
L.aethiopica	*Leishmaniaaethiopica*
L.amazonensis	*Leishmaniaamazonensis*
L. braziliensis	*Leishmaniabraziliensis*
L.chagasi	*Leishmaniachagasi*
L.donovania	*Leishmaniadonovania*
L.guyanensis	*Leishmaniaguyanensis*
L.infantum	*Leishmaniainfantum*
L.major	*Leishmania major*
L.mexicana	*Leishmaniamexicana*
L.panamensis	*Leishmaniapanamensis*

L.peraviana	*Leishmaniaperaviana*
L.tropica	*Leishmaniatropica*
L.venezulensis	*Leishmaniavenezulensis*
LAT	Latex agglutination test
LPG	Lipophosphoglycan
MCL	Mucocutaneousleishmaniasis
MFR	Mononuclear cells factor receptor
NKs	Natural killer cells
NNN	NovynicolleMacneal medium
P.aleyandri	*Phleptomousaleyandri*
P.papatasi	*Phleptomouspapatasi*
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
PKDL	Post kala-azar dermalleishmaniasis
RCL	Recidivans cutaneous leishmaniasis
Th-1	T help type 1
Th-2	T help type2
TCDF	T cell differentiation factor
TLR,I,II	Toll like receptors
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TNF-β	Tumor necrosis factor beta
VL	Visceral leishmaniasis
ZCL	Zoonotic cutaneous leishmaniasis

CHAPTER ONE الفصل الاول

1-1 المقدمة INTRODUCTION

يعد داء الشمانيا Leishmaniasis من الامراض الطفيلية المنشأ، يسببه سوطيات وحيدة الخلية Unicellular flagellate أجبارية التطفل Obligate داخل خلوية Intracellular، تعود الى جنس اللشمانيا *Leishmania*، تمر أنواع جنس اللشمانيا .*Leishmania* spp بطورين

أحدهما عديم السوط Amastigote داخل الخلايا البلعمية Macrophages للمضيف الفقري (كاللبائن) والطور الاخر أمامي السوط Promastigote في القناة الهضمية للمضيف اللافقري الناقل وهو أنثى ذبابة الرمل Sand fly التي تعود الى جنس *Phlebotomus* في العالم القديم أو الى جنس *Lutzomyia* في العالم الجديد (Beaver and Jung,1985; Sarkar,2008 ; Rahi *et al.*, 2013).

يوجد ثلاثة أشكال رئيسة لداء اللشمانيا تختلف في صفاتها ونوع الطفيلي المسبب لها ونوع المضيف الناقل وتوزيعها الجغرافي ومظاهرها السريرية والمزرعية وهي تتمثل بداء اللشمانيا الأحشائي Visceral leishmaniasis (VL) أو الحمى السوداء Black fever أو الكالاآزار Kala-azar، داء اللشمانيا الجلدي Cutaneous leishmaniasis (CL) أو البثرة الشرقية Oriental sore أو حبة بغداد Baghdad boil وداء اللشمانيا الجلدي – المخاطي Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) أوداء اللشمانيا الامريكي American Leishmaniasis (الحديثي وعواد، 2000 ; Molan and Faraj, 2010).

يظهر داء اللشمانيا الجلدي في العالم القديم بمظهرين أحدهما داء اللشمانيا الجلدي البشري Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) يسببه طفيلي *Leishmania tropica* ويكثر انتشاره في المناطق الحضرية فيدعى بالنوع المدني Urban type والاخر داء اللشمانيا الجلدي الحيواني المصدر Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) يسببه طفيلي *Leishmania major* ينتشر في المناطق الريفية فيعرف محلياً بالنوع الريفيRural type (Al-Samarai and Al-Obaidi, 2009 ;WHO, 2003 ;Acha and Szyfers,1980).

تشير أحصائيات منظمة الصحة العالمية بأن أكثر من (350) مليون شخص معرض للأصابة بطفيلي اللشمانيا سنوياً (Herwaldt,1999). ويكون معدل الأنتشار الكلي في العالم بحوالي (12) مليون شخص مصاب وتسجل (2) مليون حالة جديدة سنوياً بحيث تتوزع الى

(500000) حالة لداء اللشمانيا الأحشائي و(1500000) حالة لداء اللشمانيا الجلدي بنوعيه الرطب والجاف (WHO, 2010, 2007).

ينتشر داء اللشمانيا الأحشائي (الكالآزار) وداء اللشمانيا الجلدي (حبة بغداد) في العراق، إذ يتواجد داء اللشمانيا الأحشائي في المناطق الوسطى والجنوبية ولاسيما القرى الزراعية، يصيب هذا المرض الاطفال دون سن الثانية عشر من العمر في حين يصيب داء اللشمانيا الجلدي الأعمار جميعها في أنحاء القطر كافة (كاظم،2012) ويعد العراق والأقطار المجاورة له (أيران، سوريا، المملكة العربية السعودية وتركيا) من الأقطار الموبؤة بداء اللشمانيا الجلدي (Memisoglu *et al.*,2001; Al-Jebouri,2002; شعبان والنحاس، 2003; WHO,2007; الزغيبي واخرون، 2010).

يتم تشخيص داء اللشمانيا الجلدي أعتماداً على العلامات السريرية وطرائق التشخيص بالمسحات Smears والطريقة المزرعية Culture method إضافة إلى الأختبارات المصلية والطرائق الجزيئية الحديثة (Rahi *et al*., 2013; Paniker, 2007).

تظهر أصابة داء اللشمانيا الجلدي على شكل بثرة في مكان لسعة ذبابة الرمل بعد مرور(2–8) أسابيع في الأجزاء المكشوفة من الجسم كالذراعين والساقين والوجه والعنق والأذن, تكون القرحة منفردة أو متعددة (Lesho *et al.,* 2005). تنحصر الإصابة في الأنسجة الجلدية وأحياناً تصيب الأغشية المخاطية، فتبدأ الإصابة بتضخم الأدمة مكونة قرحة دائرية الشكل ذات حدود مرتفعة ومرتكز منخفض حمراء اللون وإرتشاح خلوي وتحلل لأنسجة الجلد وبعد فترة من الزمن تصبح قرحة ذات قشور وقيحاً ذات رائحة كريهة، وقد تصاب القرحة بالبكتريا والفطريات فتزداد الأعراض سوءاً تتمثل بإرتفاع درجة الحرارة Fever وقشعريرة Chill أيضاً (الحديثي وعواد، 2000).

تتحفز الإستجابة المناعية الخلوية Cellular immunity (CI) والمناعة الخلطية Humoral immunity (HI) مباشرة عندما يحدث الخمج بطفيلي اللشمانيا في الانسان (Assafa *et al*., 2004).وتعد الأستجابة المناعية الخلوية الخط الدفاع الأول الرئيس ضد طفيلي اللشمانيا، فتبدأ الخلايا التائية المساعدة CD4+ T helper (Th) مباشرة بالإنقسام الى نوعين بحسب الوظيفة التي تؤديها، الخلايا التائية المساعدة النوع الاول (Th-1) التي تفرز الحركيات الخلوية Cytokines والتي لها أهمية في مقاومة الاصابة بتحفيز أنتاج الأنترفيرون كاما (INF-γ) Interferon gamma الذي يعمل بدورهِ على تنشيط الخلايا البلعمية على تكوين أنزيم iNOS2 الذي يحفز على تكوين أوكسيد النتريك NO القاتل للطفيلي. أما الخلايا التائية المساعدة من النوع الثاني (Th-2) تعمل على أفراز تشكيلة أخرى من الحركيات الخلوية Cytokines هي الأنترلوكين–4، الأنترلوكين–5 والأنترلوكين–10 وجميعها تشترك في تثبيط فعالية الخلايا البلعمية (Zajac and Coboy, 2011 ; Mathews *et al.*, 2000). فضلاً عن الدور المباشر لخلايا القتل الطبيعي Natural Killer Cells (NKs) في أنتاجها للحركي الخلوي أنترفيرون كاما (Laskay *et al*., 1993). بينما تعمل الأستجابة المناعية الخلطية على تكوين الأضداد (الأجسام المضادة النوعية) ضد الطفيلي ويكون دورها ضعيف ضد اللشمانيا الجلدية التي تسببها *Leishmania tropica* و *Leishmania major* (Ashfrod and Bates,1998). فقد لوحظ بأن للأضداد دوراً بسيطاً في تحديد سير الإصابة بداء اللشمانيا الجلدي (Awasthi *et al*., 2004; Roberts, 2006).

شهد العراق خلال السنوات العشر الأخيرة إنتشاراً واسعاً لمرض اللشمانيا بنوعيهِ الجلدي والأحشائي حسب إحصائيات وزارة الصحة العراقية للأعوام ما بين (2003 –2014) واسهمت عوامل كثيرة في هذا الأنتشار منها عمليات نزوح السكان الى أماكن أخرى والتي حدثت في قطرنا

العزيز فضلاً عن تغيير ديموغرافية بعض المناطق من خلال قطع الأشجار وتحويلها الى أراضي سكنية وغيرها من العوامل (WHO,2014).

ونظراً لأهمية داء اللشمانيا الجلدية Cutaneous Leishmaniasis وما يسببه من تأثيرات مرضية كثيرة، فقد تم أختيار محافظة ديالى لأجراء الدراسة الحالية للوقوف على واقع الحال ودراسة المرض في هذه المحافظة لذا فقد إستهدفت الدراسة الحالية ما يأتي:-

1- تحديد نسبة الإصابة بداء اللشمانيا الجلدية وعلاقتهُ بالفئات العمرية والجنس والوظيفة للمرضى المصابين.

2- محاولة لعزل طفيلي اللشمانيا الجلدية من قرح المرضى المصابين وتشخيص الإصابة بالإعتماد على طرائق التشخيص المختلفة التي شملت السريرية Clinically منها وأجراء المسحات Smears والطرائق المزرعية Culture methods وطرائق التشخيص النسجية Histological methods ومقارنة كفاءتها.

3- دراسة التأثيرات المرضية النسجية Histopathological effects التي تحدثها الإصابة بهذا المرض في جلد الأنسان المصاب وعلى مستوى المجهر الضوئي.

4- التحري عن أهم التغيرات المناعية المصاحبة للإصابة لدى المرضى والمعالجين موضعياً بعقار البنتوستام Pentostame والغير المصابين (السيطرة) وذلك من خلال قياس مستويات بعض الحركيات الخلوية التي شملت IFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-17A يضاف إليها دراسة أثر جاذبات الخلايا Chemokines ودورها في الإصابة متمثلة بدراسة MCP-1.

الفصل الثاني CHAPTER TWO

2-استعراض المراجع LITERATURE REVIEW

2-1:-جنس اللشمانيا *Leishmania*

هو طفيلي إبتدائي أحادي الخلية Protozoa إجباري التطفل داخل الخلاياIntracellular، يعود لرتبة Kintplastida من عائلة Trypanosomatidae وهو ثنائي المضيف Digenetic إذ أنَّ له طوراً أمامي السوط Promastigote يعيش في أمعاء الحشرة الناقلة أنثى ذبابة الرمل العائدة لجنس *Phlebotomus* أو *Lutzomyia* وطور دائري أو بيضوي عديم السوط Amastigote يعيش ويتكاثر داخل خلايا البلاعم Macrophages للمضيف الفقري (Paniker,2007).

أطلق Ross عام1903 أسم *Leishmania* على هذا الجنس تخليداً لمكتشفهِ William Leishman الذي شاهد لأول مرة الطور عديم السوط للنوع الأحشائي*Leishmania donovani* المسبب لمرض الكالاآزار Kala-azar في مسحات من طحال جندي إنكليزي توفي بسبب الحمى في الهند عام 1900. أوضح Batlon عام 1907 أن لهذا الطفيلي سوطاً Flagellum فتمكن من وصف الطور أمامي السوط Promastigote (Beaver and Jung, 1985). أما النوع الجلدي فيعود وصفهُ منذُ العصور القديمة أي الثاني والثالث قبل الميلاد (2300-3500)، وذلك في زمن الممالك الأشورية والأكدية والأمبراطورية الفارسية ولم يعرف علمياً الا في عام 1885عندما قام العالم Cuningham بفحص مقاطع من القرح جلدية لمصابين باللشمانيا الجلدية وعدها نوعاً من الفطريات Mycetozoa، في حين عدها العالم Firth عام 1891 من البوغيات وأطلق عليها اسم *Sporozoa furunclose* (Asilian *et al*., 1998). ويعد الجراح الروسي Borovsky عام 1898أول من وصف هذا الطفيلي بدقة وعدهُ من الأبتدائيات ولكنه لم يصنفه او يسميه لذا نسب اسبقية اكتشافه الى العالم Wright الذي سماه *tropica* وذلك عام 1903 ، ثم وضع العالم

Lunhe عام 1906 هذا النوع ضمن جنس اللشمانيا *Leishmania* وتوصل بعض العلماء عام 1942 الى أن حشرة ذبابة الرمل *Phlebotomus* تكون مضيفاً وسطياً ناقلاً للطفيلي (الحديثي وعواد، 2000).

2-2:- تصنيف جنس اللشمانيا Classifaction of *Leishmania*

ينتمي جنس اللشمانيا الى المثقبيات Trypanosomatia في ضمن رتبة ذات الجسيمات الحركية Kinetoplastida التي تنتمي الى صنف السوائط الحيوانية Zoomastigophora من شعبة السوائط اللحمية Sarcomastigophora المنتمية الى المملكة الحيوانات الابتدائية Protozoa (Bari and Rahman , 2008). كما موضح أدناه:-

Kingdom : Animalia
Subkingdom : Protozoa
Phylum : Sarcomastigophora
Subphylum : Mastigophora
Class : Zoomastigophora
Order : Kinetoplastida
Suborder : Trypanosomatina
Family :Trypanosomatidae
Genus *: Leishmania*
Species : *tropica*
Species : *donovani*
Species : *mexicana*
Species: *braziliensis*

3-2:- المظهر الخارجي للشمانيا Morphology of *Leishmania*

يمر طفيلي اللشمانيا بطورين خلال فترة حياتهِ هما:-

١–الطور اللاسوطي Amastigote

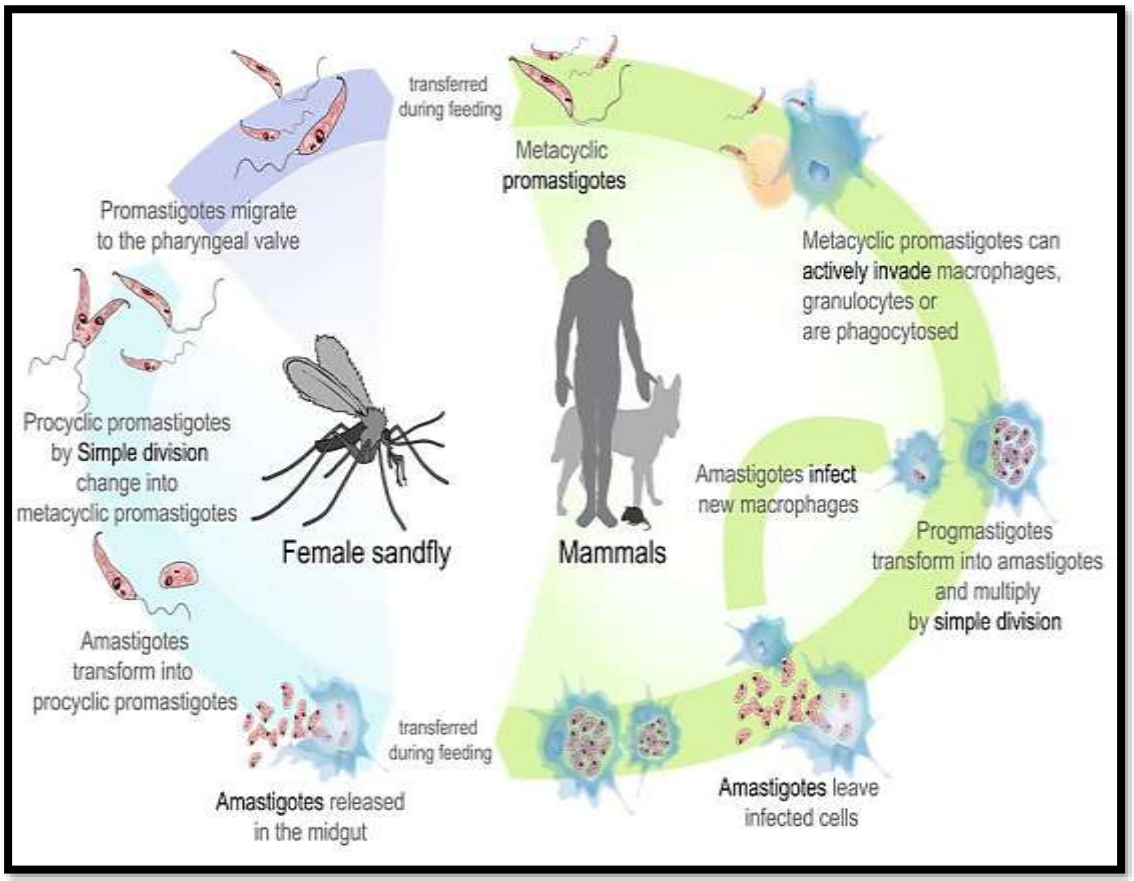
يتوافر هذا الطور داخل الخلايا البلعمية الكبيرة للمضيف الفقري كاللبائن (Singh, 2006; Molan and Faraj, 2010 ;Paniker, 2007). ويبدو هذا الطور في الشرائح المحضرة من المضيف الفقري دائرياً أو بيضوي الشكل يتراوح حجمه ما بين (2–4) مايكرون ويحتوي على نواة دائرية أو بيضوية أيضاً، أما مولد الحركة فيمتاز بتغاير أشكالهِ بين الدائري، البيضوي والقضيبي المنحني ويقع قرب النواة، ويوجد سوط أثري يمتد حتى سطح الجسم ينشأ من حبة قاعدية قريبة جداً من مولد الحركة (Beaver and Jung, 1985; Maheshwari, 2008; Molan and Faraj,2010).

2– الطور أمامي السوط Promastigote

يتوافر هذا الطور في الأمعاء الوسطى للمضيف اللافقري الناقل المتمثل بذبابة الرمل (Singh, 2006; Paniker, 2007 ;Molan and Faraj, 2010). ويبدو هذا الطور في الشرائح المحضرة من لعاب الحشرة الناقلة أو من الوسط الزرعي متطاولاً كمثرياً أو مغزلياً ذا سوط، ويتراوح طول هذا الطور (15– 25) مايكرون ويحتوي على مولد حركة يقع في النهاية الأمامية، ويمتد منهُ سوط يصل طولهُ بمقدار طول الجسم وقد يصل الى (22) مايكرون أما النواة فتكون وسطية الموقع ويوجدهذا الطور بشكلين داخل القناة الهضمية الوسطى للحشرة الناقلة أحدهما Haptomonad الذي يكون قصير وغليظ يصل طولهِ الى (8) مايكرون ويحتوي على نواة ومولد حركة وحبة قاعدية يمتد منهُ سوط يصل طولهُ الى (10) مايكرون، أما الشكل الأخر Nectomonad ذو شكل مغزلي طويل يصل طوله الى (12) مايكرون ويحتوي على نواة ومولد حركة يمتد منهُ سوط يصل طولهِ الى (20) مايكرون (Maheshwari, 2008) .

2-4:– دورة حياة طفيلي اللشمانيا Life cycle of *Leishmania* parasite

يدخل الطور اللاسوطي لطفيلي اللشمانيا الى الحشرة الناقلة ذبابة الرمل Sand fly عندما تقوم أناث هذه الحشرة بالتغذي على دم المضيف الفقري المصاب وأن أول خطوة تحدث هي تحول الطور اللاسوطي الى الطور الامامي السوط إذ أن هذا التحول يحدث ضمن وجبة الدم والتي تكون محاطة بغشاء Peritrophic membrane الذي يفرز من قبل خلايا تتوافر ضمن بطانة الأمعاء الوسطى للحشرة الناقلة وينقسم الطور الأمامي السوط في هذه المرحلة المبكرة ويسمى عندئذ ب Procyclic stage وبعد ثلاثة أيام من تغذية الحشرة يخرج الطور الأمامي السوط من هذا الغشاء متجهاً نحو الجزء الأمامي من الأمعاء الوسطى أما بعد اليوم الرابع من التغذية فيمكن ملاحظة عدد من الأطوار أمامية السوط في الأمعاء الوسطى للحشرة الناقلة، فيتخذ شكلاً مغزلياً نحيفاً وذا سرعة عالية في الحركة، إذ يمثل هذا الطور ما يسمى Metacyclic promastigote والذي يمكن أن يسبب إصابة في المضيف الفقري (Singh, 2006 ; Zeibig,1997). إذ يدخل هذا الطور الى المضيف الفقري عن طريق لسعة الحشرة الناقلة، عندئذ تقوم خلايا البلاعم بالتقاط الطفيلي إذ تتجمع هذه الخلايا الدفاعية بفعل التلف الحاصل في الأنسجة من جراء عملية تغذية الحشرة الناقلة (Maheshwari,2008). يفقد الطور أمامي السوط سوطه داخل الخلايا البلعمية ويتحول الى الطور عديم السوط خلال مدة قصيرة وتستغرق عملية التحول هذه (12– 24) ساعة وبعد ذلك ينقسم الطور اللاسوطي ويستمر بالإنقسام داخل البلاعم وعند إمتلائها بأعداد كبيرة من الطفيلي تنفجر الخلية البلعمية المصابة وتتحرر الاطوار اللاسوطية لتصيب خلايا بلعمية مجاورة أخرى وعندما تتغذى الحشرة الناقلة على دم المضيف الفقري المصاب ينتقل الطور عديم السوط الموجود داخل الخلايا البلعمية المصابة في الدم المحيطي وضمن الأنسجة أو الطور اللاسوطي المتحرر نتيجة تحطم الأنسجة بفعل لسعة ذبابة الرمل وهكذا تستمر دورة الحياة(Assafa *et al.*,2004 ; Cheng,1973). والشكل (2–1) يوضح دورة حياة طفيلي اللشمانيا.



شكل (٢-١): دورة حياة طفيلي اللشمانيا الجلدية عن

(www.en.m.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis)

5-2 الأشكال السريرية Clinical Features

هناك أكثر من 20 نوعاً ممرضاً، يعود لهذا الجنس ويسبب أمراضاً خطيرة تعرف بداء اللشمانيا Leishmaniasis، إذ تؤدي الى ظهور أشكال مرضية تتراوح ما بين أصابات موضعية

تترك آثاراً وندباً لا تزول طول العمر يعرف بداء اللشمانيا الجلدي Cutaneous Leishmaniasis وإصابات قد تؤدي الى الموت تصيب الأحشاء الداخلية (خلايا الجهاز البطاني الشبكي) تعرف بداء اللشمانيا الأحشائي Visceral Leishmaniasis (Marquardt *et al.*, 2000). يصنف داء اللشمانيات Leishmaniasis في العالمين القديم والحديث الى:-

2-5-1:- داء اللشمانيا الأحشائي Visceral Leishmaniasis

يتميز هذا المرض بحمى مزمنة غير منتظمة مع أسهال، فقدان الوزن، فقر الدم Anemia، تضخم الكبد والطحال Hepatospleonmegaly، نقصان في كريات الدم البيض Leukopenia، تحلل في الكبيبات الكلوية فضلاً عن اليرقان Jaundice وقد يؤدي الى الوفاة إذا ترك بدون علاج (Beck and Davies, 1981; الحديثي وعواد، 2000). والأنواع المسببة لهُ في العالم القديم هي:- *L. donovani* , *L. infantum* وفي العالم الجديد *L. chagasi* وتعد الكلاب والقوارض المضائف الخازنة الرئيسة لهذه الأنواع (Beaver and Jung,1985; McCall *et al.*, 2013).

2-5-2:- داء اللشمانيا الجلدي Cutaneous Leishmaniasis

يتميز هذا المرض بظهور قرح جلدية في مكان لسعة ذبابة الرمل في المناطق المكشوفة من الجسم كالوجه، والذراعين، والساقين والأذن. تتراوح مدة حضانة المرض ما بين (2 -6) أشهر، ويعرف بأسماء محلية عدة منها حبة بغداد Bagahdad boil، حبة حلب، حبة دلهي...الخ وبحسب مناطق انتشارها وتوافرهما في العالمين القديم والحديث (Jacobson, 2003). تنقسم الأشكال السريرية لداء اللشمانيا الجلدي بحسب نوع الطفيلي المسبب والإنتشار وتأثيراته المرضية في العالمين القديم والجديد الى :-

2-5-2-1:-داء اللشمانيا الجلدي حيواني المصدر (الريفي)

Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) Rural

ينتشر هذا المرض في العالم القديم يسببه طفيلي *L. major*، تتراوح مدة حضانة المرض (3–6) أشهر، تتميز بظهور قرح جلدية ذات تنخر قوي في مركز القرحة وتقوم بطرح خراج دموي Hemapostema وذات حواف غير منتظمة وقاعدة القرحة حمراء ومحاطة بندب ذات نسيج حبيبي فلذلك تدعى بالنوع الرطب Wet type ويكثر أنتشارها في المناطق الريفية. وتعد الجرابيع والقوارض من المضائف الخازنة (Al-Mohamadawi,1989 ;Aronson *et al*.,2003; Rahi *et al*., 2013).

2-2-5-2:–داء اللشمانيا الجلدي بشري المصدر (المدني)

Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) Urbon

المسبب لهذا النوع هو الطفيلي *L. tropica* ويكون شائعاً في وسط وجنوب غرب آسيا وشبه القارة الهندية (Lainson, 1988). وتحدث تقرحات جلدية غير مؤلمة وكثيراً ما تؤدي الى ندب مشوهة وتندمل القرحة بصورة تلقائية خلال عام أو أكثر وتكون جافة فلذلك يدعى بالنوع الجاف Dry type وتتراوح مدة حضانة المرض ما بين شهرين الى سنة (Lesho *et al.,*2005; WHO, 2014 ;Rahi *et al.*, 2013).

2-2-5-3:– داء اللشمانيا الجلدي المحلي

Localized Cutaneous Leishmaniasis(LCL)

يعرف هذا النوع أيضاً بقرحة جكليرو Chiclero's ulcer ويتميز بظهور قرحة جلدية حمراء اللون، مفردة، غير مؤلمة، وذات تنخر غير عميق في مركز القرحة وتحاط القرحة بندب محددة، ويحتاج هذا النوع لفترة طويلة حتى يشفى تصل لمدة سنة تقريبا ويكون المسبب الرئيس لها

كل من *L. infantum*; *L. major* في العالم القديم و *L. mexican*; *L. venezulensis; L. amazonensis; L. braziliensis; L. panamensis; L. guyanensis; L. peraviana; L. chagasi* (Andrade-Narvaez *et al*., 2005 ;Beaver and Jung, 1985).

2-5-2-4:- داء اللشمانيا الجلدي المنتشر

Diffused Cutaneous Leishmaniasis(DCL)

يتميز هذا النوع بظهور ندبة غير متقرحة، وندب كثيرة منتشرة في الجسم وتشابه مرض الجذام Scabies disease من حيث الأعراض والعلامات السريرية والعامل المسبب لهذا النوع *L. aethiopica* في أثيوبيا وكينيا في (العالم القديم) *L. mexicana; L. amazoensis; L. venezuelensis* (في العالم الجديد) في جنوب ووسط أمريكا (Molan and Faraj, 2010).

2-5-2-5:-داء اللشمانيا الرسيديفانز

Recidivans Cutaneous Leishmaniasis(RCL)

يتميز هذا النوع بظهور بثرة غير أعتيادية للبثرة الشرقية المتسببة للخمج بطفيلي *L. tropica* وفي هذا النوع تظهر بثرات جديدة بإستمرار حول القرح القديمة ومن الصعب تمييزها عن مرض الذئب الأحمراري Lupus vulgaris خاصة في حالة عدم وجود طفيليات في الآفة ويسبب هذا النوع من اللشمانيا الجلدية طفيلي *L. braziliensis* في العالم الجديد و*L. major* في العالم القديم (Burns, 2004 ; Herwaldt, 1999).

2-5-2-6:-داء اللشمانيا الجلدي ما بعد الكالآزار

Post Kala-azar dermal Leishmaniasis (PKDL)

يتميز هذا المرض بطفح جلدي وحبات غير متقيحة يصل حجمها بمقدار حجم حبة البازلاء، يحدث بعد الإصابة بمرض اللشمانيا الإحشائية والتي لم تعالج بشكل كامل في حال عدم شفاء القرح الأولية ويسببهُ *L. donovani ;L. infantum* في العالم القديم و*L. Chagasi* في العالم الجديد خصوصاً المناطق المتوطنة الأصابة (Mahshwari, 2008).

2-5-3:- داء اللشمانيا الجلدي – المخاطي

Mucocutaneous Leishmaniasis(MCL)

يعرف هذا النوع أيضاً بإسم داء اللشمانيا الامريكي American Leishmaniasis أو بداء اللشمانيا الأنفي البلعومي Nasopharyngeal Leishmaniasis أو ما يعرف بمرض يوتا Uta disease. وينتشر في معظم دول أمريكا الوسطى والجنوبية كالبرازيل، الأرجنتين، بيرو والمكسيك. وتعد القوارض والكلاب مضائف خازنة للطفيلي. تحدث الإصابة في الأغشية المخاطية للبلعوم والأنف والفم، بحيث تظهر آفات متعددة ومتقرحة مما يؤدي الى تنخر الأنف والصفيحة الرقيقة فيهِ مما يسبب تشوهات حادة وممكن أن تنشأ الإصابة من آفة جلدية مزمنة تبقى لمدة طويلة، وفترة الحضانة داخل المضيف الفقري تتراوح من أسبوعين الى أشهر عدة من لسعة ذبابة الرمل (الحديثي وعواد، 2000 ; Shirian *et al*., 2012) يسبب هذا المرض كل من *L. major* في العالم القديم ; *L. aethiopica* *L. mexicana, L. amazonensis; L. braziliensis;* في العالم الجديد (Weigle *et al*., 1988).

2-6:- طرائق الأنتقال Methods of Transmission

تنتقل جميع أنواع طفيلي اللشمانيا *Leishmania* spp. بوساطة أناث ذباب الرمل أثناء تغذيتها على دم المضيف الفقري، وهذه الأنواع تعود الى عائلة الفاصدات *Phlebotominae* من رتبة ثنائية الاجنحة Diptera. وهناك ستة أجناس، أثنتى منها لها أهمية طبية هما *Phlebotomus* في العالم القديم و*Lutzomyia* في العالم الجديد (Jacobson,2003). يوجد في العالم حوالي (70) نوعاً ناقلاً لأنواع داء اللشمانيا الجلدي والأحشائي والجلدي المخاطي

(Rohousova *et al.,*2012). وفي العراق سُجل سبعة عشر ناقلاً من ذباب الرمل المعروف بالحرمس Sandfly وأكثر الأنواع شيوعاً هي *P. sergenti , P. Aleyandri* (Aronson et al.,2003) *P.papatasi*, ومن أهم الطرائق الأخرى لإنتقال الطفيلي بين الفقريات عن طريق ذبابة الاسطبل *Stomoxys calcitranns* أيضاً التي لها دور في إنتقال المسبب المرضي بصورة الية Mechanical ويمكن أن ينتقل الطفيلي عن طريق عمليات نقل الدم Blood transfusion ومن الأم المصابة الى جنينها عبر المشيمة نقلاً خلقياًCongenital transmission ومن خلال عمليات نقل الأعضاء Organs transplantation كالقلب، الكلى والكبد (Vidyashankar and Agrawal,2002; Singh,2006 ;Sivakumar,2004).

2-7:- المضائف الخازنة The Reservoir hosts

تتنوع المضائف الخازنة لمرض اللشمانيا الجلدية, إذ يعد الأنسان المضيف الخازن الطارىء في الشرق الاوسط و آسيا وأفريقيا فضلاً عن الكلاب والثعالب والذئاب والقوارض البرية مثل الجرابيع Gerbils(WHO,2003)، وقد ذكر Jacobson (2003) بأن الباحثين Adler and Theodor عام 1930 تمكنوا من عزل طفيلي اللشمانيا الجلدية من كلب في العراق، حقنت هذه العزلة في الإنسان فأعطت قرحة جلدية، وهي لا تختلف عن القرحة الناجمة عن لسعة الحشرة الناقلة وكذلك تؤدي بنات آوى والجرذ الأسود دوراً مهماً بوصفها مضايف خازنة لطفيلي اللشمانيا الجلدية ذات المنشأ البشري Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis الناتجة عن الإصابة بطفيلي *L. tropica*، أما القوارض والحيوانات البرية فهي مضائف خازنة لمرض اللشمانيا الجلدية ذا المنشأ الحيواني Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) الناتجة عن الإصابة بطفيلي البثرة الرطبة *L. major* ويبقى الأنسان المضيف الخازن الثانوي في حالة

عدم توافر المضيف الأصلي (Jacobson, 2003 ; Ashford and Sang, 2001 ; WHO, 2014 ;WHO,2006).

بينما تعد حيوانات الوبر Hyraxes المضيف الخازن لطفيليات *L. tropica , L. major* المسببان لداء اللشمانيا الجلدي بنوعيهِ الجاف والرطب على التوالي في أثيوبيا وأرتيريا (WHO,2007).

2-8:- وبائية داء اللشمانيا الجلدي

Epidemiology of Cutaneous lLeishmaniasis

يستوطن داء اللشمانيا الجلدي في كل قارات العالم ماعدا قارة أستراليا وتتركز الاصابة في المناطق الإستوائية وشبه الإستوائية مترافقة مع توافر المضيف الناقل (WHO,2003). سُجل أنتشار المرض في 88 بلداً ويقدر عدد الأشخاص المعرضين لخطر الإصابة بداء اللشمانيا الجلدية الى 350 مليون شخص وأن نسبة الإصابات الجلدية تصل الى أكثر من 90% في بعض المناطق المستوطنة الإصابة كشمال شرق الهند, بنغلادش، السودان والبرازيل، كما قدرت عدد الإصابات السنوية عالمياً باللشمانيا الجلدية حوالي 1.5- 2 مليون حالة سنوياً (Jacobson,2003 ; WHO,2007 ; Lukes *et al.,*2007). وعُد هذا المرض من المشاكل الحقيقية التي أصابت الجيوش المتمركزة في الشرق الأوسط خلال الحرب العالمية الثانية وقدرت بحوالي 193 حالة لكل مجموعة سكانية مؤلفة من 1000 شخص، كما حدثت حالة مشابهة خلال حرب الخليج إذ بلغت نسبة الإصابة بحوالي 2-3% بين جنود قوات التحالف (El-Deen *et al.*, 2006). يُفسر الإرتفاع الملحوظ في نسب الإصابة بمرض اللشمانيا الجلدية الى التغيرات البيئية والتي بدورها تزيد من فرص تعرض الأنسان الى لسعة ذبابة الرمل الناقلة للمرض مثل قطع الأشجار الكبيرة, بناء السدود، توسع الأراضي الزراعية، أنشاء الطرق المعبدة الطويلة والهجرة السكانية، فضلاً عن عوامل

إجتماعية وإقتصادية التي تزيد من خطورة المرض وإنتشارهِ كتزايد أعداد السكان في البنايات القديمة والرديئة، عدم وجود الصرف الصحي، تراكم القمامة قرب المناطق السكنية، إكتظاظ الناس في المناطق قليلة المساحة وتوافر المضايف الخازنة كالكلاب السائبة والقوارض في المساكن والقرى وكما تسهم عملية ضعف وإهمال السيطرة على المضيف الناقل دوراً في زيادة أنتشار المرض مع دخول بعض العوامل الأخرى كغياب اللقاح ضد المرض فضلاً عن وجود نقصاً في العلاج الطبي بسبب كلفتهُ العالية لاسيما في المناطق الفقيرة (WHO, 2014).

تنتشر اللشمانيا الجلدية في العالم القديم في الشرق الأوسط، الهند، مناطق البحر المتوسط، أفريقيا ومناطق أسيا (Masmoudi *et al*., 2013). ويتجدد أنتشارها في العالمين القديم والحديث بحسب وجود نوع العامل المسبب لها، إذ وجد 20 نوعاً ممرضاً للإنسان يعود الى جنس اللشمانيا *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* (Rohousova *et al.,*2012 ;Pinker, 2007).

وكذلك ينتشر داء اللشمانيا الجلدية بنوعيهِ داء اللشمانيا الجلدية حيواني المصدر Zoonotic Cutaneeous Leishmaniasis وداء اللشمانيا الجلدية بشري المصدر Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis في العراق والدول المجاورة لهُ كل من أيران، الأردن، سوريا، السعودية والكويت (WHO,2007; Al-Samarai and Al-Obaidi,2009).

تظهر الإصابة خلال الأشهر من تشرين الأول الى بداية شهر آذار ومن الممكن أن تستمر بالظهور حتى نيسان، وأكثر الفئات العمرية تعرضتاً للإصابة ما بين عمر شهرين الى 10 سنوات (الطائي، 2004). وأجريت الكثير من الدراسات الوبائية في العراق التي تناولت جوانب كثيرة كعلاقة المرض بالعمر والجنس والمهنة والمستويين الثقافي والأقتصادي وغيرها من الصفات (Assafa *et al*., 2004; Aronson *et al*., 2003؛ الطائي,2004 ;

El-Deen *et al*.,2006; الزغيبي *et al*, 2010 ;Rahi, 2010; حبيب وحسن،2011; كاظم، 2012).

2-9:- أمراضية اللشمانيا الجلدية

Pathogenicity of Cutaneous Leishmaniasis

يظهر داء اللشمانيا الجلدي بشكل قرحة جلدية في الأجزاء المكشوفة من الجسم كالذراعين، الساقين، الوجه، العنق والأذن. ويبدأ المرض بعد دخول الطور أمامي السوط داخل الخلايا البلعمية بعد تعرضهِ للسعة ذبابة الرمل المصابة مؤدياً الى ظهور الأعراض السريرية، إذ تبدأ بظهور إنتفاخ صغير محمر في موضع لسعة ذبابة الرمل تدعى بالحطاطة Papule تزداد بالحجم الى أن تصبح عقدة Nodule نتيجة تضخم الأدمة (Afghan *et al.,*2011). ونتيجة الإستجابة المناعية يحدث تقرح في مركز البثرة وتأخذ بالتنخر وتزداد بالحجم لتصبح قرح ذات حواف غير منتظمة ومتفرعة تحتوي على خلايا طلائية وقيحية وبقايا الطفيليات الميتة (Markle and Makhoul, 2004). تستمر العقدة بالتضخم الى أن تصل سنتمترين في القطر ويبدو لونها أرجوانياً، تصبح القرحة بمرور الزمن قوية مغطاة بقشور وقد ترافقها إصابات ثانوية كإصابات بالبكتيريا والفطريات مما يصاحب ذلك حمى قد تطول مدة شفائها تاركة آثاراً وندباً (Najim *et al.*, 2007).

تختلف أشكال القرح المتكونة على البشرة نتيجة الإصابة بداء اللشمانيا الجلدي بحسب نوع الطفيلي المسبب لها والإختلاف في حساسية المضيف للطفيلي ومناعة المضيف مما يؤثر في الصورة السريرية فيمكن تقسيم القرح الجلدية على أنماط مختلفة (Beck and Davies, 1981) وهذه الأنماط هي:-

النوع المتقرح Ulcerating type

النوع النامي أو الثؤلولي Vegetating or Verrucous type

النوع العقدي Nodular type

النوع ذو الشكل الجدراني Keloid type

النوع المزمن Iupoid type

ويمكن تميز داء اللشمانيا الجلدي بنوعيهِ الرطب Wet type والجاف Dry type أحدهما عن الآخر مظهرياً، بحيث يتصف النوع الجاف بحطاطة غير متقرحة في بداية ظهورها وتستمر بالظهور لفترة طويلة بينما النوع الرطب سرعان ما تتقرح وتكون قرح دامعة Weeping lesions (Sharma *et al*., 2003 ;Odom *et al*., 2000 ;Al-Mohamadawi, 1989). ويعرف داء اللشمانيا الجلدي بعدة تسميات أخرى بحسب مكان توافره كحبة بغداد Baghdad boil في العراق، حبة دلهي Delhi boil في الهند، قرحة حلب Aleppo button or boil في سوريا وتعرف عند الأغريق بـ Bouton de cvete وفي أفغانستان تعرف بحبة Balkh sore أو الحبة الأستوائية Tropical sore وغير ذلك (Molan and Faraj,2010 ;Jacobson,2003).

2-10:- الجلد الطبيعي Normal skin

يعد الجلد الخط الدفاعي الميكانيكي الاول للجسم, يتركب الجلد الطبيعي من طبقتين رئيستين هما البشرة والأدمة ويفصل بينهما غشاء القاعدي ويوجد تحت الادمة طبقة من نسيج رابط مفكك خلالي ونسيج شحمي وتدعى بالطبقة تحت الادمةHypodermis او ما تحت الجلد Subcutaneous layer ولا تعد هذه الطبقة من طبقات الجلد.

البشرة Epidermis

تتكون البشرة من نسيج طلائي طبقي مكونة من خمس طبقات مرتبة من الداخل للخارج كالآتي: -

1-الطبقة القاعدية Stratum basale

2- الطبقة الشائكة Stratum spinosum

3- الطبقة الحبيبية Stratum granulosum

4-الطبقة الشفافةStratum lucidum

5-الطبقة المتقرنة Stratum conreum

وعند اتصال البشرة مع الادمة تظهر خلايا متفرعة تدعى مولدة الميلانين إذ تحتوي هذه الخلايا على انزيم دوبا اوكسداز الذي يساعد أنتاج صبيغات الميلانين من الحمض الأمين تيروسين (المختار والراوي,2000).

الادمة Dermis

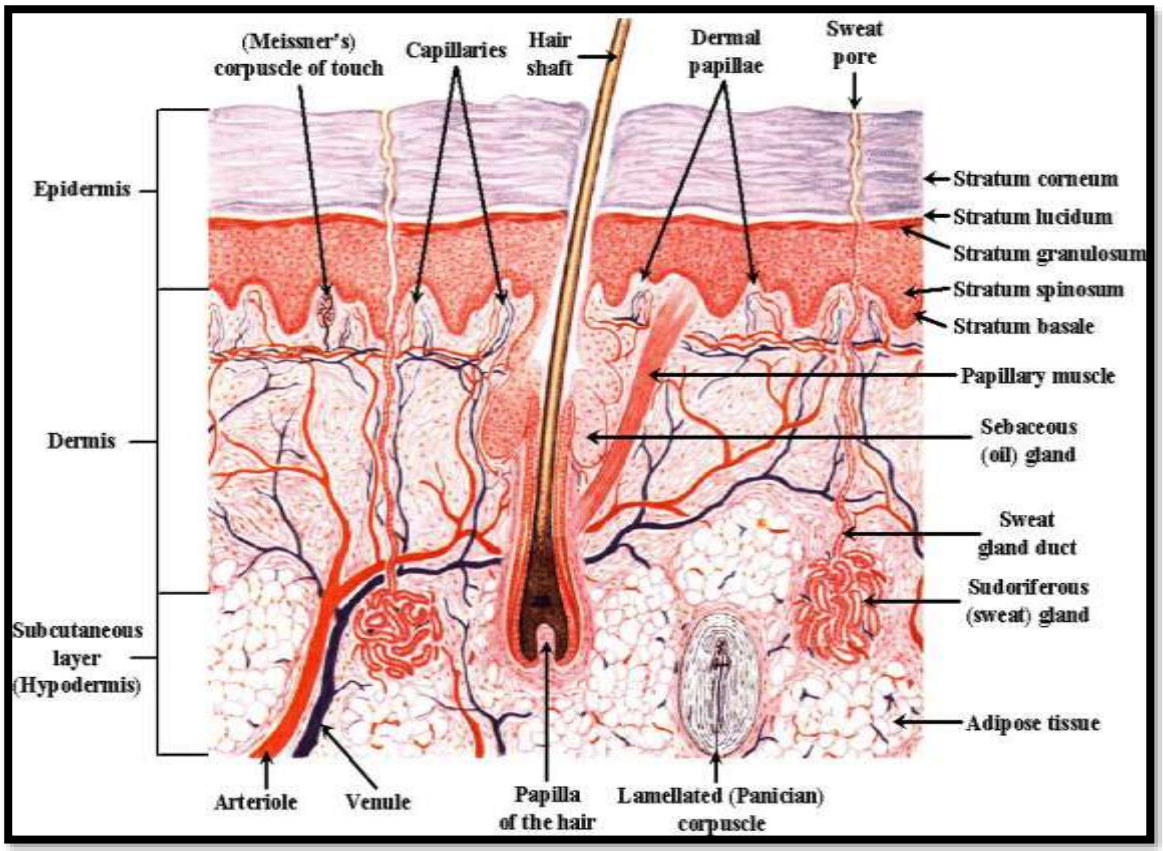
تتركب الادمة من نسيج ضام متمايز الى طبقتين واضحتين هما الطبقة الاسفنجية (مكونة من نسيج ضام فجوي) والتي تعرف بالطبقة الحُليمية Papillary layer والطبقة الصماء (مكونة من نسيج ضام ليفي) والتي تعرف بالطبقة الشبكيةReticular layer(المختار والراوي,2000).

النسيج تحت الجلد

يتكون أساساً من نسيج ضامٍّ وأوعية دموية وخلايا تختزن الدهن. ويساعد النسيج تحت الجلد في وقاية الجسم من الضربات وغير ذلك من الإصابات، كما يساعد أيضاً في حفظ حرارة الجسم. وتزداد كمية الدهن الموجودة فيه بزيادة تناول الطعام. وإذا احتاج الجسم إلى طاقة إضافية فإنه يستهلك هذا الدهن المخزون(Keitaro et al., 2012).

الشعرة Hair

وهي من ملحقات البشرة التي تتركب من الساق والجذر الظاهر فوق الجلد والجذر والجريب، الساق هو الجزء الظاهر فوق الجلد والجذر هو الجزء المنغمس تحت الجلد أما الجريب فهو يحيط بالجذر ويتكون الجذر من طبقات عدة من خلايا طلائية وينتفخ عند نهايته مكونا البصيلة الشعرية ومن ملحقات الجلد الاخرى الاظافرNail والغدد الدهنيةFat glands والعرقية Sweat glands والشكل (2-2) يوضح طبقات الجلد البشري الطبيعي(Keitaro *et al*., 2012).



شكل (2-2):- يوضح طبقات الجلد البشري الطبيعي

2-11:- ميكانيكية دخول طفيلي اللشمانيا الى الخلايا البلعمية ومباغتته للجهاز المناعي

تصاب حشرة أنثى ذبابة الرمل في أثناء تغذيتها على دم الشخص المصاب باللشمانيا الجلدية والحاوي على الطور اللاسوطي Amastigote فبعد وصول وجبة الدم الى القناة الهضمية الوسطى، عندئذ يتحول الطور العديم السوط الى الطور أمامي السوط Promastigote، وينتقل

الى القناة الهضمية الأمامية وهنا تصبح الحشرة ناقلة للمرض، وعندما تتغذى على دم شخص سليم تجد الأطوار أمامية السوط طريقها الى بشرة صحية جديدة ويلتهم الطفيلي من قبل الخلايا البلعمية الكبيرة (Roberts and Janovy, 2005). وإنَّ عملية دخول طفيلي اللشمانيا الى داخل الخلايا البلعمية تبدأ عندما يصبح الطور أمامي السوط بتماس مع غشاء الخلية البلعمية، إذ يحدث ترابطاً مابين المحددات البروتينية السطحيةSurface protein determents التي تتوافر على سطح الطور أمامي السوط المتمثلة بـ Lipophosphoglycan (LPG) وGlyco protein 63 ومستقبلات الخلايا البلعمية ومنها Complement receptor-1(CR1) و Complement receptor-3(CR3) و Factors natural receptor(FNR) و Mononuclear cells factor receptor(MFR) ويساعد هذا الأرتباط على عملية الإستساغة Opsonins ثم البلعمة Phagocytosis فيدخل الطفيلي داخل الخلية البلعمية، ويبدأ بالأنقسام بوساطة الأنشطار البسيط حتى تمتلئ الخلية البلعمية وتنفجر أخيراً وبإمكان الطفيلي أن يهاجم خلايا بلعمية أخرى وينتقل بالدورة الدموية الى كافة أنحاء جسم المضيف الفقري (Soares *et al*., 2004). يمتلك طفيلي اللشمانيا اليات عدة ليحمي نفسهُ من التحلل داخل الخلايا البلعمية ومنها وجود المتآيضات الاوكسجينية Oxygen metabolites وإمتلاكه لبعض الأنزيمات مثل أنزيم الأوكسيد الفائق Super Oxidase وأنزيم الفوسفاتيز السطحي Surface Phosphatase والتي لها القدرة على تثبيط الأنزيمات الحالة Lysozymes (Donovan *et al.*,2010).

وقد أكد Mckerrow (1999) أهمية أمتلاك الطور العديم السوط لأنزيم البروتيز Protease من خلال أثره في كسر اليات الأنظمة الدفاعية بوساطة أنتاج الأمونيا والأمينات الأخرى التي تعمل على تغيير الوسط الحامضي للبلعم الكبير الى وسط أقل حامضية أو تعمل على تثبيط بروتينات الأجسام الحالة التي تكون الظروف المثلى لفعالياتها عند الرقم الهيدروجيني pH=4.2 فتمنع بذلك قتل الطفيلي وتمكنهُ من البقاء والتكاثر, إضافة الى ذلك فإن لأنزيم البروتيز

دوراً مهماً في تغذية الطور أمامي السوط داخل القناة الهضمية للحشرة والطور اللاسوطي داخل الخلايا البلعمية.

12-2:- الأستجابة المناعية ضد اللشمانيا الجلدية

Immune Response Against Cutaneous Leishmaniasis

تتأثر الإستجابة المناعية الموجهة ضد طفيلي اللشمانيا بنوع الطفيلي، سلالته، قابلية المضيف على تكوين الأضداد ضد هذا المستضد فضلاً عن الخلفية الوراثية للمضيف(Singh,2006). تعد الإستجابة المناعية للأصابة باللشمانيا الجلدية معقدة فهي تكون بهيئة إستجابة مناعية خلوية Cellular immune response التي تمثل الخط الدفاع الرئيس في جسم الكائن الحي ضد الأجسام الغريبة وتتوسطها الخلايا التائية المساعدة T helper cells (CD4+) التي تنقسم على نوعين بحسب الوظيفة التي تقوم بها كل نوع خلايا تائية مساعدة من النمط الأول Th1 التي تفرز معظم الحركيات الخلوية Cytokines التي لها أهمية بالغة في مقاومة الإصابة وتضم (IFN- γ)Interferon gamma, Tumro necrosis factor- alpha (TNF-α), Tumro necrosis factor- beta (NF-β) و Interleukine-12(IL-12) والتي تعمل على تنشيط الخلايا البلعمية لتكون أنزيم iNOS2 المحفز على تكوين أوكسيد النتريك NO وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 والأوكسجين الفائق O_2^- جميعها تعمل على قتل الطفيلي العديم السوط داخل الخلايا. أما بالنسبة للخلايا التائية النمط الثاني Th2 تفرز تشكيلة من الحركيات الخلوية تشمل IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 التي تعمل بصورة مضادة للخلايا التائية للنمط الأول Th1 من خلال تثبيطها لفعالية الخلايا البلعمية المساعدة مما تسمح للطفيلي وبالنمو والتكاثر (Awasthi *et al.*,2004). وتعمل الخلايا المتشجرة Dendritic cells على التهام الطفيلي وتحفيز الخلايا المساعدة النمط الأول Th1 التي لها الأثر الكبير في حث الإستجابة المناعية الخلوية خلال المرحلة المبكرة من الأصابة باللشمانيا الجلدية فضلاً عن ذلك تعمل على

إطالة عملية تحفيز الخلايا التائية لأنتاج TNF-γ وIL-12 والذي بدورهِ يؤدي الى تحفيز خلايا القتل الطبيعي(NKs) Natural Killer Cells المهمة في مقاومة الأصابة في وقت مبكر بإنتاجها IFN- γ وقدرتها على أحداث تسمم خلوي Cytotoxicity للطفيلي داخل الخلايا البلعمية بوجود الأجسام المضادة أو غيابها (Awasthi *et al.*,2004). هناك بعض الحقائق التي تؤكد على أثر الخلايا اللمفاوية القاتلة +CD8 في الوقاية ضد الإصابة باللشمانيا الجلدية، وذلك لقابليتها على إنتاج الأنترفيرون كاما IFN- γ ولها دور في شفاء القرح الجلدية من خلال السيطرة على الطفيليات المتبقية في الأنسجة اللمفاوية(Robert, 2006).

وإنَّ الأستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response لداء اللشمانيا الجلدية المتسبب عن طفيليات *L. tropica* و *L. major* تكون ضعيفة على الرغم من أمكانية تكوين أجسام مضادة نوعية ولها دورٌ ثانوي في حماية المضيف، لذا يعتمد بصورة رئيسة على الأستجابة المناعية الخلوية في مقاومة داء اللشمانيا الجلدي، وتحفز الإستجابة المناعية الخلطية بعد حدوث الخمج مباشرة, بحيث تحفز الخلايا التائية الناضجة على تكوين الخلايا البلازمية التي بدورها تنتج تلك الأضداد النوعية وبالأخص الضد IgG , IgM تعرف هذه الحالة بفرط الغلوبيولين المناعي Hyper immmunoagloaglopuline (Bullen *et al.*,2003 ;Ravanbod, 2000) أما نظام المتمم Complement system فهو يمثل أحد أكبر الأجهزة الدفاعية في الجسم، وأن جميع أنواع طفيلي اللشمانيا تنشط المتمم بوساطة المسلك البديل أو التقليدي Alternative pathway المعتمد على غياب الأضداد وأن عملية بلعمة اللشمانيا تستمر بغياب عوامل المصل (Roitt *et al.*,2001). تُسهم الخلية البلعمية في البناء الحياتي للمتمم فإنَّ أحتمالية زيادة المتمم تُعزى الى زيادة النظام اللمفاوي البلعمي خلال مدة الخمج وأن أختزال مستواهُ في المراحل النهائية يُعزى الى ترسبه النسيجي، وبإمكان المتممات قتل الطفيلي بطريقة التحلل التنافذي بتكوين الثقوب

في الجدران المحيطة بجسم الطفيلي فمثلاً المتمم الخامس C5 لهُ القدرة على تحلل أغشية الطفيلي بعد إرتباطهِ بالأضداد IgG و IgM (Bullen *et al.*, 2003).

2-12-1:- الحركيات الخلوية Cytokines

وهي وسائط متعددة الببتيد Polypeptide mediators ذات وزن جزيئي واطىء 10- 23 كيلودالتن وتفرز من أنواع مختلفة من الخلايا كالخلايا المناعية المنشطة والمصابة كإستجابة لحوافز محثة، وترتبط هذه الوسائط بمستقبلات Receptors خاصة تتوافر على سطح الخلية الهدف Target cell وينتج عن ذلك تغيرات كيميائية أحيائية مسؤولة عن نقل إيعازات الى مورثات تلك الخلية لتقوم بدور حيوي معين (Oppenheim *et al.*, 1994; Chapel *et al.*,1999). تؤثر الحركيات بأساليب مختلفة فأما أن تؤثر في الخلية ذاتها المفرزة لهذه الحركيات ويطلق عليها عندئذ بالتأثير الذاتي Autocrine action، وعندما تؤثر في الخلايا المجاورة للخلية المنتجة لهذه الوسائط فتسمى ذات التأثير الجواري Paracrin action، أو تؤثر في الخلايا البعيدة في الجسم وهذا التأثير يكون مشابهاً لتأثير الهورمونات ويسمى بالتأثير الداخلي Endocrine action (Roitt *et al.*, 2001) .

تعمل الحركيات الخلوية على تنشيط منتظم لخلايا خط الدفاع الأول (خلايا البلعمية Phagocytic cells وخلايا القتل الطبيعي ضد الأجسام الغريبة التي تغزو الجسم) والتي بدورها تنشط آليات الدفاع الأخرى فمثلاً يحدث تنشيط الخلايا التائية المساعدة من النوع الأول Th1 بعد تنشيط خلايا البلاعم الكبيرة (Trinchieri, 2014).

وتشمل الحركيات الخلوية كلاً من الحركيات اللمفاوية Lymphokines المفرزة من الخلايا اللمفاوية، والحركيات الوحيدة Monokines المفرزة من خلايا وحيدات النوى Monocytes والبلاعم، والانترليوكينات Interleukines (ILs) المفرزة من كريات الدم البيض Leukocytes والحركيات الكيميائية Chemokines التي تُنتج من انواع مختلفة من الخلايا مثل البلاعم وحيدة

النواة Mononuclear phagocytes ومولدات الالياف Fibroblasts والخلايا البطانية Endothelial cell (Borish and Steinke, 2003 ; Cruse and Lewis, 2000).

وفي الوقت الحاضر، وصف العديد من الحركيات الخلوية وقسمت على ست عوائل Families تشمل الحركيات اللمفاوية، الحركيات الوحيدة، الانترليوكينات (ILs)، الحركيات الكيميائية، الأنترفيرونات (IFNs) وعوامل النمو Growth Factors (GFs) (Cruse and Lewis,2000).

2-12-1-1:- الانترفيرون كاما (IFN-γ)

حركي خلوي مكون من بروتينات سكريةGlycoprotein وأحماض أمينية عددها 142حامضاً أمينياً، ينتمي هذا الى عائلة الأنترفيرونات التي تضم ثلاثة أنواع هي أنترفيرون ألفا (IFN-α) Interferon alpha، والأنترفيرون بيتا (IFN-β) والأنترفيرون كاما (IFN- γ) وتتشابه الأنواع الثلاثة من الأنترفيرونات من ناحية الحجم Size، لكنها تختلف من الناحية المستضدية Antigenically different وصفات أخرى، فالأنترفيرون الفا وبيتا IFN-β, (IFN-α) يقاومان الرقم الهيدروجيني الواطىء Acid stable ويشار اليها بالأنترفيرونات النوع الأول (IFN- γ1)، بينما يشار للأنترفيرون كاما بالأنترفيرون النوع الثاني (IFN- γ2) وهو يتأثر بالأس الهيدروجيني الواطئ Acide liable ولهُ مستقبلهِ الخاص بهِ (Cruse and Lewis,2000). ينتج الانترفيرون كاما (IFN- γ) من قبل الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة من النوع الاول (Th1) وتعد المنتج الأكبر والرئيس لهُ وينتج أيضاً من الخلايا التائية +CD8 ومن الخلايا القاتلة الطبيعية (Baron *et* ; Belosevic *et al*., 1988 *al*.,1991). ومن أهم الوظائف التي يقوم بها هو إشتراكهِ في الدفاع عن الجسم ضد الممرضات بوصفه ممتلكاً خصائص مضادة للفيروسات Antiviral ومضادة للإنقسام Antiproliferative ويعمل على تنظيم المناعتين الخلوية والخلطية كما ان له تأثيراً واسعاً في الفعاليات الخلوية وكذلك

فإنّه يعد منشطاً قوياً للخلايا البلعمية الكبيرة إذ يزيد من قابليتها على تحطيم الكائنات الحية الدقيقة الداخل خلوية في جسم الكائن الحي*In vivo* والخلايا الورمية Tumor cells، منشطاً لكل من الخلايا القاتلة الطبيعية، خلايا الدم البيض العدلةNeutrophils، الخلايا الحمضة Esonophils والخلايا القعدة Basophils والذي يُمكن جسم المضيف من التغلب على الكثير من الممرضات التي تغزوهُ كالفيروسات، أنواع اللشمانيا والبكتيريا فلذلك يعد IFN- γ وسيطاً مهماً في المقاومة ضد الممرضات الداخل الخلوية وأيضاً يعد مؤشراً مهماً لشدة المرض (Schroder *et al*.,2004).

2-12-1-2:- عامل التنخر الورمي ألفا

Tumour Necrosis Factor alpha (TNF-α)

يتكون هذا الحركي الخلوي من بروتينات متعددة الاحماض الأمينية ويكون على نوعين TNF-αو TNF-β وكلاهما ذو دور مميز وفعال في مقاومة المضيف للأمراض وخاصة في الالتهابات الحادة والأصابات الطفيلية وفي الأمراض المعدية (Liew *et al*., 1990). يفرز TNF-α من قبل الخلايا البلعمية الأحادية Mononuclear phagocytes الخلايا العدلة، الخلايا اللمفاوية، خلايا القتل الطبيعي، الخلايا الطلائية، Endothelial cells ومن خلايا البدينة Mast cells بينما يفرز TNF-β من قبل الخلايا اللمفاوية Lymphocytes (Borish and Steinke,2003). ويعمل TNF-αعلى تنشيط الإستجابة المناعية الفطرية بعد إرتباطهِ بالمستقبلات النوع الأول والثاني (TLR, I, II) Toll like receptors التي تميز الممرض عن خلايا المضيف والتي بدورها تحفز الخلايا البلعمية على قتل الممرض داخل الخلايا (Liew *et al.,*1990). يعد TNF-α كعامل مرافق لـ NO فكلاهما يشتركان في القتل داخل الخلايا البلعمية للتخلص من الممرض ولمنع نموهُ وتكاثرهِ بمساعدة أفرازات الخلايا اللمفاوية السمية Cytotoxic T lymphocytes (Roberts, 2006) ويعمل كذلك على تنشيط خلايا

البلاعم على إلتهام العوامل الممرضة وتحليلها والتخلص منها، فلذلك لا يعد قاتلاً مباشراً للممرض وانما يحفز الخلايا البلعمية على التنشيط لتحطيم المورثات الخاصة بالممرض مما يمنع تكاثرهُ داخل الخلايا عن طريق تحفيزها لإنتاج الحركي الخلوي IFN-γ الذي بدورهِ يحفز الخلايا المساعدة التائية Th1 على أنتاج السايتوكينات الأخرى الضرورية في تدمير الطفيلي الغازي (Thompson,1991). ويُسهم IL-6 في تحفيز الخلايا البلعمية على أنتاج TNF-α للقضاء على الأصابة الطفيلية (Tilg *et al*., 2014).

2-12-1-3:- الحركي الخلوي IL-12

يعد الحركي الخلوي IL-12 عاملاً رئيساً في الأستجابة المناعية المكتسبة والفطرية وهو يعود الى عائلة الحركيات الخلوية التي تحتوي على كل من IL-23, IL-27 و IL-35 ذا وزن جزيئي 70kDa يتكون من وحدتين (p35) و(p40) وينتج من قبل الخلايا البلعمية Phagocytic cells ومن الخلايا البائية B cells والخلايا المقدمة للمستضد Antigen Presenting Cell (APC)(2014; Trinchieri,2003). يعرف IL-12 بعدة تسميات أخرى بحسب أرتباط المستقبلات وبنوع الممرض والخلايا التي يعمل على تحفيزها فيعرف بالعامل المحفز لخلايا القتل الطبيعي، وكذلك يطلق عليهِ بإسم عامل تمايز الخلايا التائية T cell differentiation factor (TCDF) عندما يحفز الخلايا التائية من النوع الأول Th1 (Awasthi *et al.,* 2004). يعمل IL-12 على تحفيز الخلايا التائية المساعدة من النوع الاول Th1 وتنشيط السموم الخلوية Cytotoxic للخلايا اللمفاوية التائية، يحفز الخلايا التائية (T cells) وخلايا القتل الطبيعي (NKs) على أنتاج IFN-γ يزيد من النشاطات المضادة للميكروبات Antimicrobial activity كما ان لـهُ دوراً كبيراً في مقاومة العديد من الأمراض الفيروسية والبكتيرية وأمراض السرطانية وأمراض فرط الحساسية Hypersensitivity وأمراض العوز المناعي فضلاً عن مقاومته للأمراض الطفيلية والمناعة الذاتية (Trinchieri, 2014). ويحفز الخلايا التائية المساعدة

من النوع الثاني Th2 على أنتاج الحركيIL-4 الذي يعمل على تثبيط الخلايا البلعمية الكبيرة مما يسمح للطفيلي بالنمو والتكاثر داخلها (Aggarwal *et al*.,2003; Schroder *et al*.,2004; Hamza *et al*.,2010). ويعد جسراً مابين المناعتين الفطرية والمكتسبة بجملة الوظائف البايولوجية والسريرية التي يقوم بها هذا الحركي الخلوي في تحفيزهَ لخلايا الجهاز المناعي ضد أي جسم غريب يدخل الى جسم الكائن الحي (Trinchieri,2014).

2-12-2-4:- الحركي الخلوي IL-17A

هو أحد الحركيات الخلوية التي عرفت حديثاً، وينتج من قبل الخلايا التائية المساعدة-17 T helper-17 (Th-17) (Aggarwal *et al*.,2003). يعملIL-17A على تحفيز كل من الارومة الليفية Fibroblasts، والخلايا الاندوثيلية Endothelial cells، وخلايا الدم البيض العدلة Netrophils، وخلايا البلعمة الكبيرة Macrophages وخلايا البشرة Epithelial cells على أنتاج الوسائط المتعددة الإلتهابية الخلوية Multiple proinflammatory mediators والتي تشمل كل من IL-1 , IL-6 والعامل التنخر الورمي الفا TNF-α، وتصنيع أنزيم أوكسيد النتروجين والحركيات الخلوية الكيميائية Chemokines (Kolls and Linden,2004). فضلاً عن ذلك، له أثر في الحماية ضد البكتريا، الفطريات والاصابات بالحيوانات الابتدائية المتطفلة الأخرى (Matsuzaki and Umemura,2007) وعلى الاغلب يكون IL-17A مرتبطاً بالممرضات التي تسبب الالتهابات المزمنة وأمراض المناعية الذاتية. فقد وجد IL-17A في عينات المصل للمرضى المصابين بالأمراض المزمنة كأمراض الروماتيزم الجهازية Rheumatic disease، الضمور العضلي Multiple sclerosis، مرض التهاب الامعاء Inflammatory bowel disease، داء الربو Asthma والتهاب المفاصل Arthritis (Moseley *et al*.,2003; Hashimoto *et al*.,2005). وضح الباحث Bacellar *et al.* (2009) بأن IL-17A ينتج من خلايا الدم أحادية النوى المحيطية Peripheral blood mononuclear cells

(PBMCs) في اثناء الاصابة باللشمانيا الجلدية واللشمانيا الجلدية المخاطية وخاصة التي يسببها طفيلي *L. braziliensis* ولكن يبقى تركيز lL-17A في مصل المصابين باللشمانيا الجلدية واطىء مقارنة بتركيز الحركيات الخلوية الأخرى مثل IFN-γ, TNF-α و IL-6.

2-12-1-5:- البروتين الكيميائي الجاذب للخلية الوحيدة

Monocyte Chemotactic Protein -1(MCP-1)

يعدّ من الحركيات الخلوية الكيمياوية Chemokines ذات الوزن الجزيئي الواطئ الذي يتراوح مابين 6-8 كيلودالتون، يفرز من قبل الخلايا البلعمية، الخلايا اللمفاوية Monocytes، الخلايا العدلة، الخلايا الحمضة Esoinphils والأرومة الليفية Fibroblasts. ويضم عدداً من الكيموكينات أهمها MCP-1β, MCP-1α التي لها دورٌ في الإستجابات الإلتهابية في بعض الامراض مثل أمراض المناعة الذاتية والإستجابة الدفاعية للمضيف (Borish and Steinke, 2003) ويعمل MCP-1 على جذب الخلايا المناعية الى مناطق الإصابة أينما يتوافر الجسم الغريب ويحفز الخلايا البلعمية التي بدورها تحفز الخلايا التائية من النوع الثاني Th2 وأنتاج بعض الحركيات الخلوية الأخرى مثل IFN-γ , TNF-β و IL-2 التي تتوسط عملية تنشيط وتجميع البلاعم وبالتالي تعمل على تحطيم الطفيلي داخل الخلايا البلعمية (Kumar *et al*.,2010).

2-13:- طرائق التشخيص Methods of Diagnosis

2-13-1:- التشخيص السريري Clinical Diagnosis

يتم التشخيص السريري من قبل أطباء الإختصاص بالأمراض الجلدية وذلك بملاحظة القرح الجلدية التي تبدأ بظهور بثرات حمراء اللون مسطحة على البشرة تمتلك حافات متثخنة متميزة وتدريجياً يزداد حجمها وتتقرح وتتقشر، تظهر بأشكال عدة بحسب نوع الطفيلي المسبب لها (Molan and Faraj, 2010). كما يتم تأكيد التشخيص السريري لداء اللشمانيا الجلدي

بطرائق مختبرية مختلفة، تشمل الفحص المجهري المباشر لمسحات مأخوذة من موقع الإصابة، وزرع العينات المأخوذة من الآفة، أو استخدام الفحوصات المناعية المعتمدة على كشف الأجسام المضادة لطفيلي اللشمانيا في الدم (Markle and Makhoul,2004).

2-13-2:- الفحص المجهري المباشر

The direct microscopic examination

يعدّ المسار الأول عند تشخيص أنواع اللشمانيا الجلدية، وتعتمد على رؤية الطور عديم السوط Amastigote لطفيلي اللشمانيا في المسحات المأخوذة من الدم أو القرحة أو حتى عينات الأنسجة المأخوذة من موقع الإصابة لعمل الطبعات Impression smears بعد تصبيغها بصبغة كمزا Geimsa stain أو صبغة رايت Wright stain (Paniker, 2007; Maheshwari,2008;) ويكون الطور عديم السوط في المسحات مفرداً أو على شكل جماعات داخل الخلايا البلعمية أو منتشراً خارجها نتيجة لتمزقها في أثناء التثبيت والتصبيغ (WHO,1990). وبالرغم من أن الفحص المجهري المباشر هو أسهل الطرائق المستخدمة في التشخيص إلا إنه قد لا يكشف عن الطفيلي في كل المصابين ففي حالة الخمج بقرحة مزمنة تنخفض حساسية الفحص المجهري، وعليه تظهر إمكانية الأعتماد على طرائق أُخرى منها زرع عينات مأخوذة من نسيج قرح اللشمانيا الجلدية.

3-13-2:- طريقة الزرع Culture method

تستند هذه الطريقة على زرع خزع نسيجية أو عينة دم مسحوبة من حافة القرحة الجلدية في أوساط زرعية خاصة بتنمية اللشمانيا الجلدية كالوسط شبه الصلب Seim solid medium وNovy Nicolle MacNeal Medium (NNN) وHockmeyer's medium، بحيث تسمح للطفيلي العديم السوط بالنمو والتكاثر وتحولهِ الى الشكل أمامي السوط بعد توفير

الظروف المختبرية الملائمة لهُ كدرجة حرارة ما بين 23–26 درجة مئوية لمدة تتراوح ما بين 3– 21 يوماً من الزرع للتوصل الى التشخيص الصحيح الذي يؤكد المرض (Paniker,2007; Masmoudi *et al.*,2013).

إنَّ عملية عزل الطفيلي هي عملية متخصصة وحساسة يعتمد نجاحها على نوع الوسط الزرعي المستخدم، وسلالة الطفيلي، وأعداد الطفيلي عديم السوط في النموذج المسحوب، ومصدر العينة وخبرة فني المختبر، فضلاً عن النظافة القصوى لتجنب حدوث تلوث (Sidding *et al.*,1998). عندما تكون الطفيليات بأعداد قليلة، فعندئذ الطرائق المباشرة في التشخيص غير مفيدة وعليه لابد من الاعتماد على الطرائق الجزيئية المتمثلة بـPCR والطرائق المناعية التي تتم بحثاً عن الاجسام المضادة أم المستضدات الخاصة بالمسبب المرضي في مصول المرضى (Boggild *et al*., 2010).

2-13-4:- الطرائق المناعية Immunological Methods

2-13-4-1:- الإختبار الجلدي Skin test

ويسمى أيضاً بإختبار لشمانLeishmanin's test أو إختبار مونتينيكرو Montenegro's test وتتميز النتيجة الموجبة لهذا الفحص بظهور فرط حساسية متأخر لمستضدات اللشمانيا المحقونة في الجلد (Maheshwari, 2008). ويظهر هذا الإختبار خصوصية وحساسية عالية للكشف عن الأشخاص المصابين باللشمانيا الجلدية واللشمانيا الجلدية –المخاطية واللشمانيا الجلدية ما بعد الاحشائية في حين تقل خصوصيته وحساسيته مع الإصابة باللشمانيا الجلدية المنتشرة والاحشائية، إذ تكون النتيجة سالبة فلذلك لا يعول على هذا الاختبار بشكل واسع في تشخيص الأنواع المختلفة لجنس اللشمانيا (WHO,1984; Zjlstra*et al.*, 2001).

2-14-4-2:- إختبار التلازن المباشر Direct Agglutination Test (DAT)

وهو من الاختبارات السريعة العالية الحساسية والخصوصية للكشف عن مستضدات اللشمانيا، ويعتمد هذا الإختبار على استخدام مستضد الطفيلي ومزجهُ مع المصل المصاب المراد الكشف عن وجود الاجسام المضادة فيه (Singh,2006). وقد أعطى الفحص نتيجة موجبة في اللشمانيا الجلدية واللشمانيا الجلدية المنتشرة والأحشائية وبإمكانه تحسس المستويات القليلة من الأجسام المضادةفي وقت مبكر من حدوث الإصابة ويمكن استخدامه في الدراسات الوبائية (Schoone *et al*., 2001)

2-13-4-3:- أختبار التلازن الزجاجي Latex Agglutination Test (LAT)

يعد من الأختبارات المصلية البسيطة، يستخدم فيها مستضد اللشمانيا الذائب المرتبط مع جزيئات اللاتكس وبالتالي يتم التحري عن وجود الأجسام المضادة للشمانيا فعندما تكون النتيجة موجبة يحدث التلازن، ويعد هذا الأختبار من الاختبارات الحساسة والسريعة وعالية الخصوصية في التحري عن اللشمانيا بحيث تتراوح حساسيتهُ بين88- 93% (Cummins *et al*., 1994).

2-13-4-4:- إختبار الضد المتألق المناعي

Immunoflorescent Assay Test (IFAT)

ويسمى أيضاً إختبار التألق المناعي غير المباشر Indirect Florescent Antibody Test، يعد من الإختبارات المناعية المستخدمة بشكل واسع في تشخيص مرض اللشمانيا؛ لأنه يحدد الاجسام المضادة المتكونة ضد المستضد الموجود على سطح الطفيلي (Vidigal *et al*., 2008). وتعتمد كفاءة هذا الاختبار على نوع المستضد المستخدم في الكشف عن الاجسام المضادة ويسمح بالتمييز بين المواقع المستضدية كالجدار الخلوي والجسيم الحركي Kintoplaste وبصورة عامة ينجز هذا الفحص بكل سهولة وبساطة وتقدر حساسيته87 -100% (Sundar *et al*., 2002).

2-13-4-5:- أختبار الامتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم

Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

من الطرائق الحديثة وذات الحساسية العالية لتشخيص اللشمانيا الجلدية والاحشائية، وتعتمد كفاءة هذا الاختبار على نوع المستضد المستخدم فيه، ويستخدم لتعليم المستضدات والاجسام المضادة بوساطة الانزيمات (Mohammad *et al*.,1985). ويعد هذا الاختبار من أكثر الطرائق التشخيصية حساسية وخصوصية فضلاً عن سهولة الاستخدام (De Doncker *et al*.,2005; Reithinger and Dujardin, 2007).

14-2:- تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل

Polymerase Chain Reaction (PCR)

وهو من أحدث الطرائق الجزيئية المستخدمة في الكشف عن طفيلي اللشمانيا في الدم والعقد اللمفاوية والطحال والقشور والخزع النسيجية المأخوذة من القرح اللشمانيا الجلدية من خلال معرفة تتابع الحامض النووي DNA وبذلك يمكن التمييز بين أنواع جنس اللشمانيا (Salora *et al*.,2001). ويعد من الاختبارات التي تكشف عن المرض وبأعداد قليلة من الطفيلي وذو أمكانية تفريقية عالية في معرفة أنواع اللشمانيا الجلدية والاحشائية وأكثر حساسية من إختبارات الأخرى في تشخيص اللشمانيا الجلدية بأنواعها وتمييز بعضها عن البعض الاخر (Mary*et al*.,2004).

15-2:- العلاج Treatment

يهدف العلاج بصورة رئيسة الى شفاء المريض من الإصابة باللشمانيا بأنواعها المختلفة ومنع حدوثالإنتكاسات وتنمية قدرة المريض على مقاومة المرض ولكي يتحقق ذلك يلزم إعطائه العلاج الملائم إعتماداً على نوع الطفيلي، الحالة المرضية ومناعة الشخص المصاب (WHO,2014). وهناك العديد من المركبات الكيميائية اسهمت في معالجة أنواع اللشمانيا الجلدية، حيث استخدم مركبات الانتموني خماسية التكافؤ Pentavalent antimonite والتي

تضم كل من البنتوستام ستيبوغلونات الصوديوم Sodium stibogluconate (pentostam) والكليوكنتيم Glucantime اللذين يحتويان على 100 ملغم من الانتيمون خماسي التكافؤ لكل ملليتر، إذ يُعطى العلاج بالزرق الموضعي حول الآفة (Molan and Faraj,2010). وأغلب العلاجات المستخدمة بشكل واسع هي Antimonals، الباروماسين Paromomycin، العلاج الفموي بأستخدام Miltefosine وفضلاً عن ذلك يستخدم كل من Lmiquimod وIFN-γ كعوامل مناعية Immunomodulatory agent تساعد في معالجة اللشمانيا الجلدية (Roberts,2006). وأكد Neal *et al.* (1987) أن مركبات Diamidine كل من Pentamidine وHydroxy stilbamidine ومركبات Polyene macrolide مثل Amphotericin B تمثل جميعها الخط العلاجي الثاني للشمانيا. ومن المركبات الكيميائية الأخرى التي حققت نجاحاً كبيراً في علاج اللشمانيا الجلدية استخدام مركبات Aminosidine كعقار Paramycine إذ أثبت دوره الفاعل في شفاء الآفات الجلدية التي تسببها *L. major* و *L. tropic* الا أن تكاليفه العالية وندرة أنتاجه أدى الى عدم أنتشار هذا العلاج الناجح (Berman,1997). واستخدم Corware *et al.* (2011) عقار Amphotericine B- polymethacrylic acid (AmB-PMA) لمعالجة اللشمانيا الجلدية. وممكن ان يستخدم محلول كويناكرين Quinacrine (أتبرين Atabrine) بتركيز 10% محقوناً حول الآفة بمعدل 2 ملليتر على فترات أسبوعية، كما سجلت نتائج جيدة عند استخدام كبريتات البربرين Berberine sulfate بتركيز 2% فضلاً عن استخدام ثاني أوكسيد الكاربون الصلب (الثلج الجاف Dry-ice) استخداماً مباشراً فوق الآفة (Beck and Davies,1981). بما أن اللشمانيا الجلدية مقتصرة على الجلد فإن المداواة الموضعية Tropical therapy هي علاج كافٍ وكفوء لمعالجة الإصابة مع مراعاة جانب العناية لمنع الإصابات الثانوية (Bosan *et al.*,2002). استخدمت طرائق فيزيائية أخرى لعلاج اللشمانيا الجلدية، من ضمنها الكشط وعمليات الاستئصال

Curettage and surgical excision التي تتم عن طريق كشط البثرة الظاهرة على سطح البشرة وتحت التخدير الموضعي وباستخدام الطيات الجلدية Skin flaps في علاج الندب المشوهة(Weigel and Armijos, 2001). ومن الطرائق الفيزيائية الأخرى التطبيق الحراري Heat Application وذلك بتأثر اللشمانيا بالدرجات الحرارة العالية فيتم القضاء عليها عند درجة حرارة 37 درجة مئوية (Berman and Nera,1981). لاحظ Junaid (1986) شفاء الآفات الجلدية للمصابين باللشمانيا الجلدية خلال (5- 6) أسابيع عند تعرضها للأشعة تحت الحمراء بدرجة حرارة (55) درجة مئوية لمدة خمس دقائق فسميت حينئذ بالمداواة بالاشعة Radiotherapy.

الفصل الثالث CHAPTARE THREE

3- المواد وطرائق العمل MATERIALS AND METHODS

3-1:- الأجهزة والمواد والعدد المختبرية المستخدمة

3-1-1:- الاجهزة المستخدمة Instruments

لقد تم استخدام عدد من الأجهزة في الدراسة الحالية المبينة في الجدول 3-1 :-

جدول (3- 1):- الأجهزة المستخدمة والشركات والدول المنتجة لها

أسم الجهاز		الشركة Company	الدولة Country
ثلاجة	Refrigerator	Marubeni	Japan
جهاز الطرد المركزي	Centrifuge	Kokusan	Japan
نظام الاليزا	ELISA system	Biotic	USA
ميزان حساس	Sensitive balance	Mettler	Switzerland
مشراح دوار	Rotary microtome	Tennum	China
مجهر ضوئي	Light microscope	Olympus	Japan

Japan	Daikyo	Autoclave موصدة
Germany	Memmert	Cooling Incubator حاضنة مبردة
Germany	Memmert	Electric Oven فرن كهربائي
Germany	Sartoius	ميزان إلكتروني حساس Sensitive Electronic Balance
Germany	Memmert	Water bath حمام مائي
Germany	Memmert	جهاز قياس الأُس الهيدروجيني Microprocessor pH meter

3-1-2:- المستلزمات المختبرية الطبية المستخدمة

استخدمت في الدراسة الحالية مجموعة من المستلزمات المختبرية والمواد الكيميائية المختلفة وقد تم توضيحها في الجدول 3- 2:-

جدول (3-2):- المستلزمات المختبيرية الطبية والشركات والدول المنتجة لها.

أسماء المستلزمات المختبرية	الشركة Company	الدول Country
محاقن نبيذة حجم 5 ml Disposable syringes	Changzhou	China
محاقن نبيذة بحجم 1 ml/cc Disposable syringes	Suzhou Dukanging	China
محاقن نبيذة حجم 10ml Disposable syringes	Hengchun	China
أنابيب إختبار Sterile tube Gel clot Activator	Citoclase	China
أنابيب أبندورف Eppendorf tubes	EAIPF	Germany
قمم نبيذة Disposable tips	Gilson	France
ماصات دقيقة Micropipettes	Sugiton	Japan
أنابيب بلاستيكية حجم 10ml Plain tubes	AFMA	Japan

China	Citoclase	Slides شرائح زجاجية
China	Apel	Cover slide أغطية شرائح
China	Wuhan	حاوية بلاستيكية Container بأحجام مختلفة
China	Huangzhou	Gauze Swab شاش
Turkey	Kardelen	Medical Cotton قطن طبي

1- 3:- المواد الكيميائية المستخدمة

استخدمت في الدراسة الحالية مجموعة من المواد الكيميائية كما موضح في الجدول أدناه:-

جدول (3-3):- المواد الكيميائية والشركات والدول المنتجة لها.

أسم المادة الكيميائية Name of chemical	الشركة Company	الدولة Country
كحول طبي بتركيز 70% Medical Alcohol	SAmara	Iraq
محلول ملحي بتركيز 0.9% Normal saline	El-Saad pharma	Syria
كلوريد الصوديوم Sodium chloride	Himada	India
كلوريد البوتاسيوم Potassium chloride	Himada	India
بيكاربونات الصوديوم الهيدروجينية Sodium hydrogen bicarbonate	Himada	India
كلوريد الكالسيوم Calcium chloride	Himada	India
د-كلوكوز D-Glucose	Himada	India
بيبتون Peptone	Himada	India
أكار Agar	Himada	India
خلاصة لحم البقر Beef extract	Himada	India
مضادات حياتية نوع Gentamycin	Samara	Iraq

India	Quallcaic	Haematoxylin	الهيماتوكسلين
U.K.	Hayman	Absolute alcohol	كحول مطلق
England	BDH	$Al_2(SO_4)_3.2H_2O$	كبريتات الألمنيوم المائية
England	BDH	Mercuric oxide	أوكسيد الزئبقيك
U.K.	GCC	Glacial acetic acid	حامض الخليك الثلجي
England	BDH	Ethyl eosin	أيوسين الكحولي
Iraq	شركة طيبة/ بغداد	Ethanol alcohol	كحول الأيثانول
India	Himada	Methanol	كحول المثيلي
Iraq	شركة طيبة/ بغداد	Formalin	الفورمالين
China	SCR	Xylene	الزايلين
Iraq	Al-Exandria wax	Albaraffien wax	شمع البارافين
England	BDH chemical Ltd	Canada balsam	بلسم كندا
India	Himada	Giemsa	صبغة كمزا
England	BDH chemical Ltd	Glycerin	كليسرين
India	Himada	Sodium bicarbonate	بيكاربونات الصوديوم

3-1- 3:- العِدد المختبرية Laboratory Kits

استخدمت في الدراسة الحالية مجموعة من العدد المختبرية كما في الجدول أدناه:-

جدول (3-4):-العِدد المختبرية والشركات والدول المنتجة لها.

الدولة	الشركة	العدة المختبرية Laboratory Kit
U.S.A	Peprotech	**Human Interferon –gamma (INF-γ) ELISA kit**
U.S.A	Peprotech	**Human Tumor Nicross Factor-alfa (TNF-α) ELISA kit**
U.S.A	Peprotech	**Human Interleukin-12 ELISA kit**

U.S.A	Peprotech	**Human Interleukin-17A ELISA kit**
U.S.A	Peprotech	**Human Chemokine MCPI-1ELISA kit**

3-2:- موقع الدراسة Study place

أجريت الدراسة الحالية على المصابين بداء اللشمانيا الجلدي والمراجعين لوحدة الأمراض الجلدية في مستشفى بعقوبة العام التعليمي، مستشفى المقدادية، والمركز الصحي وبعض عيادات الخاصة في ناحية المنصورية وتوزعوا على مختلف أقضية محافظة ديالى ومنها بعقوبة وبلدروز والمقدادية والخالص و بهرز.

3-3:-جمع المعلومات The data collection

تم جمع المعلومات من المرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدي بعد أن شخصت لديهم الإصابة من قبل اطباء إختصاص الجلدية والمعالجين بحسب جلسات العلاج. إذ أعُدت لذلك إستمارة إستبيان لتسجيل المعلومات المطلوبة والتي شملت الاسم والجنس والعمر والمهنة ومكان السكن وموقع الإصابة وعدد القرح وحجم القرحة الجلدية ونوع العينة المأخوذة كما موضحة في (ملحق 1).

3-٤:- جمع العينات Samples Collection

جمعت عينات الدراسة الحالية والتي شملت (عينات الدم، المسحات والخزع النسيجية) خلال المدة المحصورة ما بين تشرين الاول 2013 ولغاية نيسان 2014. فشملت 115 مصاباً باللشمانيا الجلدية بواقع 50 ذكراً و 65 أنثى، تراوحت أعمارهم من 3 أشهر إلى 76 سنة. تمت عملية تشخيص المرض وتحديده من قبل أطباء الجلدية، كما اشتملت الدراسة أيضاً على مجموعة أخرى تضمنت الأشخاص غير المصابين وتم التأكد من عدم أصابتهم بأي مرض جلدي أو مزمن أو أي أمراض أخرى من خلال طرح الأسئلة، وعدُت هذه كمجموعة سيطرة وبلغ عددهم 25 فرد.

3-٤-1:- جمع عينات الدم Collection of blood samples

تم سحب 5 مل من الدم الوريدي لكل من الأشخاص المصابين، المعالجين والسيطرة باستعمال محقنة نبيذة، وضعت عينات الدم في أنابيب إختبار وترك الدم ليتجلط بدرجة حرارة الغرفة (20- 25)ْ م ثم فصل المصل Serum بجهاز المنبذة Centrifuge بسرعة 3000 دورة في الدقيقة، قُسم المصل على خمس أقسام ووضع في أنابيب أبندورف Eppendorf tube بمعدل 0.5 مل لكل أنبوبة ثم حفظت النماذج بالتجميد عند -20 ْم الى حين إجراء الفحوصات المناعية اللاحقة.

3-5:-الفحوصات السريرية

تم إجراء الفحص السريري للمرضى من قبل الأطباء أخصائي الأمراض الجلدية في المستشفيات والعيادات المختلفة وشخصت الإصابة إستناداً الى الأعراض السريرية والصفات المظهرية المتميزة للأخماج الجلدية (حبة بغداد) وتُمييز أنواعها الجافة والرطبة.

3-6:- الفحوصات المختبرية

3-6-1 :- طريقة الطبعات Impression Method

استخدمت هذه الطريقة للكشف على طفيلي اللشمانيا عديم السوط Amastigote في الطبعات المباشرة من القرح الجلدية بعد تصبيغها بصبغة كمزا Giemsa stain التي حُضرت بحسب طريقة Garcia and Ash (1979) بمزج 1 غرام من مسحوق صبغة كمزا مع 50 مل كليسرين ثم وضع الخليط في قنينة محكمة الغلق ذات لون داكن ووضعت في حمام مائي بدرجة 60 °م لمدة ساعتين مع التحريك كل نصف ساعة، ترك الخليط ليبرد ثم أضيف اليهِ 50 مل من الكحول المثيلي بتركيز 95% تدريجياً مع التحريك المستمر بعد ذلك رُشحت الصبغة بوساطة ورقة ترشيح (No.1) ثم حفظت في مكان مظلم بدرجة حرارة الغرفة لحين استعمالها للتصبيغ. وتم عمل الطبعات على الشرائح الزجاجية بحسب طريقة (Evans *et al*.,1989) كالآتي:- تعقم منطقة الاصابة أولاً باستخدام كحول طبي بتركيز 70% وتوخز القرحة من حافتها ومن مواقع عدة باستخدام محقنة طبية معقمة يخرج الدم من موضع الجرح أو الخدش وبالضغط الخفيف بوساطة الشريحة الزجاجية على مكان الجرح فسرعان ما نحصل على مسحة تفرش العينة جيداً على الشريحة الزجاجية باستخدام شريحة زجاجية نظيفة أخرى، ثم تترك لتجف بدرجة حرارة الغرفة ومن ثم يتم تصبيغها بصبغة كمزا Giemsa stain وحسب الطريقة التالية :-

1- تثبت المسحة بالكحول المثيلي المطلق لمدة دقيقة واحدة، وتترك لتجف على الشريحة.

2- تغمر الشريحة في المحلول صبغة كمزا المخفف (بإضافة 10 مل من ماء المقطر ذي حامضية pH 7.2 الى واحد مل من محلول الصبغة) وتترك لمدة 30 دقيقة.

3- تغسل الشريحة بالماء الجاري من الحنفية لإزالة الصبغة الزائدة، ثم توضع بشكل مائل لتجف.

4- واخيراً تفحص الشرائح المصبوغة مجهرياً بتكبير 40X و 100X لملاحظة الطور عديم السوط داخل الخلايا البلعمية.

3-6-2 :- الزرع Culture

3-6-2-1:- الوسط الزرعي الهلامي (شبه صلب) Semi Solid Medium

أستعمل هذا الوسط بوصفه مزرعة أولية لتنمية وإدامة الطور أمامي السوط في المختبر بحسب طريقة Adler and Theodor (1927) وتشمل محتويات الوسط في اللتر الواحد ما يأتي:-

المادة	الوزن بالغرامات
- كلوريد الصوديوم Nacl	6.91 غرام
- كلوريد البوتاسيوم KCl	0.29 غرام
- بيكاربونات الصوديوم NaHCO3	0.1 غرام
- د-كلكوز D-Glucose	0.77 غرام
- كلوريد الكالسيوم CaCl2	0.22 غرام
- بيبتون Pepton	1 غرام
- أكار Agar	4 غرام
- خلاصة لحم البقر Beef extract	0.3 غرام
- دم أرنب خالي من الفايبرين Defibrinated Rabbit Blood	200 مليلتر
- مضادات حياتية (جنتاميسين) Gentimycine	25 مليلتر
- ماء مقطر Distilled Water	800 مليلتر

***تحضير الوسط الهلامي (شبه الصلب) Semi Solid Medium**

تم إذابة المواد المشار إليها أعلاه في الماء المقطر عدا المضادات الحياتية و دم الارنب الخالي من الفايبرين وعدل الأس الهيدروجيني الى 7.4 لكونه الأمثل لنمو الطفيليات، ثم عُقم المحلول بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 ْم وضغط 1 جو لمدة 20 دقيقة. وترك

الوسط المعقم ليبرد، ثم أضيف اليه كل من المضادات الحياتية ودم الأرنب الخالي من الفايبرين الذي حُضر بسحب 10 مل دم من قلب الأرنب بمحقنة طبية معقمة ونقل في قنينة زجاجية معقمة حاوية على كرات زجاجية صغيرة Small glass beads رجت القنينة بشكل دائري لمدة 3 دقائق لفصل الفايبرين. ومزج الوسط جيداً ووزع في قناني زجاجية معقمة بمقدار 4 مل لكل قنينة. ثم حضنت القناني بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة للتأكد من خلوها من التلوث ثم وضعت في الثلاجة بدرجة 5°م لحين الاستعمال.

3-6-2-2:- طريقة الزرع Culture Method

تم الحصول على دم موضعي من خلال حقن 0.3 مل من محلول الملحي المعقم بتركيز 0.9% Sterile saline solution عند حافة القرحة الجلدية كما في الشكل 3-1 وبالوقت نفسه من الحقن تم سحب الدم الموضعي الحاوي على الطور عديم السوط لطفيلي اللشمانيا الجلدية وحقنها داخل القناني الحاوية على الوسط الزرعي الهلامي (شبه الصلب) Semi solid medium ثم حفظ بدرجة حرارة 26°م لمدة 10 أيام لتنمية طفيلي اللشمانيا الجلدية بالطور أمامي السوط Promastigote.خلال هذه الفترة حُضر محلول لوك Lock's solution الذي يستخدم للمحافظة على حيوية الطفيلي بعدما ينمو على الوسط شبه الصلب بحسب طريقة Dawson *et al*. (1969) وفيما يأتي المكونات في اللتر الواحد:-

المادة	**الوزن بالغرامات**
- كلوريد الصوديوم NaCl	9 غم
- كلوريد البوتاسيوم KCl	0.42 غم
- بيكاربونات الصوديوم	0.2 غم
- د-كلوكوز D-Glucose	2 غم
كلوريد الكالسيوم المائي $CaCl_2.2H_2O$	0.32 غم

- المضاد الحيوي Gentamycin 10 مل

- ماء مقطر Distilled Water 1000 مل

أُخذت قطرات من محلول اللوك الغني بالطفيليات باستخدام لوب معقم ووضعها على شريحة زجاجية وفحصت تحت المجهر الضوئي لمشاهدة الأطوار أمامية السوط لطفيلي اللشمانيا الجلدية الذي يكون مغزلي الشكل ذا نواة مركزية وجسم حركي يمتد منهُ سوط حر بطول الجسم (Singh,2006).



شكل (٣-١): أخذ الدم الموضعي من حافة القرحة الجلدية.

3-6-3 :-الدراسة النسجية Histological study

إذ تم أخذ الخزع النسيجية الجلدية Skin biopsies من حافة القرحة (مع تجنب المناطق المُتقيحة) إذ عقمت المنطقة بكحول 70 % وأستخدم المخدر Xylocaine بتركيز 2% لتقليل الألم وكان قياس كل خزعة 4 ملمتر تقريباً وفيما يلي طريقة التحضير:-

3-6-3-1:- المحاليل والصبغات المستخدمة Solutions and Stains

A- صبغة هيماتوكسلين وأيوسين Hematoxylin and Eosin

حُضرت صبغة هيماتوكسلين بحسب طريقة Bancroft and Stevens (1975) كالآتي:-

2.5 غرام من مسحوق الهيماتوكسلين Haematoxylin

25 مليلتر من كحول مطلق Absolute Alcohol

50 غرام من كبريتات الالمنيوم البوتاسيوم المائية (الشب) $KAl(SO_4)_2.12H_2O$

500 مليلتر من ماء مقطر Distilled Water

1.25 غرام من أوكسيد الزئبق Mercuric Oxide

20 مليلتر من حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic Acid

أذيب مسحوق الهيماتوكسلين في الكحول وأضيف اليه الشب المذاب مسبقاً في الماء الساخن ثم سخن المزيج الى درجة الغليان وعندما أضيف اليه أوكسيد الزئبق تحول لونهُ الى اللون الأرجواني الغامق. وبرد المحلول بسرعة تحت ماء الحنفية وقطع الثلج، وبعد ذلك أضيف اليه حامض الخليك الثلجي ثم رشح قبل الأستخدام.

وحُضرت صبغة الأيوسين الكحولي وفقاً لطريقة Rosenblatt (2009) كما يلي:-

1 غرام من مسحوق الايوسين الكحولي Ethyl Eosin

99 مليلتر من كحول الأيثانول بتركيز 70% Ethanol

0.2 مليلتر من حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic Acid

B- محلول الفورمالين 10% Formalin Solution

تم تحضير هذا المحلول بإضافة 90 مليلتر من ماء الحنفية الى 10مليلتر من الفورمالين بتركيز 40% (Bancroft and Stevens, 1996).

أُجريت دراسة نسجية مرضية للقرح الجلدية الناجمة عن الإصابة باللشمانيا الجلدية من خلال عمل المقاطع النسجية للخزع النسجية على وفق الطريقة الآتية (Nasrabadi *et al.*, 2011) :

1- تثبيت العينات Sample Fixation

أستخدم محلول الفورمالين 10% إذ تم تثبيت الخزع النسيجية لمدة 24 ساعة فيه وتركت الى حين البدء بعملية الأنكاز.

2- الأنكاز Dehydration

غسلت العينات بالماء الجاري وتركت لمدة 30 دقيقة قبل البدء بعملية الإنكاز تم إنكاز العينات بسلسلة تصاعدية من الكحولات 50% , 70% , 90% و 100% ولمدة ساعة لكل تركيز.

3- الترويق Clearing

روقت العينات بالزايلين Xylene لمدة ساعة.

4- الإرتشاح والأسجاء Infiltration and Embedding

وضعت العينات المروقة في الشمع البارافيني المنصهر درجة إنصهاره (56– 58)°م. تم إرتشاح العينات بشمع البارافين على أربع مراحل ولمدة ساعة لكل مرحلة، وأخيراً تم إسجاء العينات بالشمع نفسه داخل قوالب خاصة .

5-التشذيب والتقطيع Trimming and Sectioning

شذبت قوالب الشمع الحاوية على النماذج بمشرط حاد وثبتت على حامل خشبي ثم قطعت النماذج باستخدام المشراح الدوار Rotary Microtome بسمك (5 – 7) مايكروميتر.

وضعت الأشرطة المقطوعة والمتسلسلة على ورق مقوى رتبت بالتسلسل الصحيح مع مراعاة وضع سطحه اللماع الى الأسفل، وضعت بضع قطرات من مزيج أح ماير والماء المقطر بنسبة 0.5: 100 مل على شرائح زجاجية نظيفة ومرقمة وحملت عليها. الأشرطة المقطوعة بطول ثلاثة سنتمتر لكل شريط مع الحفاظ على تسلسلها ووضع سطحها اللماع الى الأسفل. وضعت الشرائح فوق صفيحة كهربائية ساخنة Electric Hot Plate درجة حرارتها 27 مْ لأجل فرش المقاطع النسيجية وتركت لتجف لمدة 24 ساعة.

6- التصبيغ Staining

لونت الشرائح باللون المزدوج هيماتوكسلين – أيوسين لإظهار التراكيب العامة للنسيج على وفق ما جاء في Humason (1979) كالآتي :-

أُزيل الشمع من الشرائح باستخدام الزايلين وعلى مرحلتين ولمدة 30 دقيقة لكل مرحلة، ثم مررت بسلسلة تنازلية من الكحول الأثيلي إبتداءً 100% و90% و80% و70% و50% ثم ماء الحنفية ولمدة دقيقتين لكل مرحلة، أعقب ذلك وضع الشرائح في محلول هارس هيماتوكسلين لمدة (4 – 10) دقائق. جرى بعد ذلك غسلها بالماء الجاري لمدة 5دقائق للحصول على أفضل زرقة، ثم ميزت المقاطع بكحول حامضي لمدة ثانيتين لإزالة الصبغة الفائضة. غسلت الشرائح بالماء الجاري لمدة 5 دقائق الى حين عودة الزرقة للمقاطع ثم مررت بسلسلة من الكحولات التصاعدية (50% و70%) لمدة دقيقتين لكل تركيز وبعد ذلك لونت بمحلول الأيوسين الكحولي لمدة 5 دقائق. مررت الشرائح بسلسلة تصاعدية من الكحول الأثيلي (80% و90%) غطسة واحدة لكل تركيز ثم وضعت بالكحول المطلق على مرحلتين ولمدة 5 دقائق لكل مرحلة. أعقب ذلك ترويقها بالزايلين وعلى مرحلتين ولمدة 30 دقيقة لكل مرحلة.

7- التحميل Mounting

حملت الشرائح باستخدام بلسم كندا Canada Balsam ووضعت فوقها أغطية زجاجية ثم وضعت على صحيفة ساخنة درجة حرارتها 37°م لتسريع جفافها.

8- الفحص Examination

فحصت الشرائح المجهرية بالمجهر الضوئي المركب Compound Light Microscope، ولوحظت التغيرات المرضية التي طرأت على الأنسجة المصابة.

3-7:- قياس مستويات الحركيات الخلوية والتي شملت كل من INF-γ, TNF-α, IL-12, IL-17A و MCP-1 في المصل

لمعرفة أهم التغيرات المناعية المصاحبة للأصابة لدى المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية والمعالجين من الأصابة، فقد تضمنت الدراسة الحالية قياس مستويات بعض الحركيات الخلوية في مصل المصابين والمعالجين ومجموعة السيطرة (غير المصابة) والتي شملت كل من IFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-17A و MCP-1 وذلك باستخدام طريقة الاليزا (الأمتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم) Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) والمعتمدة على مبدأ تغير اللون الناتج عن إرتباط الأضداد النوعية بالمستضد.

3-7-1:- محتويات العدة Kit Contents

صفيحة المعايرة القياسية الخاصة بقارئ الاليزا Microtiter plate

محلول غسل الدارئ Wash buffer solution

محلول أسر جسم المضاد Captuer antibody solution

محلول كشف جسم المضاد Detection antibody solution

محلول الأقتران Conjugate solution

محلول التخفيف Diluent solution

محلول قالب الدارئ Block buffer solution

المحلول القياسي Standard solution

محلول المادة الأساس Substrate solution

2-7-3 :- مبدأ الأختبار Principle of test

استعملت طريقة الأمتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم لقياس مستويات الحركيات الخلوية كل من INF-γ , TNF-α , IL-12 , IL-17A والحركي الكيمياوي MCP-1 في مصول المرضى وعينة السيطرة والمنتجة من قبل الشركة الأمريكية Peprotech، عكس هذا الإختبار استخدام أضداد نوعية خاصة بهذه الحركيات الخلوية تغطى بها جميع حفر صفيحة المعايرة الدقيقة وتحضن لليلة كاملة، وفي اليوم التالي تغسل صفيحة المعايرة الدقيقة وتضاف للحفر المحاليل القياسية والعينات وبحسب الخطوات المثبتة في طريقة العمل للشركة المنتجة وعند أكتمال الخطوات يقاس التغيير اللوني الناتج بوساطة جهاز قارئ الاليزا وعلى الطول الموجي 405 نانومتر .

3-7-3:- طريقة العمل Method

قبل إجراء التجربة لكل من الحركيات الخلوية INF-γ , TNF-α , IL-12 , IL-17A و MCP-1 وضعت كل المحاليل والعينات بدرجة حرارة الغرفة 18- 25 م° لمدة 30 دقيقة قبل بدء الإختبار كما موضح في طريقة عمل العدِة ثم أجريت الخطوات الآتية:-

1- تم تخفيف مواد عدة الإختبار بحسب تعليمات الشركة المرفقة لكل عدة وباستخدام المحلول الدارئ المناسب بحسب عدد الصفائح المستخدمة لكل كشف.

2- أضيفت 100 مايكروليتر من المحلول الأسر للجسم المضاد Capture antibody إلى كل حفر الصفيحة، وغطيت الصفيحة بغطاء خاص، وحُضنت في مكان مظلم بدرجة حرارة الغرفة لليلة كاملة.

3- غُسلت الصفيحة بمحلول الغسل في اليوم التالي لإزالة مزيج الحضن ولأربع مرات متتالية (حضر محلول الغسل بإضافة 50 مل من محلول الغسل الى 950 مل من ماء المقطر) ثم قُلبت الصفيحة على ورق نشاف للتجفيف.

4- أضيف إلى كل حفر الصفيحة 300 مايكروليتر من محلول القالب الدارئ وغطيت الصفيحة بغطاء لاصق، وحضنت لمدة ساعة كاملة.

5- أزيل مزيج الحضن وغسلت الصفيحة أربع مرات متتالية بمحلول الغسل كما في الخطوة 2 ونقرت الصفيحة على ورق النشاف للتجفيف.

6- أضيفت المحاليل القياسية Standard solutions والتي كانت تراكيزها (15 , 31 , 62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000 , 2000) بيكوغرام لكل مل بالنسبة لكل من TNF-α, IFN- γ , IL-12. أما بالنسبة للحركي الخلوي IL-17A والحركي الكيمياوي MCP-1 فكانت التراكيز القياسية هي (7.8 , 15.6 , 31.25 , 62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000) بيكوغرام لكل مل وعادة ما يتحدد الصف الأول من صفيحة المعايرة موقعاً لهذه المحاليل القياسية التي تستخدم لرسم المنحني القياسي الخاص بكل إختبار.

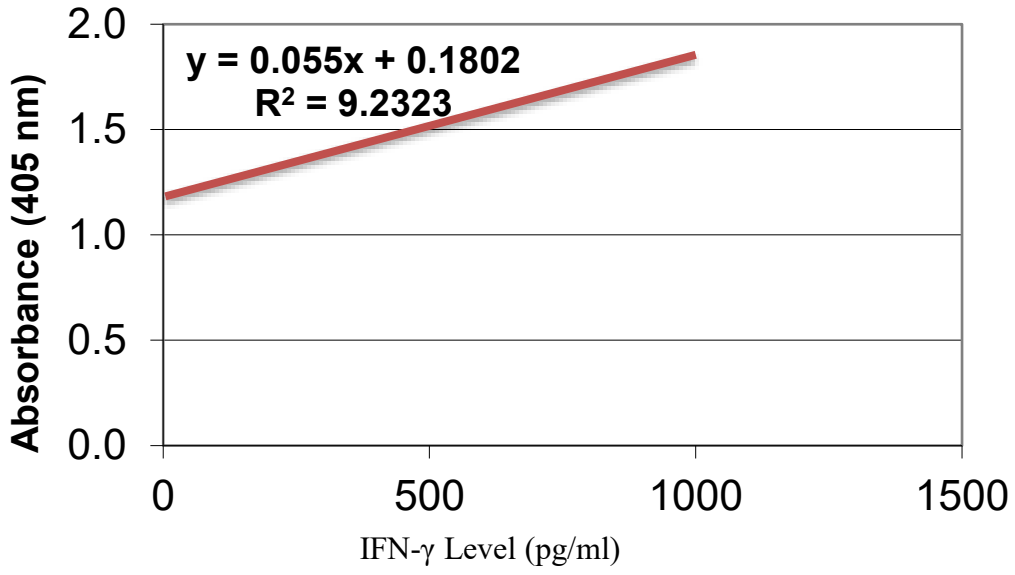
7- تم إضافة العينات (مجموعة المرضى والسيطرة) بحسب التسلسل في الصفيحة والخريطة المعدة مسبقاً وبواقع 100 مايكروليتر وتغطى الصفيحة بالغطاء اللاصق وتحضن لليلة كاملة في مكان مظلم.

8- أزيل مزيج الحضن وغسلت الصفيحة أربع مرات بمحلول الغسل ونقرت على ورق نشاف للتجفيف وأضيف 100 مايكروليتر من محلول الكشف عن الجسم المضاد وغطيت بالغطاء وحضنت لمدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة .

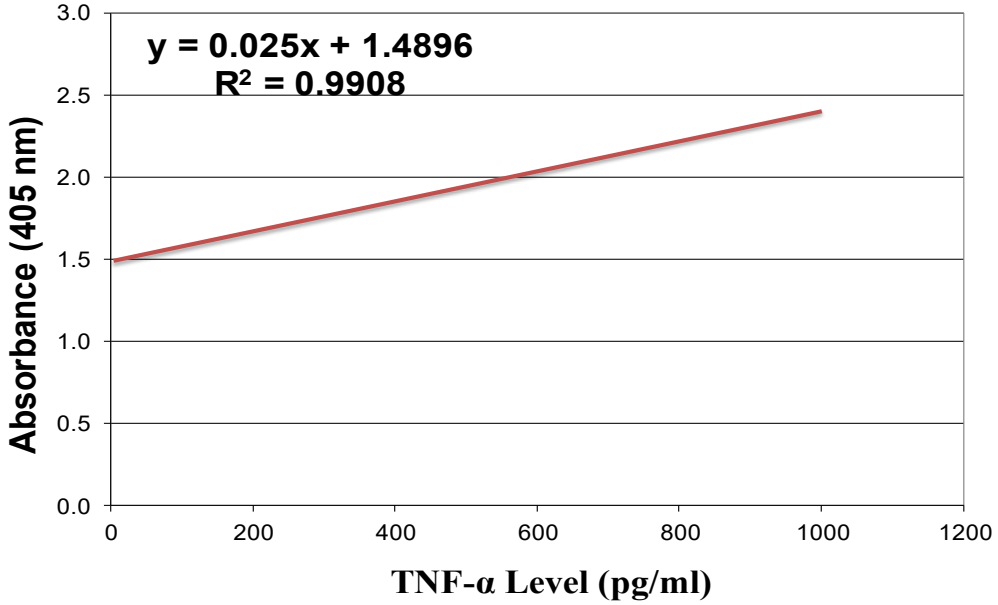
9- أزيل مزيج الحضن وغسلت الصفيحة أربع مرات بمحلول الغسل ونقرت الصفيحة على ورق النشاف للتجفيف وأضيف 100 مايكروليتر من محلول الأقتران Avidin إلى كل حفرة في الصفيحة، وغطيت الصفيحة بالغطاء اللاصق وحضنت لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة.

10- أزيل مزيج الحضن وغسلت الصفيحة أربع مرات بمحلول الغسل ونقرت الصفيحة على ورق النشاف للتجفيف وأضيف 100مايكروليتر من محلول المادة الأساس إلى حفر الصفيحة جميعها وتترك لمدة 10 دقائق بعدها تمت قراءة الإمتصاصية حال ظهور اللون بوساطة قارئ الاليزا على الطول الموجي 405 نانومتر وبمعدل ثلاث قراءات وبواقع 5 دقائق بين قراءة وأخرى.

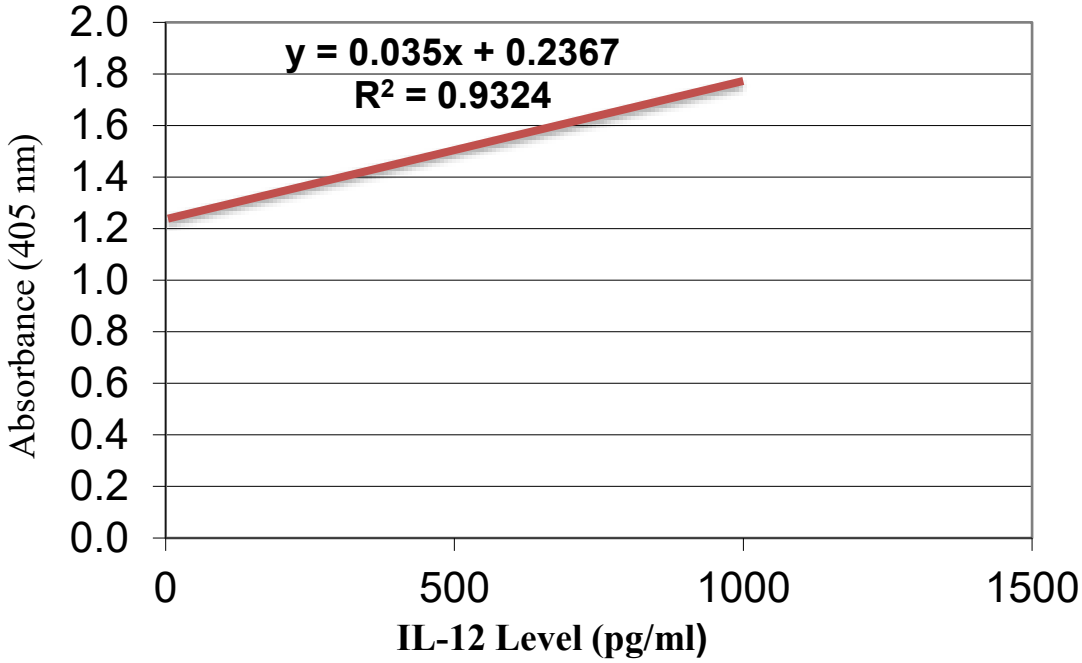
11- تم أخذ معدل القراءات ثم أسقاط القراءات الناتجة على المنحنى القياسي (الذي تم أعدادهُ من خلال تراكيز المحاليل القياسية وإمتصاصيتها للإستخراج قيم تراكيز الحركيات الخلوية وفق منحنياتها القياسية، بحسب الأشكال الموضحة أدناه :-



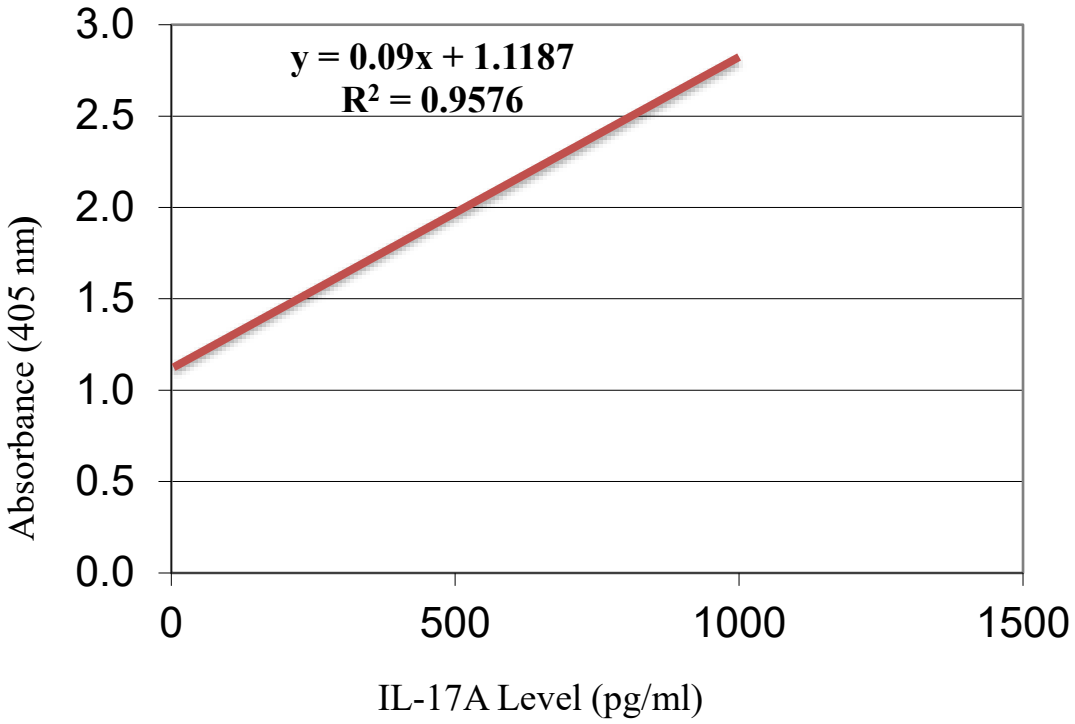
شكل(2-3) :- المنحني القياسي للانترفيرون كاما γ -IFN



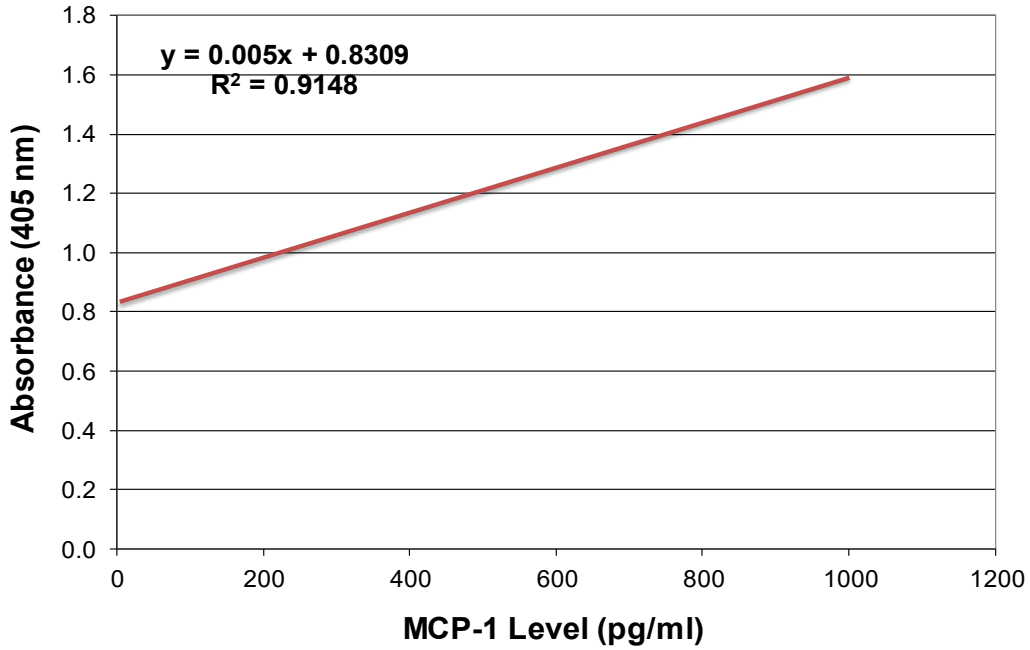
شكل(3-3):- المنحني القياسي لعامل التنخر الورمي ألفا TNF-α



شكل (4-3):- المنحني القياسي للانترليوكين -12



شكل(3-5) :-المنحني القياسي للأنترليوكين-17A



شكل(3-6):- المنحني القياسي للجاذب الكيميائي MCP-1

3-8:- التحليل الاحصائي Statistical analysis

أجري التحليل الإحصائي لنتائج الدراسة الحالية باستخدام برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الإجتماعية Statistical package for social sciences (SPSS) للبيانات الوصفية. أستخدم إختبار T.test، جدول تحليل التباين ANOVA، مربع كاي، النسبة المئوية، الإنحراف المعياري والخطأ القياسي في الدراسة الحالية لإيجاد الفروق المعنوية وعلاقتها بإصابات اللشمانيا الجلدية والبيانات الوصفية المتمثلة بالجنس، العمر، الوظيفة، عدد القرح وحجم القرحة وكذلك علاقة الإصابة بالفحوصات السريرية، المختبرية، المناعية والنسيجية وقورنت الفروق المعنوية بين متوسطات القيم أعتماداً على أختبار Game-Howell وكانت هناك فروقات معنوية ($P < 0.05$) .

الفصل الرابع GHAPTER FOUR

4 – النتائج Results

4-1:–تحديد نسبة الإصابة باللشمانيا الجلدية وعلاقتها بالبيانات الوصفية

شملت الدراسة 115 مصاباً باللشمانيا الجلدية وبنسبة إصابة 82.14% من العينة المدروسة وكانت نسبة النساء المصابات بمرض اللشمانيا الجلدية أعلى وبلغت 56.522% من نسبة الذكور المصابين 43.478% ويتضح من التحليل الإحصائي، أن هذا الإرتفاع قد شكل فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05 والجدول 4-1 يوضح توزيع الإناث والذكور في مجموعتي المصابين والسيطرة والنسب المئوية للإصابة.

جدول(4-1) :– أعداد والنسب المئوية للذكور والإناث المصابين وغير المصابين (السيطرة) للعينة المدروسة

الجنس	مجموعة المرضى (العدد)	النسبة المئوية للإصابة %	مجموعة السيطرة (العدد)	النسبة المئوية%	P-value

ذكر	50	43.478	17	68	0.026
أنثى	65	56.522	8	32	
المجموع	115	100.000	25	100	

يشير الجدول (4-2) أن الإصابات انتشرت ضمن مدى واسع من الفئات العمرية إذ تراوحت أعمار المصابين ما بين 2 أشهر الى 75 سنة وسجلت الفئة العمرية عشر سنوات وأقل أعلى نسبة في الإصابة إذ كانت النسبة 47.83 % وتلتها الفئة العمرية11 –20 سنة بنسبة 26.09 % في حين سجلت الفئة العمرية 21– 30 نسبة 10.435 % وسجلت الفئة العمرية 31– 40 نسبة 3.47 % وكانت أعلى منها نسبة الفئة العمرية 51– 60 إذ كانت بنسبة 6.09 %. وتماثلت نسب الإصابة في الفئتين العمرية 41-50 و 61-71 فكانت 2.61 % وأقل نسبة إصابة سجلت في الفئة العمرية 71-80 مقارنة مع نسب الفئات الأخرى وكان مقدارها 0.87%. وقد شكلت الاختلافات ما بين نسب الإصابة للفئات العمرية فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05 والجدول 4-2 يوضح أعداد والإصابة ونسبها بين الفئات العمرية للمصابين.

جدول 4-2 :– توزيع الاعداد والنسب المئوية للاصابة بمرض اللشمانيا الجلدية لعمر المصابين

الفئات العمرية	أعداد المصابين	النسبة المئوية للإصابة %	P-value
10سنة وأقل	55	47.83	0.000
20-11	30	26.09	
30-21	12	10.43	
40-31	4	3.48	
50-41	3	2.61	
60-51	7	6.09	

70-61	3	2.61	
80-71	1	0.87	
المجموع	115	100.00	

وشملت الدراسة الحالية أيضاً توزيع أعداد المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية بحسب عدد القرح منها المفردة والمتعددة كما في الأشكال (4–1, 4–2). وقد شكلت نسبة المصابين بالقرح المتعددة (أثنين فأكثر) 71.304 % إرتفاعاً عن نسبة المصابين بالقرحة المنفردة 28.696%. ومن خلال التحليل الإحصائي، يلاحظ أن القيمة الإحتمالية لإختبار والبالغة 0.000 أقل من مستوى المعنوية $P < 0.05$ فيوجد علاقة معنوية بين الإصابة بالقرح وعدد القرح. والجدول 4-3 يوضح ذلك.

جدول 4-3:- توزيع أعداد الإصابة ونسبها وفقاً لعدد القرح للمرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية.

عدد القرح	أعداد المصابين	النسبة المئوية للإصابة %	P-value
القرح المتعددة	82	71.304	0.000
القرح المنفردة	33	28.696	
	115	100.000	

كما يوضح الجدول 4-4 توزيع الإصابة في مناطق الجسم المختلفة، إذ سجلت أعلى نسبة إصابة في منطقة الوجه وبلغت 36.242 % وتلتها الأطراف العليا بنسبة 33.557 % كما يبين في الشكل (4–1) بينما كانت نسبة الإصابة بالأطراف السفلى 24.161 % ونسبة الإصابة في الأذن بلغت2.685% إما نسبة الإصابة في الرقبة كانت 2.013 % وسجلت أقل نسبة إصابة في منطقة الكتف وبلغت 1.342%. ومن خلال التحليل الإحصائي، قد شكل هذا الإرتفاع في نسب

الإصابة في منطقتي الوجه والأطراف العليا إرتفاعاً معنوياً وذا دلالة إحصائية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05.

جدول 4-4:- توزيع أعداد ونسب الإصابة باللشمانيا الجلدية وفقاً لموقع الإصابة من جسم المصاب

موقع الإصابة	اعداد الاصابة	النسبة المئوية%	P-value
الوجه	54	36.242	0.000
الأطراف العليا	50	33.557	
الأطراف السفلى	36	24.161	
الأذن	4	2.685	
الرقبة	3	2.013	
الكتف	2	1.342	
المجموع	149	100.000	

وسجلت نسب الإصابة باللشمانيا الجلدية بين الطلبة ورياض الأطفال إرتفاعاً عن الموظفين والكسبة، إذ كانت نسبة إصابة الطلبة 39.130% وتلتها نسبة إصابة رياض الأطفال 33.043% في حين كانت نسبة إصابة الكسبة وربات البيوت 24.349% وسجلت أقل نسبة إصابة باللشمانيا الجلدية لدى الموظفين، إذ بلغت 3.478 %. ومن خلال التحليل الإحصائي،

شكل هذا الإرتفاع فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05 والجدول 4-5 يوضح ذلك.



(a): قرحة مفردة في الذراع الأيسر **(b):قرح متعددة في الوجه** **(c): قرح متعددة في اليداليسرى**

شكل 4-1(a , b , c):- قرح جلدية جافة.



(a): في الوجه (b):في الساق الايمن (c): في القدم الايمن

شكل4- 2 (a , b , c):- قرح جلدية متعددة رطبة.

جدول 4-5:- يوضح أعداد الإصابة ونسبها باللشمانيا الجلدية وفقاً للمهنة.

المهنة	أعداد المصابين	النسب المئوية %	P-value
رياض الأطفال	38	33.043	0.000
الطلبة	45	39.130	
الكسبة/ربات البيوت	28	24.349	

الموظفين	4	3.478	
المجموع	115	100.000	

وشملت الدراسة الحالية قياس قطر القرحة الجلدية إذ تم توزيع أعداد المرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية وفقاً لقطر القرحة المقاس بالسنتمتر، إذ سجلت أقطار القرح الأقل من 1 سم الأعلى في الإنتشار وبنسبة 64% بينما كانت نسبة أقطار القرح الأكثر من 1 سم 36 %، وقد شكل هذا الإرتفاع فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية عند مستوى 0.05 كما في الجدول أدناه:-

جدول 4-6:- يوضح أعداد الإصابة ونسبها باللشمانيا الجلدية وفقاً لقطر القرحة مقاساً بالسنتمتر(سم).

قطر القرحة (سم)	أعداد القرح	النسبة المئوية %	P-value
1 سم وأقل	80	% 64	0.002
أكثر من 1 سم	45	% 36	
المجموع	125	% 100	

4-2:- نتائج طرائق تشخيص اللشمانيا الجلدية ومقارنة كفاءتها

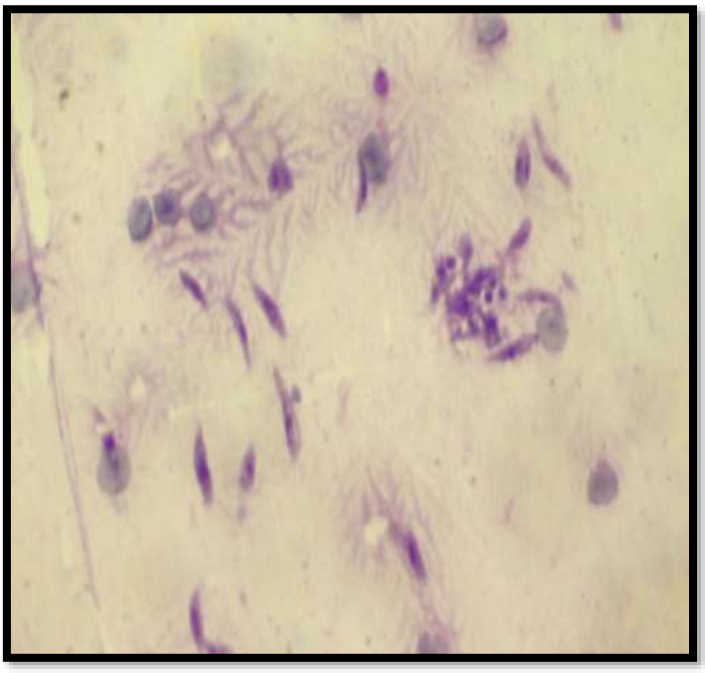
4-2-1:- نتائج طريقة التشخيص السريري

تم تشخيص الإصابة من قبل أطباء إختصاص أمراض الجلدية من خلال ملاحظة القرح الجلدية التي تظهر على جلد المصاب بعد أسبوعين تقريباً من تعرضهِ للسعة ذبابة الرمل، فكانت

نتائج التشخيص السريري لإصابة باللشمانيا الجلدية موجبة بنسبة 100% كما موضحة في الجدول 4-7.

4-2-2:- نتائج عزل طفيلي اللشمانيا الجلدية

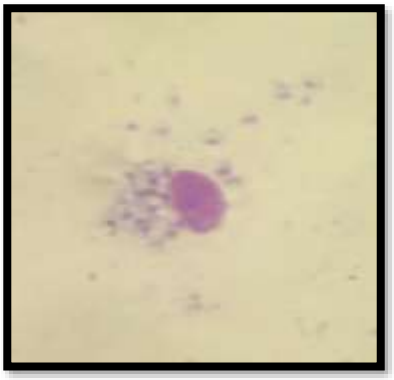
زُرعت جميع النماذج المسحوبة من القرح الجلدية في الوسط الزرعي ولجميع المرضى وتمت متابعة نمو طفيليات اللشمانيا المستنبتة عند درجة حرارة 26°م على الوسط شبه الصلب وكانت نتائج الاستنبات الزرعي على الوسط شبه الصلب موجبة (عند ظهور الطور أمامي السوط ذي الشكل المغزلي الطويل ويمتد على طوله سوط بغض النظر عن أعداد الطفيلي) كما في الشكل ٤-٣ أجري الفحص على المزارع بعد أسبوع الى عشرة أيام من بداية أستنباتها, في حين لم تستمر جميع الزروع الإيجابية بالنمو فلذلك لم يتم الحصول على التركيز الأمثل لنمو الطفيليات, وعدت العينات التي لم يسجل فيها نمو الطور أمامي السوط للطفيلي كنتيجة سالبة للإستنبات. حيث كانت نسبة الإستنبات الموجب 10.435% بينما كانت السالبة 89.565 كانت% ومن خلال التحليل الإحصائي، شكل هذا الإختلاف بين النسبتين فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05. والجدول 4-7 يوضح ذلك.



شكل 4-3:- الطور أمامي السوط Promastigote لطفيلي اللشمانيا

3-2-4:- نتائج المسحات Smears

كانت نتائج المسحات موجبة بظهور الطور اللاسوطي Amastigote للطفيلي الدائري الشكل ذي سايتوبلازم أزرق شاحب ونواة غير مركزية الموقع وحمراء اللون في المسحات المصبوغة بصبغة كمزا بنسبة 74.78 % في حين بلغت نسبة المسحات السالبة 25.21%. ويوضح الشكل (4-4) الطور عديم السوط داخل الخلية البلعمية.



شكل 4-4:- الطور اللاسوطي Amastigote لطفيلي اللشمانيا داخل الخلية البلعمية.

4-2-4:- نتائج التشخيص النسجي

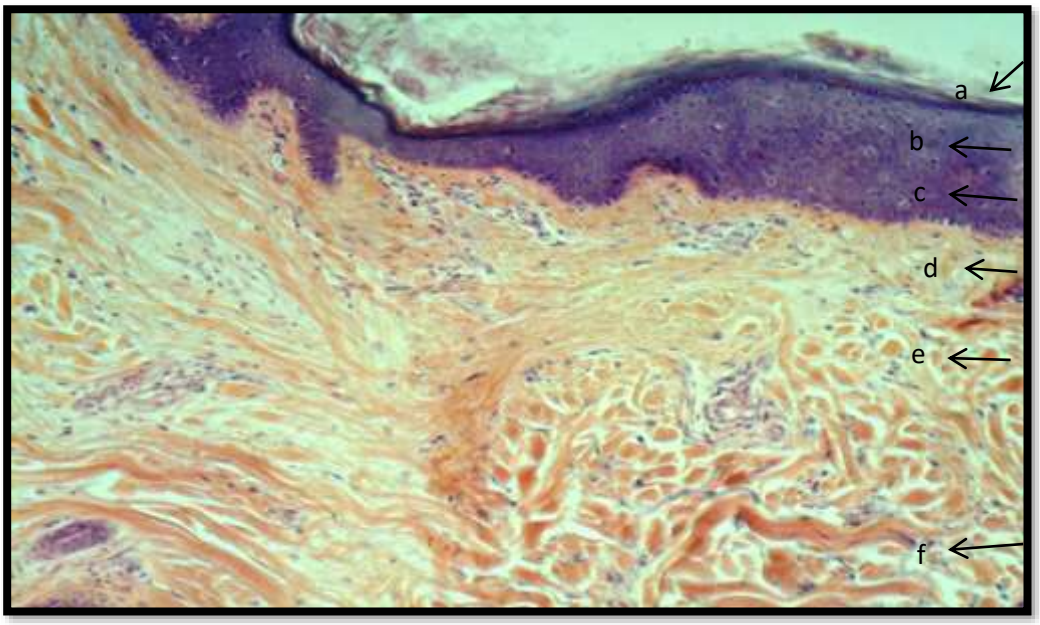
أكدت نتائج التشخيص النسجي الإصابة باللشمانيا الجلدية من خلال ملاحظة طفيلي اللشمانيا وبطوره اللاسوطي Amastigote سواء كان داخل Intracellular الخلايا البلعمية Macrophage أوخارجها Extracellular من نماذج الخزع النسجية المأخوذة من القرح الجلدية بنسبة 88.571% في الشرائح النسجية، في حين لم يلحظ وجود الطفيلي داخل الأنسجة الجلدية المصابة في 4 نماذج فقط مشكلة نسبة 11.429% كنسبة سلبية، شكل هذا الأختلاف في النسب الموجبة والسالبة فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05 ويبين الجدول 4-7 نتائج طرائق التشخيص المختلفة ومقارناتها المعنوية.

جدول 4-7:- نتائج مقارنة طرائق التشخيص المختلفة لداء اللشمانيا الجلدية في عينة الدراسة.

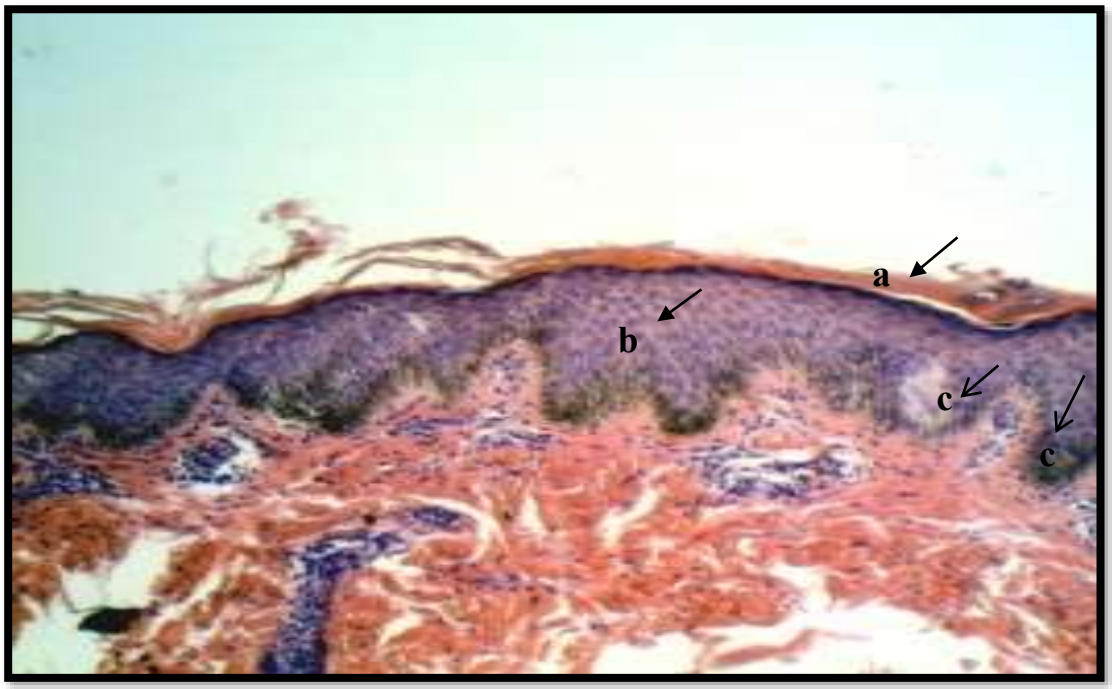
نوع التشخيص	عدد العينات الكلية	النتيجة	أعداد المصابين	النسبة المئوية %	P-value
التشخيص السريري Clinical diagnosis	115	Positive	115	100	0.000
		Negative	0	0	
التشخيص بالزرع Culture diagnosis	115	Positive	12	10.435	
		Negative	103	89.565	
المسحات Smears	115	Positive	86	74.782	
		Negative	29	25.218	
التشخيص النسجي Histological diagnosis	35	Positive	31	88.571	
		Negative	4	11.429	

5-2-4:- نتائج دراسة التأثيرات المرضية النسجية

قبل الولوج في التأثيرات المرضية النسجية الناجمة عن الإصابة باللشمانيا الجلدية يوضح الشكل (4–5) طبقات الجلد الطبيعية غير المصابة والتي تشمل طبقتي البشرة والأدمة. فقد أظهرت نتائج الدراسة المرضية النسجية التي أجريت على الخزع النسجية المأخوذة من حافات القرح وعلى مستوى المجهر الضوئي العديد من التغيرات النسجية المرضية التي تحدثها الإصابة باللشمانيا الجلدية في طبقات البشرة Epidermis والأدمة Dermis المصابة ومن أبرز هذه التأثيرات المرضية لوحظ في طبقة البشرة ظهور فيها فرط التقرن الجلدي Hyperkeratosis وتغلظ طبقة الجلد الحسكية أومايسمى بالشواك (حُساك) Acanthosis وفرط تكوين الاورمي الكاذب Pseudoepitheliomatous hyperplasia وزيادة في الخلايا الصبغية Melanocyte والورم الحُليميPapillomatosis وارتشاح الخلايا الالتهابية في طبقة الادمة كما في الشكلين(4–6, 4–7).



شكل (٤–٥) طبقات الجلد غير المصابة تشمل ست طبقات هي المتقرنة Stratum conreum(a) والحبيبية Stratum granulosum(b) والشائكةStratum Spinosum (c) والقاعدية Stratum Basale(d) والادمة الحُليميةPapillary dermis(e) والادمة الشبكية Reticular derimis (f).



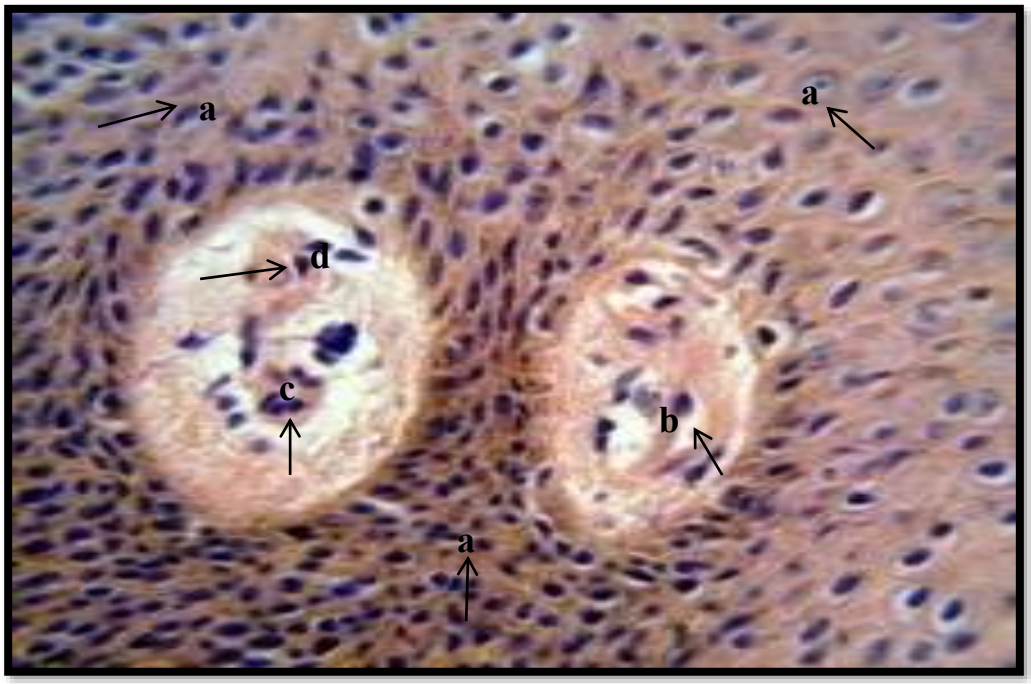
شكل (4- 6):- التأثيرات المرضية النسجية في البشرة Epidermis وتشمل فرط التقرن الجلدي (a)Hyperkeratosis وتغلظ طبقة الجلد الحسكية Acanthosis (b)ووالورم الحُليميPapillomatosis (H&E بقوة x 40).



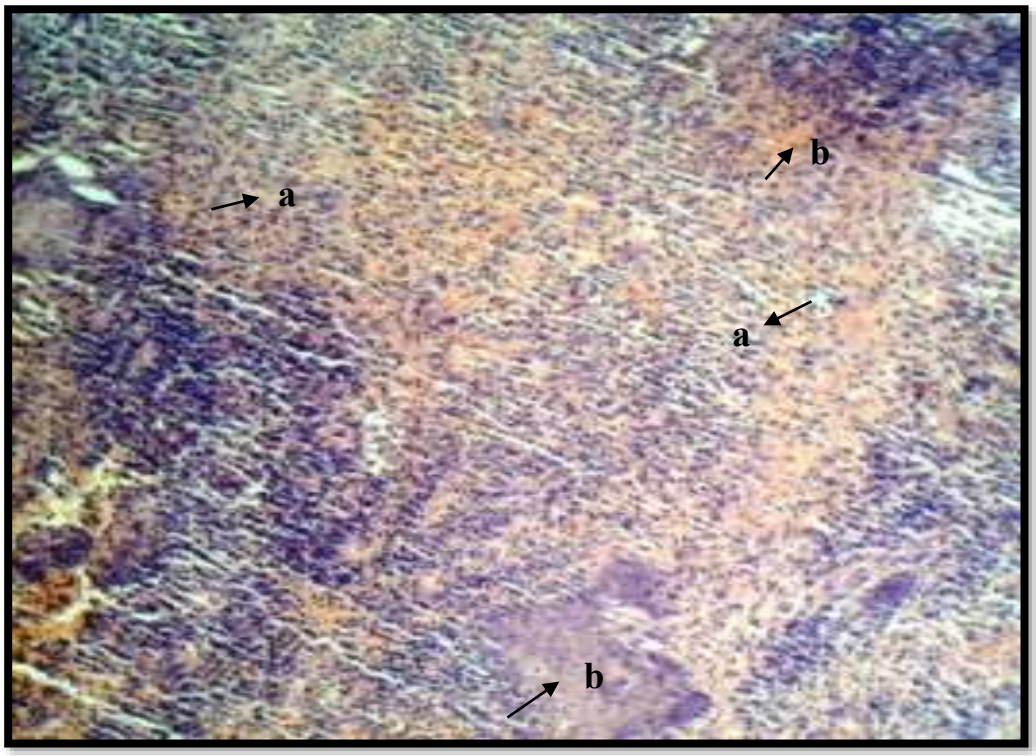
شكل (4-7):- فرط التقرنHyperkeratosis (a) وفرط التنسج البشريEpidermal hyperplasia (b) وارتشاح الخلايا الالتهابية Infamatory cells infiltration(H & E. بقوة x 40) Pseudoepitheliomatous hyperplasia(c).

بينما أشتملت التأثيرات المرضية النسجية في الأدمة ايضاً على زيادة كبيرة وملحوظة لأرتشاح الخلايا الألتهابية Dermal inflammatory infltration مع فرط تكوين الأورام الكاذبة

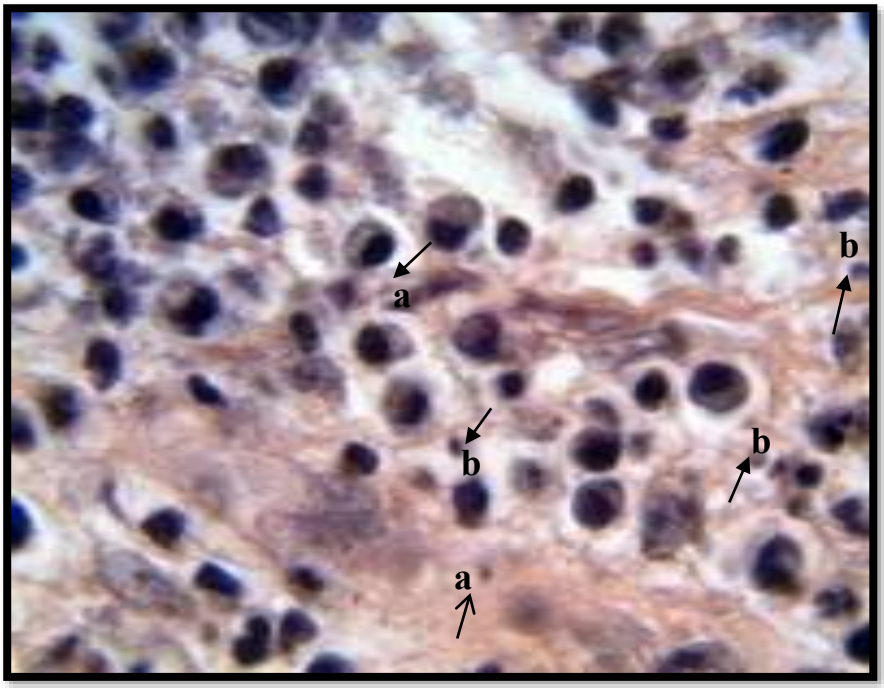
لخلايا الأدمة والتي تسمى Pseudoepitheliomatous dermal changes مع تجمعات للخلايا الألتهابية في مناطق عديدة من هذه الطبقة والشكل (4–8) يوضح ذلك. كما ينجم عن أصابات طبقات الجلد أضطراباً في ترتيبها وحصول تداخل بين طبقتي البشرة والأدمة يظهر جلياً في الشكلين (4–6 و4–7). ويوضح شكل (4–9) إرتشاح الخلايا اللمفاوية Lymphocytes والخلايا النسجية Histocytes وخلايا الدم البيض الحمضة Eosinophil leukocytes كما ظهرت مناطق تجمعات دموية مكونة أحتقانات دموية Congesition وتتوافر الخلايا البلعمية Macrophages والتي تحوي بداخلها أعداداً من الأطوار اللاسوطية Amastigotes والتي تعرف LD bodies والتي تظهر بشكل دائري أو بيضوي وحاوية على نواة وجسيم الحركة Kinetoplast كما يمكن ملاحظة هذه الأطوار داخل الخلايا البدينة Mast cells والخلايا العملاقة Giant cells والأشكال (4–10, 4–11 و4–12).



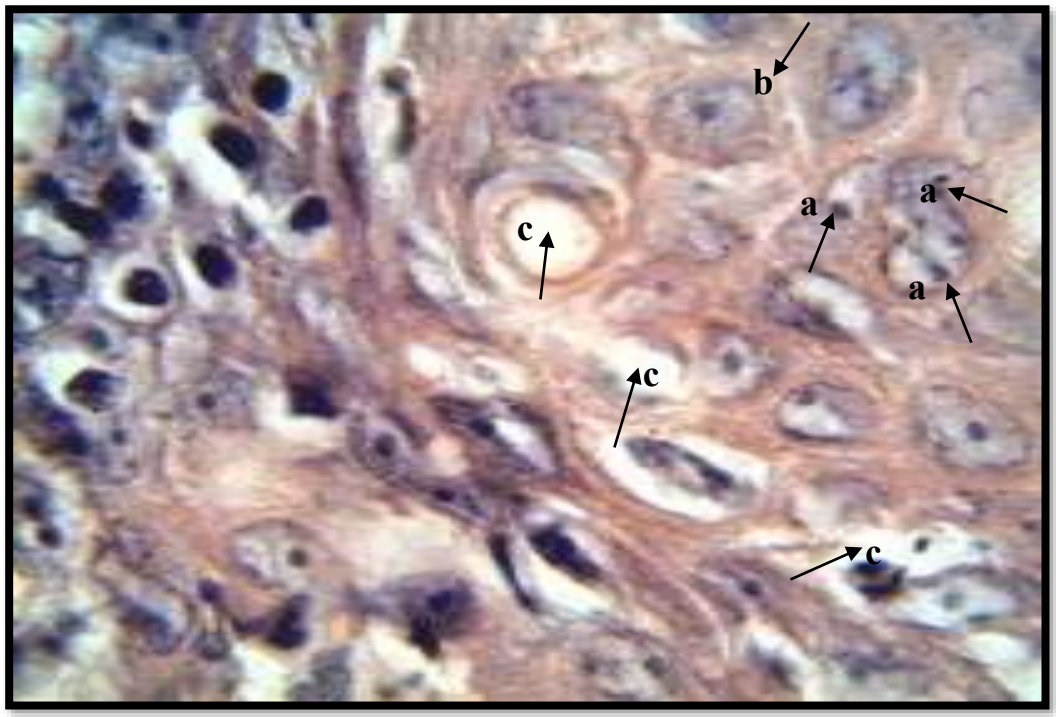
شكل (4–8):-أضطراب في ترتيب انسجة الجلد وظهور فرط التنسج للبشرةEpidermal hyperplasia(a) ومقطع في حُليمات ادميةDermal papilla(b) الخلايا البيض مفصصة النوى (العدلة والحمضة)Poly morphnuclear fragments(c) والطور اللاسوطيAmastigote(d) (H & E. بقوة x 100).



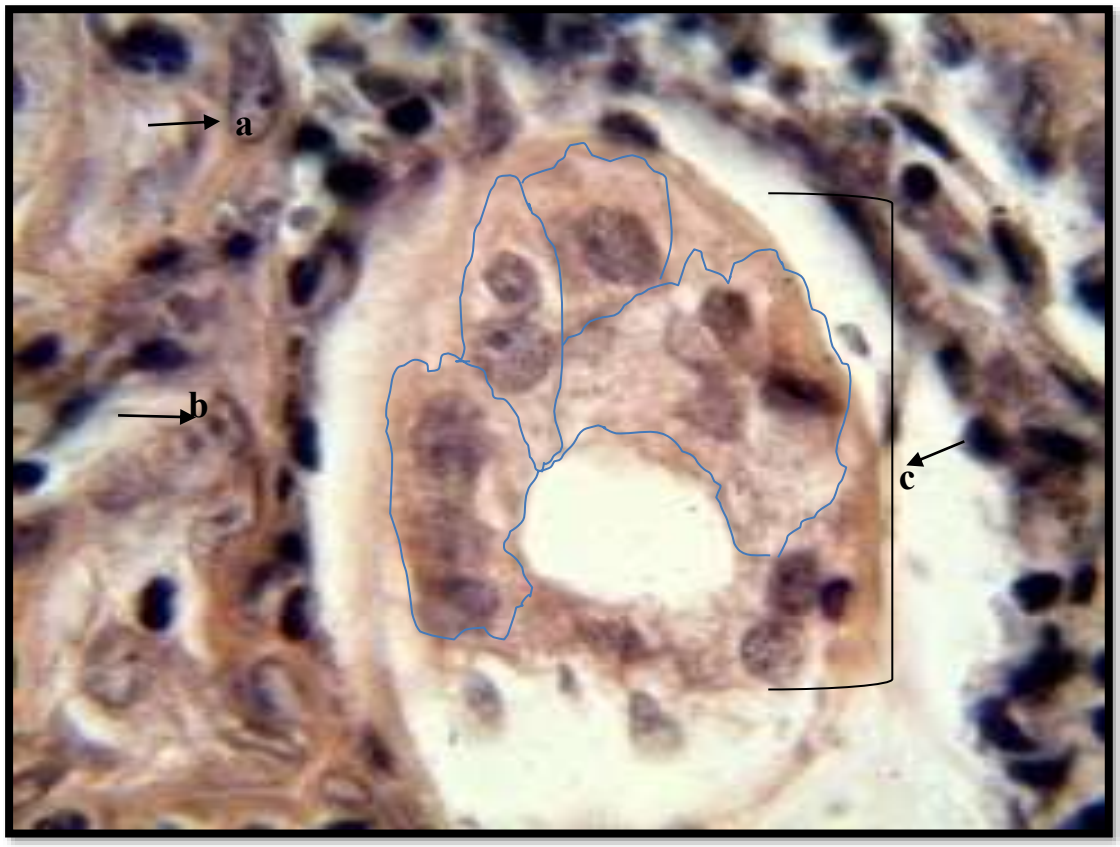
شكل (4-9):- أرتشاح خلوي يشمل الخلايا اللمفاوية Lymphocytes (a) والخلايا النسجية Histocytes وكريات الدم البيض الحمضةُ Eosinophil leukocytes كما يظهر الشكل تجمعات دموية مشكلة الأحتقان Congestion(b) (H & E. بقوة x 40).



شكل (4-10):- إرتشاح خلايا النسجية Histocytes وقليل من الخلايا اللمفاوية وتظهر الاطوار اللاسوطية داخل خلايا النسجية وتكون صغيرة مدورة ذات جسيم حركي لا مركزي Intra cellular amastigote(a) وخارج الخلايا Extracellular amastigote (b) (H & E بقوة x 100).

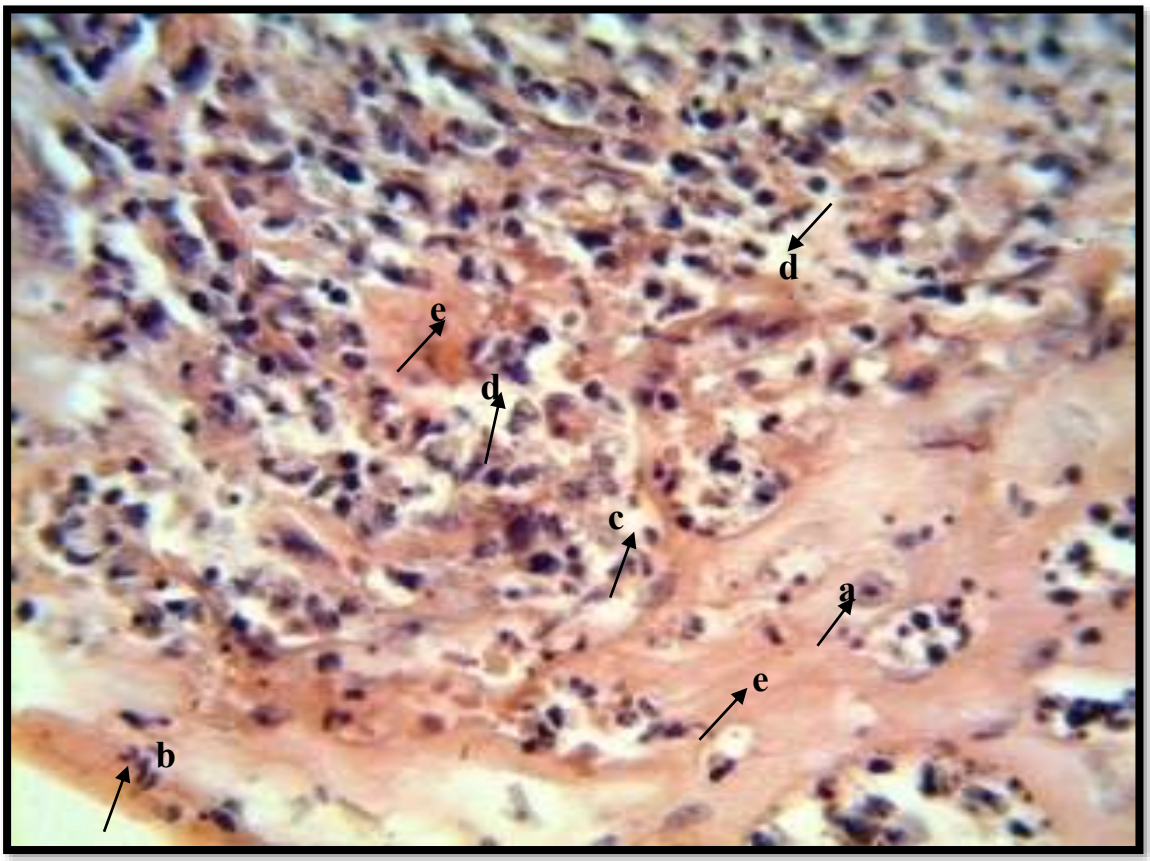


شكل (4-11):- الأشكال اللاسوطية Amastigote (a) لطفيلي اللشمانيا داخل الخلايا البلعمية Macrophage (b) وبداية ظهور التنخرNecrosis (c). (E & H. بقوة x 100).



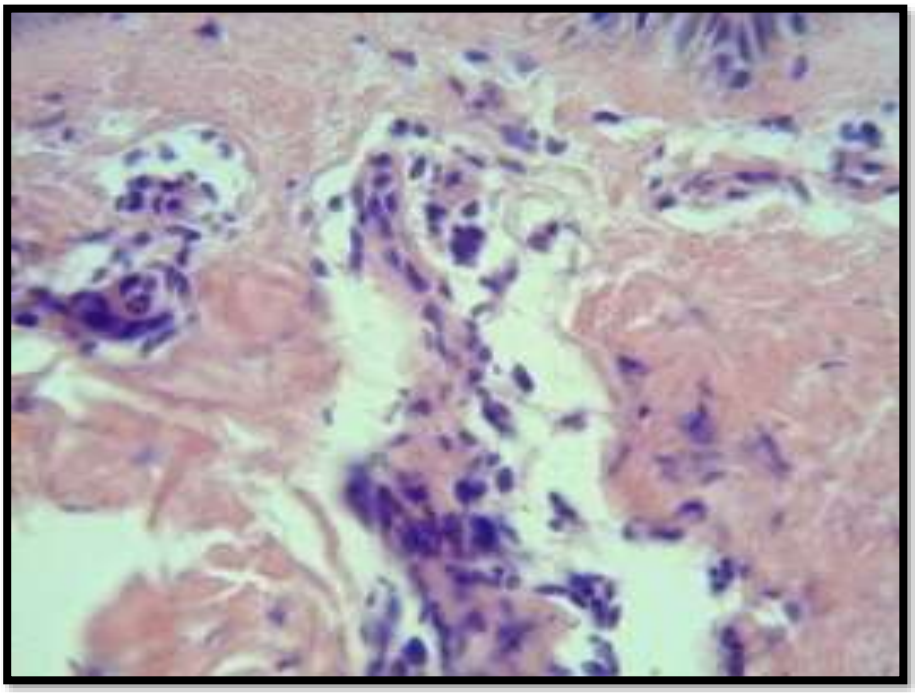
شكل (4-12):- خلايا بلعمية Macrophage(a) والأطوار اللاسوطية Amastigotes خارج الخلية Intra cellular Amastigotes (b) وكتلة خليطة من خلايا مرتشحة كالخلايا النسجية واللمفية والخلايا العملاقة متعددة النوى(c) (E & H. بقوة x 100).

كما قد تتوافر الأطوار اللاسوطية خارج الخلايا Extra cellular نتيجة الإصابة الشديدة وأنفجار الخلايا المصابة وخروج هذه الأطوار كما في الشكل (4-13) وقد لوحظت هذه التغيرات في الإصابة الحادة Acute lesion بينما بينت الدراسة الحالية أيضاً أن هذه التأثيرات المرضية يمكن أن تأخذ تأثيرات أضافية عند مرور فترة طويلة على الإصابة تشمل حصول تنخر لطبقة الأدمة Necrosis والذي ينتشر لمناطق عدة في الطبقة مع أرتشاح للخلايا العدلة Neutrophils والخلايا أحادية النواة Mononuclear cells ويرافقه مناطق الأحتقان الكثيرة المنتشرة في هذه الطبقة.

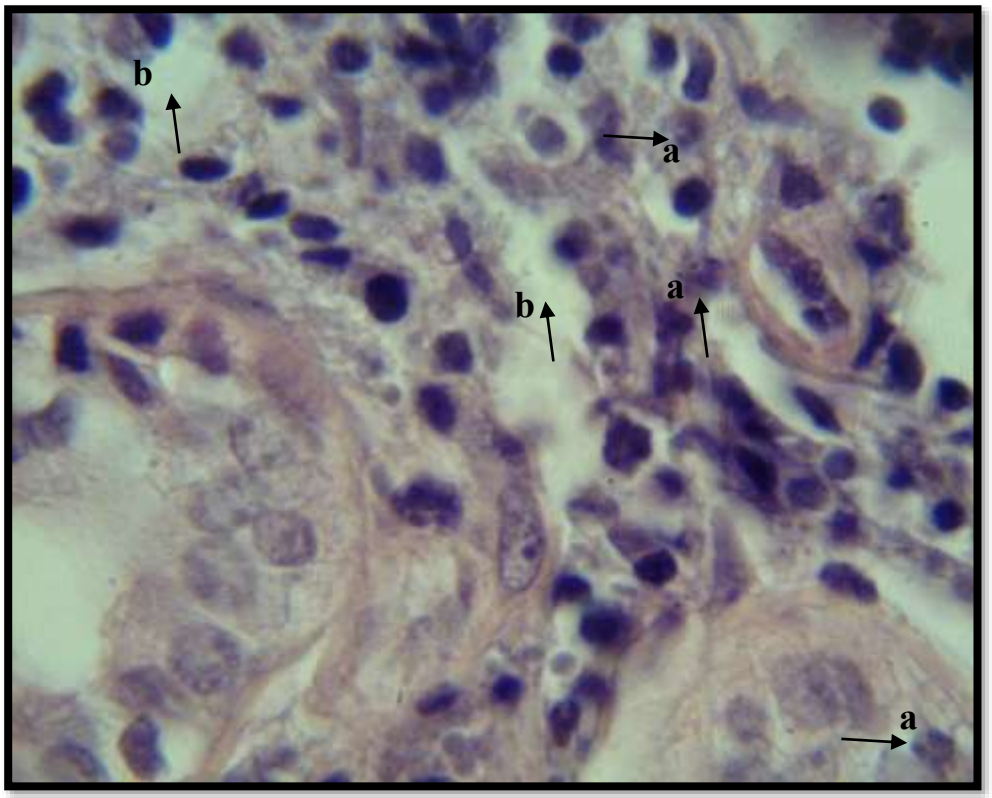


شكل (4-13):- خلايا بلعمية Macrophage(a) والأطوار اللاسوطية Amastigotes داخل وخارج الخلايا البلعميةMacrophages (c , b) ومساحات من التنخر Necrosis(d) والأحتقان Congestion(e) (H & E. بقوة x 100).

والشكل (4 – 14) يوضح ذلك مع تكوين الألتهابات والأورام الحبيبية Granulomatous inflammation التي تحدث نتيجة لتجمع أعداد كبيرة من الخلايا البلعمية كما في الشكل (4-15)، وأشارت النتائج أن كلما مرت فترة على الإصابة قلت أطوار اللاسوطية Amastigote داخل خلايا البلعمية Macrophage مقارنة بالإصابة الحادة.



شكل (4-14):- التنخر الأدمي المنتشر مع أرتشاح للخلايا العدلة Neutrophils والخلايا أحادية النواة Mononuclear cells (H & E. بقوة x 40).



شكل (4–15):- تكوين الألتهابات الورمية الحبيبية Granulomatous inflammation وظهور الخلايا البلعمية Macrophage cells ولكن يظهر بوضوح الأطوار اللاسوطية لطفيلي اللشمانيا (a) ومناطق التنخر(b) (H & E. بقوة x 100).

4–2–6:- نتائج الحركيات الخلوية IFN- γ, TNF-α, IL-12, IL-17A و MCP-1

Results 0f cytokines IFN- γ, TNF-α, IL-12, IL-17A and MCP-1

تشير نتائج الجدول (4–8) الى مدى إرتفاع تركيز IFN- γ لدى مجموعة مرضى اللشمانيا الجلدية وقد بلغ 54.118 ±1.740 بيكوغرام / مل والذي يشكل فرقاً معنوياً عند مقارنته ببقية المجاميع عند مستوى دلالة ($P<0.05$) . يضاف لذلك أن أعلى أستجابة كانت 75.36 بيكوغرام / مل ثم أخذ تركيز هذا الحركي الخلوي بالأنخفاض في مجاميع المرضى المعالجين بعقار البنتوستام وبلغ 34.420±0.984 بيكوغرام / مل (بجرعة واحدة الى ثلاثة جرعات) وأنخفض أكثر في المجموعة المعالجة بأربع جرعات فأكثر ووصل الى 22.489 ± 0.795 بيكوغرام / مل ولوحظ أن تركيز IFN- γ في مجموعة السيطرة غير المصابة كان 5.092±0.805 بيكوغرام / مل وجاءت هذه المجموعة بأدنى إستجابة مقارنة ببقية المجاميع.

جدول (4–8):– تراكيز IFN- γ مقدرة بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة.

المجموعة	العدد	المتوسط الحسابي	الأنحراف المعياري ±SD	الخطأ المعياري ± SD	أدنى أستجابة	أعلى أستجابة	مستوى الدلالة
مرضى اللشمانيا الجلدية قبل العلاج	35	*54.118	10.295	1.740	40.90	75.36	0.000
أثناء العلاج(1–3)جرعات	20	*34.420	4.399	0.984	27.80	43.23	
أثناء العلاج 4 جرع فأكثر	20	*22.498	3.553	0.795	17.08	29.48	
السيطرة غير المصابة	20	*5.092	3.600	0.805	1.42	11.68	
* وجود فروق معنوية لكل مجموعة عند مستوى إحتمالية أقل من0.05							

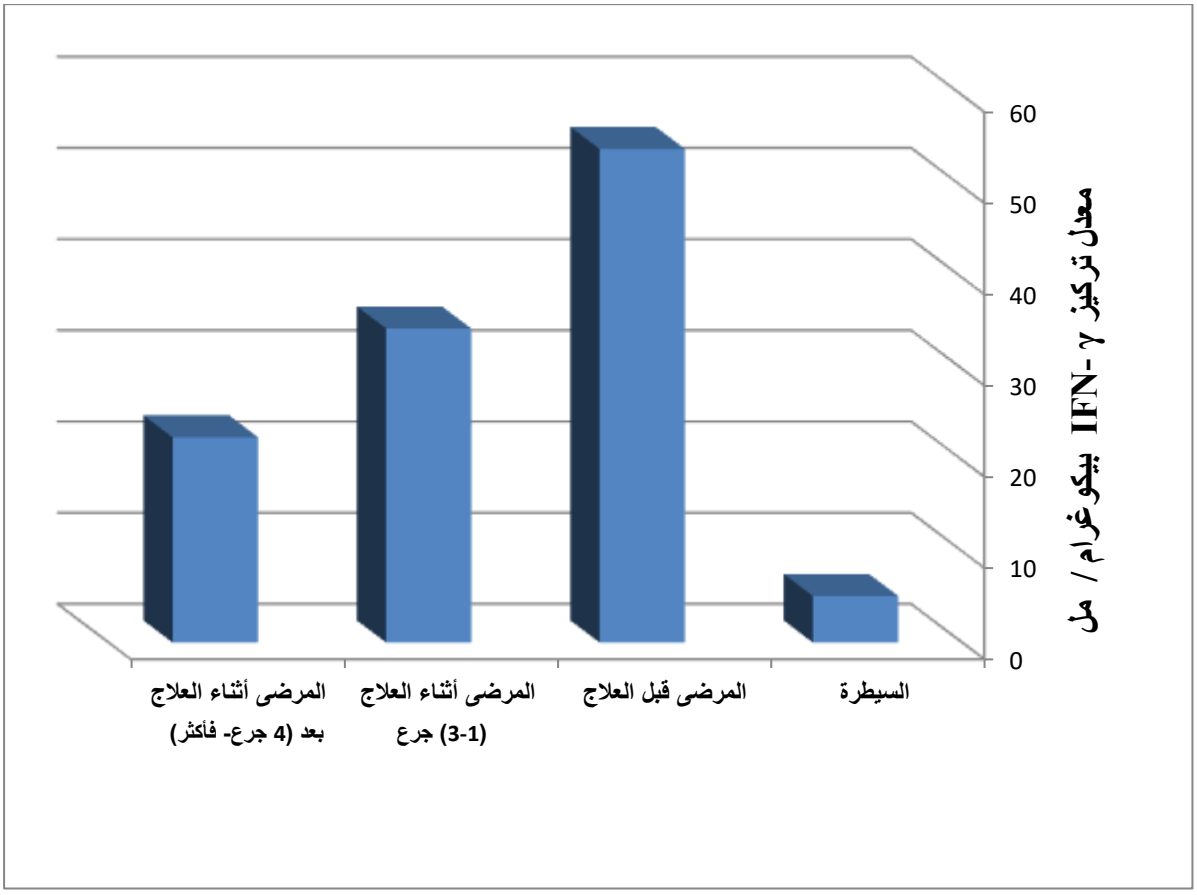
ولأجل الوقوف على موقع الأختلاف مابين المجاميع تجاه IFN- γ ثم أجراء أختبار الأزواج المتقابلة بموجب طريقة Games- Howell التي تقتضي حالة عدم تجانس تباينات المجموعات قيد البحث. إذ يبين الجدول (4–9) مقارنات مختلفة بين المجاميع المبحوثة على وفق الفرق في المتوسط الحسابي فعند المقارنة بين مجموعة المرضى المصابين وبوصفها مجموعة ضابطة لوحظ وجود فروقات معنوية عالية ($P< 0.05$) بينها وبين مجاميع السيطرة غير المصابة، المرضى المعالجين بعد 1–3 جرع والمعالجين بأربع جرعات فأكثروينطبق هذا الكلام في المقارنات اللاحقة الموضحة بالجدول (4–9) التي تظهر وجود فروقات معنوية عالية عندما أخذت المجاميع الأخرى (في أثناء العلاج والسيطرة) كمجاميع ضابطة.

جدول (4-9):- أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـ IFN- γ.

المجموعة الضابطة (I)	المجموعة (J)	متوسط الفرق (J)	الخطأ القياسي	فترة الثقة 95%		مستوى الدلالة
				الحد الأدنى	الحد الأعلى	
مرضى اللشمانيا الجلدية (قبل العلاج)	أثناء العلاج (1-3) جرعة	*19.698	1.962	15.800	23.595	0.000
	أثناء العلاج (4 جرعات فأكثر)	*31.620	1.962	27.723	35.517	0.000
	السيطرة	*49.026	1.962	45.129	52.923	0.000
أثناء العلاج (1-3) جرعة	قبل العلاج	*-19.698	1.962	-23.595	-15.801	0.000
	أثناء العلاج 4جرعات – فأكثر)	*11.923	2.213	7.526	16.319	0.000
	السيطرة	*29.329	2.213	24.932	33.725	0.000
أثناء العلاج (4 جرعات– فأكثر)	قبل العلاج	*-31.620	1.961	-35.517	-27.723	0.000
	أثناء العلاج(1-3)جرعة	*-11.922	2.213	-16.319	-7.526	0.000
	السيطرة	*17.406	2.213	13.009	21.802	0.000
السيطرة غير	قبل العلاج	*-49.026	1.962	-52.923	-45.129	0.000

المصابة	أثناء العلاج (1-3)جرعة	-29.329*	2.213	-33.725	-24.932	0.000
	أثناء العلاج(4 جرعات- فأكثر)	-17.406*	2.213	-21.802	-13.009	0.000
* وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من0.05						

يظهر الشكل (4-16) الأشرطة البيانية لنتائج المتوسطات الحسابية للحركي الخلوي IFN- γ للمجاميع المبحوثة مبيناً الفروقات المعنوية الكبيرة في مستوياته.



شكل (4-16):- معدل تركيز الحركي الخلوي IFN- γ في مصل المجاميع المدروسة.

يبين الجدول (4-10) تراكيز TNF-α في المجاميع المدروسة، إذ أرتفع هذا الحركي في مجموعة مرضى اللشمانيا الجلدية وبلغ 98.145±2.925 بيكوغرام / مل ثم أنخفض بعد العلاج فوصل في مجموعة المرضى المعالجين بجرعة واحدة الى ثلاث جرعات 71.507±2.901

بيكوغرام/مل وكذلك في المرضى المعالجين بأربع جرعات فأكثر بلغ 48.381±2.379 بيكوغرام/مل بينما كان تركيزه في مجموعة السيطرة غير المصابة 13.173±1.388بيكوغرام/ مل. وكانت هناك فروقاً معنوية بمستوى دلالة ($P< 0.05$) بين مجموعة المصابين وبقية المجاميع.

جدول (4-10):- تراكيز TNF-α مقدرة بالبيكوغرام/ مل في المجاميع المدروسة.

المجموعة	العدد	المتوسط الحسابي	الأنحراف المعياري ±SD	الخطأ المعياري ±SE	أدنى أستجابة	أعلى أستجابة	مستوى الدلالة
مرضى اللشمانيا الجلدية قبل العلاج	35	98.145*	17.303	2.925	70.44	130.34	0.000
أثناء العلاج(1-3)جرعات	20	71.507*	12.975	2.901	51.4	100.5	
أثناه العلاج 4 جرع فأكثر	20	48.381*	10.643	2.379	31.81	67.3	
السيطرة غير المصابة	20	13.173*	6.207	1.388	2.3	25.3	
***وجود فروق معنوية لكل مجموعة عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05**							

تم أعتماد أختبار الأزواج المتقابلة أيضاً لأجراء المقارنات مابين المجاميع المبحوثة ويشير الجدول (4-11) الى مقارنات مختلفة بين المجاميع قيد البحث على وفق الفرق في المتوسط الحسابي فعندما أخذت مجموعة مرضى اللشمانيا الجلدية كمجموعة مقارنة ضابطة تبين وجود فروقات معنوية عالية ($P < 0.000$) بينها وبين بقية المجاميع التي شملت (المرضى المعالجين

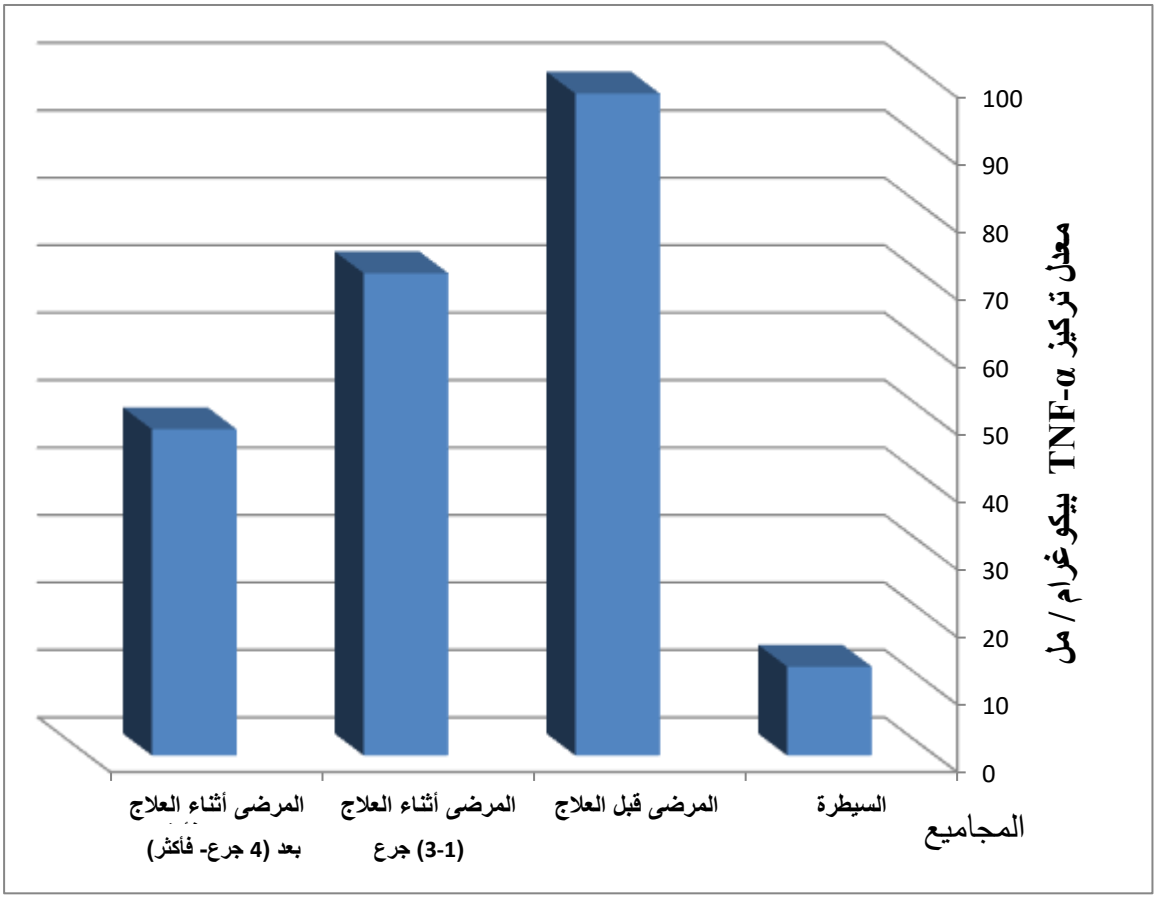
بالجرعات المختلفة والسيطرة) وأنعكس ما سلف ذكر في IFN- γ من أجراء مقارنات لاحقة بين المجاميع المختلفة، يبينها جدول (4–12) وكانت هنالك فروقات معنوية عالية بين المجاميع.

جدول (4–11):- أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـ TNF-α.

المجموعة الضابطة (I)	المجموعة (J)	متوسط الفرق (J)	الخطأ القياسي SE	فترة الثقة95%		مستوى الدلالة
				الحد الأدنى	الحد الأعلى	
مرضى اللشمانيا الجلدية (قبل العلاج)	أثناء العلاج (1–3) جرعة	*26.638	3.747	19.195	34.082	0.000
	أثناء العلاج (4 جرعات فأكثر)	*49.764	3.747	42.321	57.207	0.000
	السيطرة	*84.972	3.747	77.529	92.415	0.000
أثناء العلاج (1–3) جرعة	قبل العلاج	*-26.638	3.747	-34.082	-19.195	0.000
	أثناء العلاج 4جرعات – فأكثر)	*23.126	4.227	14.729	31.523	0.000
	السيطرة	*58.3348	4.227	49.937	66.371	0.000
أثناء العلاج 4 جرعات – فأكثر)	قبل العلاج	*-49.764	3.747	-57.207	-42.321	0.000
	أثناء العلاج(1–3)جرعة	*-23.126	4.227	-31.523	-14.729	0.000
	السيطرة	*35.208	4.227	26.811	43.605	0.000
السيطرة غير المصابة	قبل العلاج	*-84.972	3.747	-92.415	-77.529	0.000
	أثناء العلاج (1–3)جرعة	*-58.334	4.227	-66.731	-49.937	0.000
	أثناء العلاج (4	*-35.208	4.227	-43.605	-26.811	0.000

	جرع – فأكثر)					
وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من0.05						

يوضح الشكل (4–17) الأشرطة البيانية لنتائج المتوسطات الحسابية للحركي الخلوي



TNF-α للمجاميع قيد الدراسة مبيناً الفروقات المعنوية الكبيرة في مستوياتهِ.

شكل (4–17): معدل تركيز الحركي الخلوي TNF-α في مصول المجاميع المدروسة.

يبين الجدول (4–12) مدى إرتفاع تركيز الحركي الخلوي IL-12 لدى مجموعة مرضى اللشمانيا الجلدية وقد بلغ 845.598 ± 16.273 بيكوغرام / مل ثم أنخفض بعد العلاج فوصل في مجموعة المرضى المعالجين بعد (1–3) جرع 619.164 ± 20.209 بيكوغرام /مل وقد بلغ تركيزه

في المرضى المعالجين بأربع جرعات فأكثر 495.578 ± 27.038 بيكوغرام / مل بينما بلغ تركيزه في مجموعة السيطرة 160.222 ± 11.761 بيكوغرام / مل. وشكل هذا الإرتفاع فرقاً معنوياً بمستوى دلالة ($P< 0.05$).

جدول (4-12):- تركيز IL-12 بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة.

المجموعة	العدد	المتوسط الحسابي	الأنحراف المعياري ±SD	الخطأ المعياري ±SE	أدنى أستجابة	أعلى أستجابة	مستوى الدلالة
مرضى اللشمانيا الجلدية قبل العلاج	35	*845.598	96.273	16.273	648.46	997.29	0.000
أثناء العلاج (1-3) جرعات	20	*619.164	90.377	20.209	400.32	743.38	
أثناه العلاج 4 جرع فأكثر	20	*495.578	120.917	27.038	311.15	690.73	
السيطرة غير المصابة	20	*160.222	52.595	11.761	91.24	251.372	
* وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05.							

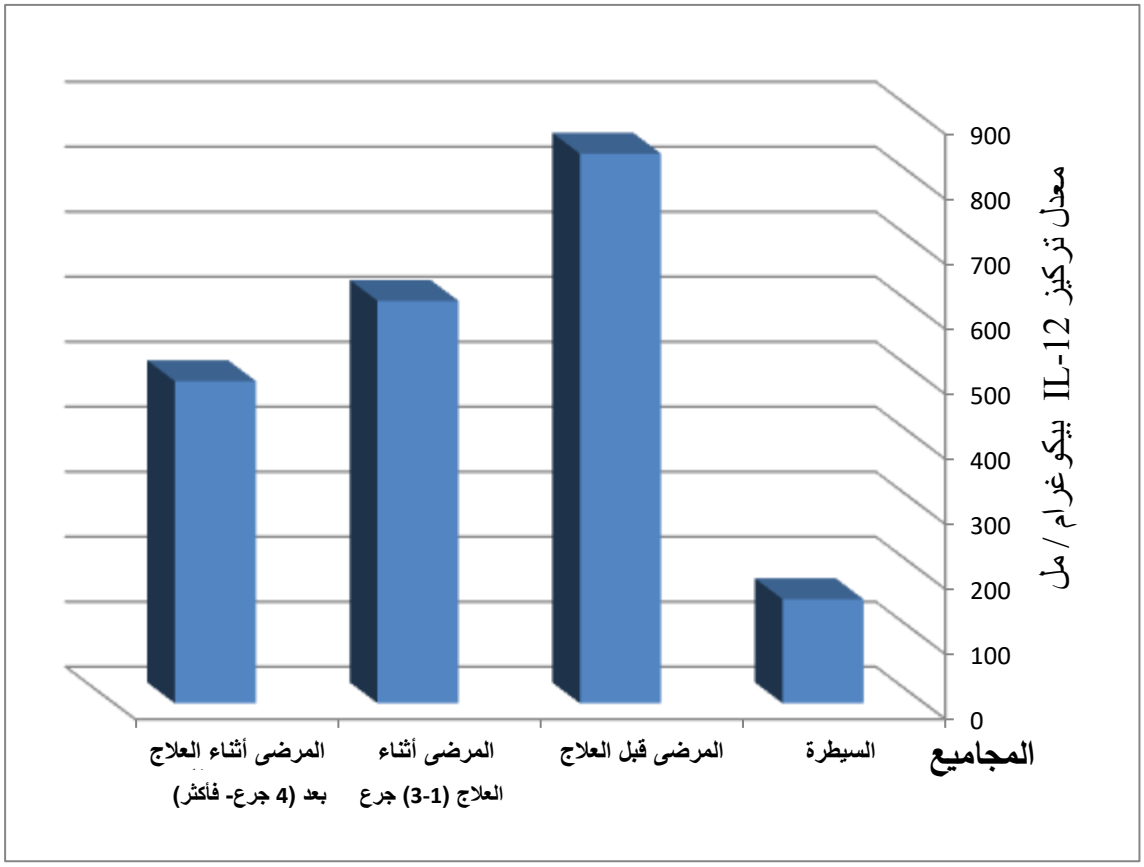
ولأجراء المقارنة ما بين المجاميع المبحوثة وبالإعتماد على إختبار الأزواج المتقابلة، حيث يبين الجدول (4-13) مقارنات مختلفة بين المجاميع على وفق الفرق في المتوسط الحسابي فعندما أخذت مجموعة مرضى اللشمانيا الجلدية بوصفها مجموعة مقارنة ضابطة، تبين وجود فروقات

معنوية عالية ($P< 0.05$) بينها وبين بقية المجاميع التي شملت (المرضى المعالجين بالجرعات المختلفة والسيطرة) وكما ذكرت سابقاً في IFN- γ و TNF-α من أجراء المقارنات لاحقة بين المجاميع المختلفة كما في الجدول (4–13) وكانت هنالك فروقات معنوية عالية بين المجاميع ويوضحها أيضاً الشكل (4–18).

جدول (4–13):- أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـ IL-12.

المجموعة الضابطة (I)	المجموعة(J)	متوسط الفرق(I-J)	الخطأ القياسي SE	فترة الثقة 95%		مستوى الدلالة
				الحد الأدنى	الحد الأعلى	
مرضى اللشمانيا الجلدية (قبل العلاج)	أثناء العلاج (1–3)جرعة	*226.434	26.293	174.207	278.662	0.000
	أثناء العلاج (4 جرعات فأكثر)	*350.020	26.293	297.792	402.248	0.000
	السيطرة	*685.376	26.293	633.148	737.604	0.000
أثناء العلاج (1–3) جرعة	قبل العلاج	*-226.434	26.293	-278.662	-174.207	0.000
	أثناء العلاج 4جرعات – فأكثر)	*123.586	29.662	64.665	182.507	0.000
	السيطرة	*458.942	29.662	400.021	517.863	0.000
أثناء العلاج 4 جرعات – فأكثر)	قبل العلاج	*-350.020	26.293	-402.248	-297.792	0.000
	أثناء العلاج(1–3) جرعة	*-123.586	29.662	-182.507	-64.665	0.000
	السيطرة	*335.356	29.662	276.435	394.277	0.000
السيطرة	قبل العلاج	*-685.376	26.293	-737.604	-633.148	0.000
	أثناء العلاج (1–3) جرعة	*-458.942	29.662	-517.863	-400.021	0.000
	أثناء العلاج (4 جرع – فأكثر)	*-335.356	29.662	-394.277	-276.435	0.000

وجود فروق معنوية عند مستوى إحتماليةأقل من 0.05.



شكل(4–18): معدل تركيز الحركي الخلوي IL-12 بيكوغرام /مل في مصول المجاميع المدروسة.

بينما توضح نتائج الحركي الخلوي IL-17A في الجدول (4–14) إذ أرتفع معدل تركيزه لدى المرضى اللشمانيا الجلدية قبل العلاج، إذ بلغ 227.268 ± 5.027 بيكوغرام / مل ثم أنخفض بعد العلاج فوصل في مجموعة المرضى المعالجين بعد(1–3) جرعات 170.511 ± 5.481 بيكوغرام / مل وأنخفض أكثر في مجموعة المرضى المعالجين بأربع جرعات – فأكثر، إذ بلغ 126.443 ± 5.565 بيكوغرام / مل بينما بلغ تركيزه في مجموعة السيطرة غير المصابة 76.463± 7.089 بيكوغرام / مل. وشكل هذا الإرتفاع فرقاً معنوياً بمستوى دلالة ($P< 0.05$).

جدول(4–14):- تركيز IL-17A بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة.

المجموعة	العدد	المتوسط الحسابي	الأنحراف المعياري ±SD	الخطأ المعياري ±SE	أدنى أستجابة	أعلى أستجابة	مستوى الدلالة
مرضى اللشمانيا الجلدية قبل العلاج	35	*227.268	29.742	5.027	170.511	296.701	
أثناء العلاج (1–3) جرعات	20	*170.511	24.512	5.481	121.56	217.149	
أثناه العلاج 4 جرع فأكثر	20	*126.443	24.886	5.565	87.43	171.689	0.000
السيطرة غير المصابة	20	*76.463	31.704	7.089	21.25	124.65	
* وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05.							

يشير الجدول (4–15) المقارنات ما بين المجاميع المدروسة وفقاً للفرق بين المتوسطات الحسابية بالإعتماد على أختبار الأزواج المتقابلة، فعندما أخذت مجموعة مرضى اللشمانيا الجلدية كمجموعة مقارنة ضابطة تبين وجود فروقات معنوية عالية عند مستوى إحتمالية ($P< 0.05$). بينها وبين بقية المجاميع التي شملت (المرضى المعالجين بالجرعات المختلفة والسيطرة) وبالطريقة نفسها تم أجراء مقارنات لاحقة بين المجاميع المختلفة بحيث في كل مرة تغير مجموعة الضابطة

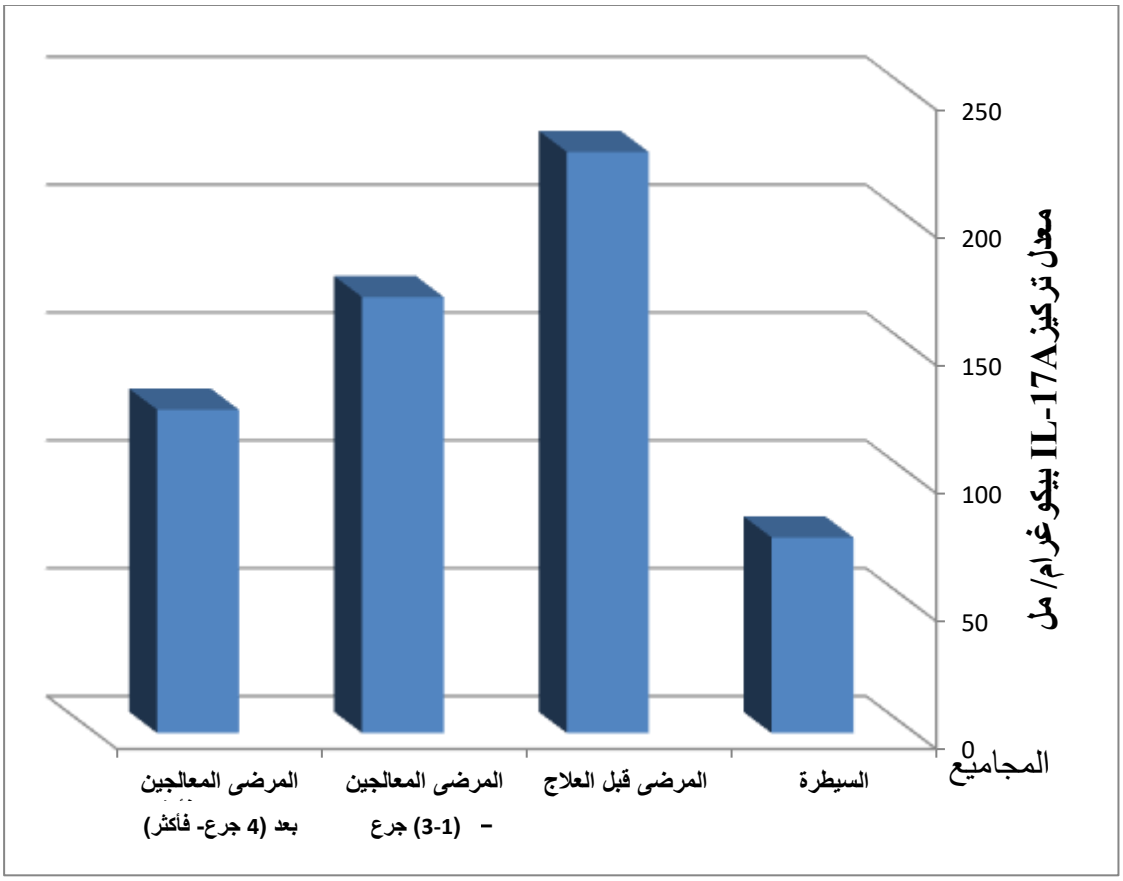
ويتم مقارنتها مع المجاميع الأخرى كما يوضحها الجدول (4-15) وكانت هنالك فروقات معنوية عالية بين المجاميع.

جدول (4-15):- أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـ IL-17A.

المجموعة الضابطة (I)	المجموعة (J)	متوسط الفرق(I-J)	الخطأ القياسي ±SE	فترة الثقة 95%		مستوى الدلالة
				الحد الأدنى	الحد الأعلى	
مرضى اللشمانيا الجلدية (قبل العلاج)	أثناء العلاج (1-3) جرعة	*56.757	7.904	41.056	72.457	0.000
	أثناء العلاج (4 جرعات فأكثر)	*100.825	7.904	85.124	116.525	0.000
	السيطرة	*150.805	7.904	135.104	166.506	0.000
أثناء العلاج (1-3) جرعة	قبل العلاج	*-56.757	7.904	-72.457	-41.056	0.000
	أثناء العلاج 4جرعات – فأكثر)	*44.068	8.917	26.356	61.781	0.000
	السيطرة	*94.049	8.917	76.336	111.761	0.000
أثناء العلاج 4 جرعات – فأكثر)	قبل العلاج	*-100.825	7.904	-116.525	-85.124	0.000
	أثناء العلاج(1-3) جرعة	*-44.068	8.917	-61.781	-26.356	0.000
	السيطرة	*49.980	8.917	32.268	67.693	0.000
السيطرة غير المصابة	قبل العلاج	*-150.805	7.904	-166.506	-135.104	0.000
	أثناء العلاج (1-3) جرعة	*-94.049	8.917	-111.761	-79.336	0.000
	اثناء العلاج (4 جرعات- فأكثر	*-49.980	8.917	-67.693	-32.268	0.000

*وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05.

كما يبين الشكل (4–19) نتائج المتوسطات الحسابية للحركي الخلوي IL-17A في المجاميع المبحوثة والفروقات المعنوية الكبيرة في مستوياته.



شكل (4–19): معدل تركيز الحركي الخلوي IL-17A بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة.

ويشير الجدول (4–16) الى مدى إرتفاع تركيز MCP- 1 لدى المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية 111.039 ± 6.985 بيكوغرام / مل ثم أنخفض بعد العلاج فوصل في مجموعة المرضى المعالجين بعد (1–3) جرعات 71.084±2.636 بيكوغرام/ مل وأنخفض أكثر في المرضى المعالجين بأربع جرعات فأكثر إذ بلغ 49.543 ± 2.167 بيكوغرام / مل بينما بلغ تركيزه في مجموعة السيطرة 12.268 ± 1.609 بيكوغرام / مل. وشكل هذا الإرتفاع فرقاً معنوياً بمستوى دلالة ($P< 0.05$).

جدول (4-16):- تركيز MCP-1 بالبيكوغرام / مل للمجاميع المدروسة.

المجموعة	العدد	المتوسط الحسابي	الأنحراف المعياري ±SD	الخطأ المعياري ±SE	أدنى أستجابة	أعلى أستجابة	مستوى الدلالة
مرضى اللشمانيا الجلدية قبل العلاج	35	*111.039	41.322	6.985	68.02	317.18	0.000
أثناء العلاج(1-3)جرعات	20	*71.084	11.789	2.636	51.82	98.22	
أثناه العلاج 4 جرع فأكثر	20	*49.543	9.692	2.167	33.4	68.54	
السيطرة غير المصابة	20	*12.268	7.194	1.609	0.03	27.58	
* وجود فورق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05.							

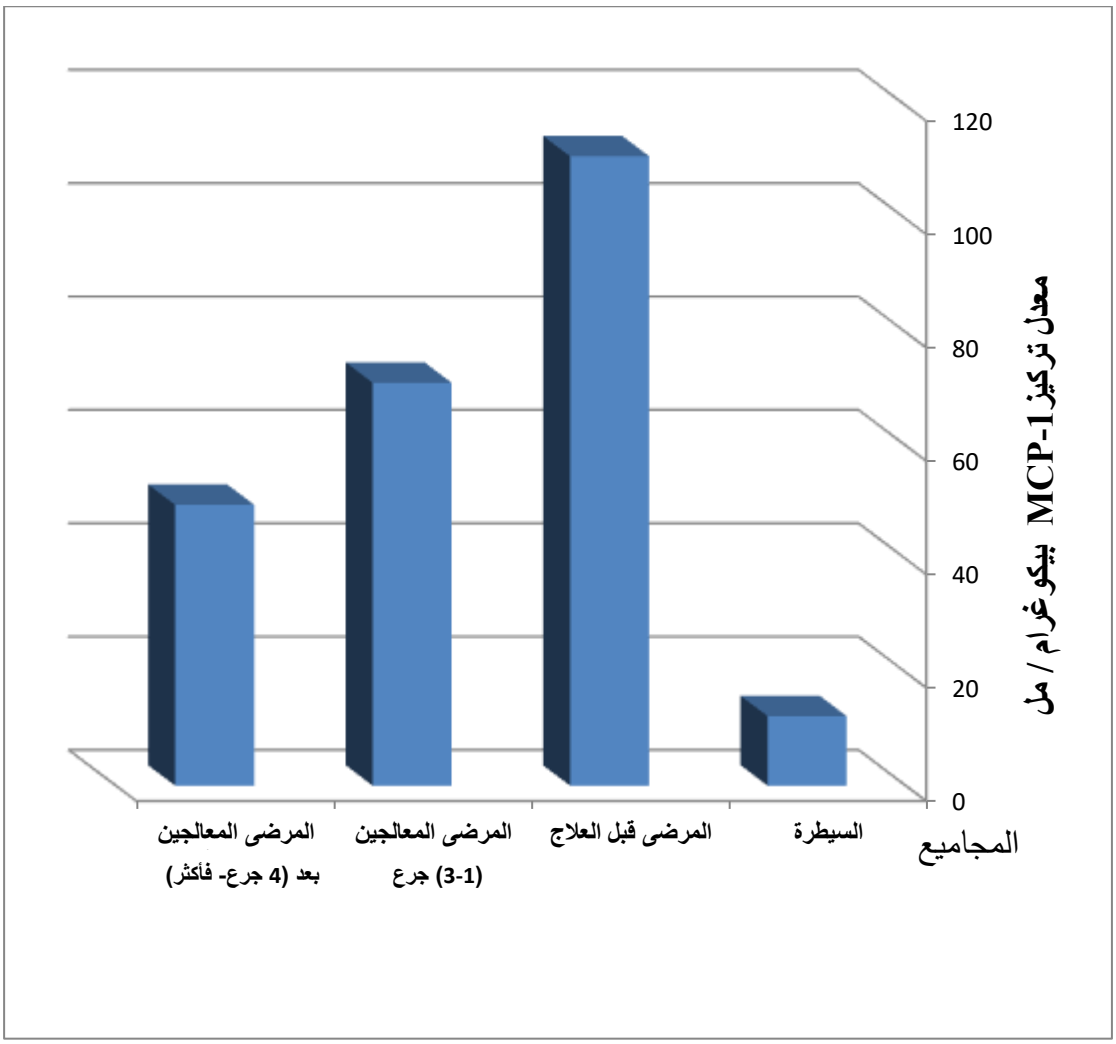
لأجراء المقارنات ما بين المجاميع المدرسة على وفق الفرق في المتوسط الحسابي بالإعتماد على إختبار الأزواج المتقابلة، فعندما أخذت مجموعة المرضى اللشمانيا الجلدية قبل العلاج بوصفها مجموعة ضابطة وبمقارنتها مع المجاميع الأخرى التي شملت (المجاميع المعالجة المختلفة والسيطرة) وجد هنالك فروقات معنوية عالية ($P< 0.05$) وأنعكس ذلك على المجاميع الأخرى بجعل كل منها في كل مرة تمثل مجموعة ضابطة ومقارنتها مع المجاميع الأخرى والجدول (4-17) يوضح ذلك وكانت هنالك فروقات معنوية عالية بين المجاميع.

جدول (4-17):- أختبار Games- Howell ما بين أزواج المجموعات المبحوثة بعد تحليل التباين لـ MCP-1.

المجموعة الضابطة (I)	المجموعة (J)	متوسط الفرق (I-J)	الخطأ القياسي ±SE	فترة الثقة 95%		مستوى الدلالة
				الحد الأدنى	الحد الأعلى	
مرضى اللشمانيا الجلدية (قبل العلاج)	أثناء العلاج (1-3)جرعة	*39.956	7.403	25.252	54.660	0.000
	أثناء العلاج (4 جرعات فأكثر)	*61.497	7.403	46.793	76.202	0.000
	السيطرة	*98.771	7.403	84.068	113.476	0.000
أثناء العلاج (1-3) جرعة	قبل العلاج	*-39.956	7.403	-54.660	-25.252	0.000
	أثناء العلاج 4 جرعات – فأكثر)	*21.542	8.351	4.953	38.130	0.011
	السيطرة	*58.816	8.351	42.227	75.405	0.000
أثناء العلاج 4 جرعات – فأكثر)	قبل العلاج	*-61.497	7.403	-76.202	-46.793	0.000
	أثناء العلاج(1-3)جرعة	*-21.542	8.351	-38.130	-4.953	0.011
	السيطرة	*37.275	8.351	20.686	53.863	0.000
السيطرة غير المصابة	قبل العلاج	*-98.772	7.403	-113.476	-84.068	0.000
	أثناء العلاج (1-3)جرعة	*-58.816	8.351	-75.405	-42.227	0.000
	اثناء العلاج (4 جرعات- فأكثر	*-37.275	8.351	-53.863	-20.686	0.000

* وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05

يبين الشكل (4-20) نتائج المتوسطات الحسابية للجاذب الكيمياوي MCP-1 للمجاميع المبحوثة وكانت هنالك فروقات معنوية كبيرة في مستوياته.



شكل (4–20): معدل تركيز الجاذب الخلوي MCP-1 بالبيكوغرام/ مل في مصول المجاميع المدروسة.

الاستنتاجات والتوصيات

CONCLUTIONS ANA RECOMMENDATIONS

الإستنتاجات Conclusions

١- تعرض جميع الفئات العمرية للإصابة باللشمانيا الجلدية ولكلا الجنسين وأكثر الفئات تعرضاً للإصابة الأقل من عشر سنوات.

٢- زيادة الإصابة بالقرح المتعددة مقارنة بالقرح المفردة وهذا دليل على الإنتشار الواسع للمضيف الناقل المتمثل بذبابة الرمل وإنتشار واسع للمضائف الخازنة.

٣- التأثيرات المرضية النسجية المختلفة التي تحدثها الإصابة في طبقتي البشرة والأدمة من جلد الأنسان وتباين هذه التأثيرات في القرح الحادة والمزمنة.

٤- قدرة المرض هذا على تحفيز الإستجابة المناعية الخلوية مؤدية الى إنتاج العديد من المركبات الخلوية التي لوحظ إرتفاعها لدى مجاميع المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة وشملت IFN- γ, TNF-α, IL-12, IL-17A وMCP-1مما يدعم إشتراكها في التفاعلات الألتهابية.

٥- تأثير العلاج الدوائي بعقار البنتوستام في الإستجابة المناعية وتباين مستويات الحركيات الخلوية سالفة الذكر في مصول المرضى في أثناء العلاج وبالجرعات واسهامها في أحداث الشفاء من الإصابة بإنخفاض تراكيزها خلال المعالجة.

التوصيات Recommendations

١- المتابعة المستمرة لإنتشار المرض في المحافظة وتأثر معدلات الإصابة بعوامل جديدة فرضتها ظروف البلد الأمنية التي اسهمت في تغيير في المجاميع السكانية من خلال عمليات التهجير التي شكلت عاملاً مهماً لتوطن المرض في بعض مناطق المحافظة.

٢- مكافحة المضائف الناقلة ممثلة بذبابة الرمل للحد من إنتشار الإصابات وكذلك الحال للمضايف الخازنة المتمثلة بالقوارض والكلاب وإجراء حملات توعوية وتثقيفية في المدارس والدوائر الحكومية وغيرها لبيان تأثيرات المرض مع تفعيل الحملات الإعلامية لتوقي الإصابة بالمرض.

٣- التشخيص الجزيئي للإصابات باللشمانيا الجلدية لتحديد أنواع الطفيلي في العراق.

٤- بيان تأثير الإصابة بالأنواع المختلفة من اللشمانيا الجلدية والتي تشمل القرح الجافة والرطبة على المستوى التأثير النسجي المرضي والمقارنة بينهما.

٥- دراسة التأثيرات المرضية النسجية الدقيقة في الجلد وعلى مستوى المجهر الألكتروني Electron microscopy التي تحدثها الإصابة باللشمانيا الجلدية.

٦- إحاطة الإستجابة المناعية للإصابة باللشمانيا الجلدية بمزيد من الدراسات لا سيما توضيح أثر الحركيات الخلوية وجاذبات الخلايا ودراسة بروتينات الموت المبرمج في المصل والنسيج.

٧- دراسة العزلات العراقية على المستوى الجزيئي لبيان انواع طفيلي اللشمانيا الجلدية المسبب للقرح الجلدية.

٨- الخلاصة

٩- أجريت الدراسة الحالية على المرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية والمراجعين لبعض المستشفيات والمراكز الصحية في محافظة ديالى للمدة من تشرين الأول 2013 ولغاية نيسان 2014. إذ بلغ عدد المصابين باللشمانيا الجلدية 115 مصاباً وبمختلف المراحل العمرية يضاف لهم 25 شخصاً بوصفها مجموعةً سيطرة (غير مصابة)، وقد سجلت نسبة النساء المصابات بقرح اللشمانيا الجلدية 56.522% وهي اعلى مما في الذكور 43.47% وكانت الفئة العمرية 10 سنوات وأقل أكثر فئة تعرضت للإصابة وبنسبة 47.83% بينما الفئة العمرية التي تراوحت أعمارها من 71-80 سنة أقل الفئات العمرية تعرضاً للإصابة وبنسبة 0.87% وبفروق معنوية عند مستوى إحتمالية أقل من

0.05. وشكلت القرح المتعددة توافراً أعلى وبنسبة 71.304% من القرح المفردة والتي بلغت 28.696% وشهدت القرح ذات الأقطار من سنتمتر واحد وأقل توافراً أكثر وبنسبة 64% بينما تلك التي أقطارها أكثر من سنتمتر واحد نسبة 36% وبفروق معنوية ذات دلالة إحصائية. وتوزعت قرح اللشمانيا الجلدية على مناطق الجسم المختلفة وكانت الإصابات في الوجه هي الأكثر وبنسبة 36.242% وبواقع 54 حالة تلتها الأطراف العليا وبنسبة 33.557% وبواقع 50 حالة ثم الأطراف السفلى وبنسبة 24.1161% وبواقع 36 حالة وجاءت أخيرة القرح في الكتف وبنسبة 1.342% وبفروق معنوية عند مستوى احتمالية أقل من 0.05. وسجلت نسبة الإصابة باللشمانيا الجلدية إرتفاعاً بين رياض الأطفال والطلبة وبنسب 33.043% و 39.130% مقارنة بالكسبة وربات البيوت والموظفين إذ بلغت 24.349% و 3.478% على التوالي وكانت هناك فروقات معنوية ذات دلالة إحصائية عند مستوى الاحتمالية 0.05.

١٠- تم تشخيص الإصابة باللشمانيا الجلدية إعتماداً على التشخيص السريري Clinical diagnosis إستناداً للصفات الشكلية والمرضية للقرح الجلدية وطرائق الزرع Culture methods والطبعات Impression smears والتشخيص النسجي المرضيHistopathological diagnosis. وقد سجلت نتائج التشخيص السريري للإصابة بالقرح الجلدية بنسبة 100% مقارنة بالطريقة المزرعية 10.435% مقابل 74.782% للمسحات الموجبة بينما بلغت نتائج التشخيص النسجي المرضي الموجب 88.571%، شخصت نتائج الزرع إعتماداً على رؤية الطور أمامي السوط Promastigote لطفيلي اللشمانيا في الوسط الزرعي شبه الصلب Semi solid medium بينما اعتمد وجود الطور Amastigote نتيجة موجبة لطريقتي المسحات والفحص النسجي المرضي للخزع النسجية المأخوذة من القرحة، إمتازت طريقة التشخيص النسجي المرضي بكفاءة عالية عززت التشخيص السريري عند مقارنتها بالطرائق الأخرى، وقد سجل هذا الإرتفاع في نسب التشخيص فروقاً معنوية ذات دلالة إحصائية عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05. كما أجريت دراسة لأهم التأثيرات المرضية النسجية للقرح الجلدية الناجمة عن الإصابة باللشمانيا الجلدية لطبقات الجلد المصاب وعلى مستوى المجهر الضوئي، إذ تركزت التأثيرات المرضية في طبقة البشرة Epidermis على فرط التقرن Hyperkeratosis وفرط التنسج الورمي الكاذب Pseudoepitheliomatous والتقرحاتUlcers وظهور لون داكن وتثخنات في هذه الطبقة يصاحبها التقيحات والتقشر للحالات المزمنة. أما فيما يخص طبقة الأدمة Dermis فشهدت إرتشاحاً Infiltration للخلايا الألتهابية المختلفة شملت

الخلايا البلازمية Plasma cells والخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages والخلايا اللمفية Lymphocytes والخلايا الحمضة Eosinophil وإضطراب في ترتيب طبقاتها خصوصاً للقرح الحادة Acute ulcers بينما كانت التأثيرات المرضية أكثر في القرح المزمنة Chronic ulcers، إذ لوحظ ظهور الإلتهاب الحبيبي Granulomatous inflammation والتنخر Necrosis وكانت الأطوار اللاسوطية متواجدة داخل الخلايا البلعمية وخارجها.

١١- تم التحري أيضاً على التغيرات المناعية المصاحبة للإصابة لدى المرضى والمعالجين موضعياً بعقار البنتوستام Pentostame (Sodium stibogluconate) ومجموعة السيطرة غير المصابة من خلال قياس مستويات الحركيات الخلويةIFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-17A والجاذب الخلوي MCP-1، إذ إرتفع تركيز الحركي الخلوي IFN-γ في مصول مرضى اللشمانيا الجلدية فبلغ 54.118± 1.740 بيكوغرام/مل ثم أنخفض في أثناء العلاج فبلغ 34.421± 0.984 بيكوغرام/ مل بعد (1-3) جرعة علاج وأنخفض أكثر بالجرع الآتية من العلاج (من 4فأكثر) وسجل 22.498 ± 0.795 بيكوغرام/مل مقارنة بمجموعة السيطرة غير المصابة 5.092 ± 0.805 بيكوغرام /مل وكذلك الحال TNF-α الذي أرتفع في مصول مرضى اللشمانيا الجلدية وبلغ 98.145 ± 2.925 بيكوغرام وشهد إنخفاضاً في أثناء العلاج 71.507 ± 2.901 بيكو غرام/مل و 48.381 ± 2.379بيكوغرام بعد (1-3) جرعة علاج وأكثر من 4 جرعات علاج على التوالي بينما كان معدله في السيطرة 13.173 ± 1.388بيكوغرام/مل، وزاد مستوى الحركي الخلوي IL-12 في مصول مرضى اللشمانيا الجلدية وسجل تركيزاً 845.598 ± 16.273 بيكوغرام/مل في حين أنخفض في أثناء العلاج وبلغ 619.164 ± 20.209 بيكوغرام/مل و495.578 ± 27.038 بيكوغرام/مل على التوالي أما السيطرة 160.222 ± 11.761 بيكوغرام/مل. وسجل الحركي الخلوي IL-17A 227.268 ± 5.027 بيكوغرام/مل لدى المصابين باللشمانيا الجلدية ثم أنخفض أثناء العلاج ووصل الى 170.512 ± 5.481 بيكوغرام/مل و 126.443 ± 5.565 بيكوغرام/مل بعد (1-3) جرعات علاج وأربع فأكثر على التوالي، أما الجاذب الكيميائي MCP-1 فقد أرتفع تركيزه لدى مرضى اللشمانيا الجلدية وبلغ 111.0397 ± 6.985 بيكوغرام/مل ثم انخفض في أثناء العلاج ووصل الى 71.084 ± 2.636 بيكوغرام/مل بعد 1- ثلاث جرعات علاج ثم أنخفض أكثر 49.543 ± 2.167 بيكوغرام/ مل بعد أربع جرعات وأكثر بينما كان في السيطرة 12.268

± 1.609 بيكوغرام/ مل، وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي فروقات معنوية ذات دلالة إحصائية بين هذه الحركيات ومجاميعها عند مستوى إحتمالية أقل من 0.05.

الفصل الخامس CHAPTER FIVE

5- المناقشة Discussion

يعد داء اللشمانيا الجلدية من المشاكل الصحية المهمة في العديد من أقطار العالم ومن الأمراض التي تعطى الأولوية القصوى في برنامج منظمة الصحة العالمية (Khan, 2005).

سجلت الدراسة الحالية إرتفاعاً في نسبة إصابة الإناث عن نسبة الذكور إذ كانت نسبة إصابة الإناث 56.522% بينما نسبة إصابة الذكور 43.478%. وشكل هذا الإرتفاع فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية أقل من 0.005 وقد يرجع سبب هذا الى عدد الحالات المرضية المراجعة لبعض المستشفيات والمراكز الصحية من الإناث أكثر من الذكور, إذ أن الدراسة ليست وبائية فقد شملت عينة من مجتمع محدد من بعض مناطق محافظة ديالى وكما يمكن أن يعود ذلك الى أسباب إجتماعية كزيادة عدد السكان والتوسع العمراني والزراعي والتغيرات البيئية التي تؤمن نشاطاً جيداً للحشرة الناقلة، وقد يرجع سببه أيضاً الى إنخفاض مناعة الإناث عن الذكور بسبب الحمل والأنجاب (Bailey and Diana, 2007). وهذا يتفق مع ما توصل اليه كل Aytekin (2004) *et al.* و Fellah *et al.* (2007), الذين أشاروا الى نسبة إرتفاع الإصابة عند الإناث عن الذكور وأرجعوا أسباب ذلك لما ذكر أعلاه، كما لا تتفق نتائج الدراسة مع ماتوصل اليهِ الطائي (2002) و Abdellatif *et al.* (2013) والزغيبي وآخرون (2013) إذ سجلوا إرتفاعاً في نسبة الذكور عن الإناث فأرجعوا الأسباب الى كبر المساحة السطحية المعرضة للسع في الذكور عن الإناث بسبب التقاليد الإجتماعية في ملبس الإناث عن الذكور فضلاً عن تأثير الهورمونات الجنسية في

الإستجابة المناعية. فالمرض يصيب الإناث والذكور على حد سواء، بحيث كلا الجنسين معرضين للإصابة عن طريق لسعة ذبابة الرمل المصابة وبفرص متساوية.

أظهرت الدراسة تأثير المرحلة العمرية في نسب الإصابة باللشمانيا الجلدية للمرضى البالغ عددهم 115 مريضاً لأعمار مختلفة تراوحت أعمارهم ما بين شهرين الى 75 سنة وبمعدل 12.7 سنة مع وجود فروق معنوية بمستوى $P < 0.05$ بين تكرار نسب الإصابة للفئات العمرية المختلفة، إذ كانت أعلى نسبة إصابة في المرحلة العمرية أقل من 10سنوات وبنسبة47.83% والفئة العمرية التي تليها 11– 20 سنة بنسبة29.06% وأقلها في المرحلة العمرية 71–80 سنة بنسبة 0.87% ويعزى السبب الى عدم تطور الجهاز المناعي لدى الفئات العمرية الصغيرة مقارنة بالأعمار الكبيرة وهذا يتفق مع ما أشار اليه الألوسي ودحام (2011) اللذان أشارا الى هذا الإستنتاج نفسه. غير أن النتائج لا تتفق مع ما توصل اليه شعبان والنحاس (2003) إذ سجلا أعلى نسبة إصابة عند الفئة العمرية16–40 سنة بنسبة 57.83% وذلك يعود الى التدهور الكبير في المناعة أو تعرضهم الى أمراض أخرى تسبب ضعف الجهاز المناعي وان الإستجابة المناعية لطفيلي اللشمانيا تعتمد على المناعة الخلوية (الخلايا التائية المساعدة Th1) بالدرجة الأولى في حين تعتمد القابلية للعدوى على أفرازات المناعة الخلطية Th2، إذ تفرز خلايا Th1 كل من الحركيات الخلوية IL-2 و IFN- γ الذي ينشط الخلايا البلعمية التي تعمل على أنتاج أوكسيد النتريك NOS2 الذي يساهم في قتل الأطوار اللاسوطية الموجودة داخل الخلوية (الخلايا البلعمية) مقارنةً بالمناعة الخلطية خلايا (Th2) التي تحدد الإستجابة الخلوية عن طريق إفرازها كل من الحركيات الخلوية IL-10 و IL-4 اللذين يعملان على تثبيط الخلايا البلعمية وبذلك تساعد الطفيلي على النمو والتكاثر (Awasthi *et al*.,2004).

وعند مقارنة عدد القرح الجلدية فقد أظهرت النتائج أن نسبة الإصابة بالقرح المتعددة كانت أعلى71.30% من نسبة الإصابة بقرحة منفردة وبنسبة 28.69% وهذا يعود الى نشاط الحشرة

الناقلة لطفيلي اللشمانيا الجلدية وانتشارها الذي أسهم في تعرض الأشخاص الى لسعات متعددة أدت الى ظهور قرح متعددة في مناطق المكشوفة من الجسم وبأوقات متقاربة جداً لم يسمح بتكوين الإستجابة المناعية ضد الإصابة (Machado *et al*., 2011). وهذا يتفق مع ما أشار اليه Al-Samarai and Al-Obaidi (2009) اللذين بيّنا زيادة الإصابة بالقرح المتعددة مقارنة بالمفردة في حين لا تنسجم مع ما اشار اليه Gumurdulu *et al.* (2004) وكاظم (2012)، إذ بينا أن نسبة الإصابة بقرحة واحدة أعلى من نسبة الإصابة بقرح المتعددة. وقد أشار كاظم (2012) الى أن نشاط الحشرة يبدأ من منتصف شهر آب الى أواخر شهر آذار وتبلغ أقصاها في شهر كانون الثاني إذ كان هناك 111 مصاباً بنسبة 18.1% وأقل نسبة إصابة في شهر آذار وبحالة واحدة مُشكلة نسبة 6.5 % ويعود هذا التباين الى نشاط الحشرة الناقلة تبعاً لتوافر الظروف المناخية الملائمة وأهمها إعتدال درجة الحرارة والرطوبة المناسبة لنموها، وقد وجد الكثير من الباحثين أن لإنتشار الحشرة ومدة نشاطها يتأثران بالعوامل البيئية ومنسوب المياه في الأنهار وتساقط الأمطار. ونظراً لتباين طول فترة حضانة المرض التي تمتد من شهرين الى ثمانية أشهر.

عند مقارنة أعداد المصابين بالقرح الجلدية على مناطق الجسم المختلفة فقد أظهرت نتائج الدراسة أن أعلى نسبة هي للقرح التي تصيب الوجه والتي كانت نسبتها36.24% ويرجع السبب الى أنتشار الحشرة الناقلة، عدم وجود مكافحة الحشرات ووجود المضائف الخازنة كالكلاب والقوارض وعمليات النزوح السكان والتهجير الذي فرضته الظروف الأمنية المضطربة وتمركزهم في مساحات صغيرة فيحصل هناك بؤر صغيرة للإصابة تتمركز في بعض المحافظات، كما ان الوجه غالباً ما يكون الجزء الظاهر الدائم من الجسم مما يجعله أكثر المناطق عرضة للسع. هذا يتفق مع ما توصل اليه Sharquie and Najim (2004) و Rahi *et al.* (2013) بينما ما تتعارض مع Al-Samarai and Al-Obaidi (2009) إذ سجلا أعلى إصابة في الأطراف العليا 57% وأقلها

في الأذن بنسبة 1%. وأظهرت النتائج جميعها فروقاً معنوية بمستوى $P < 0.05$ بين تكرار نسب الإصابة لمختلف الفئات العمرية ولعدد القرح ولمختلف مناطق الإصابة.

أما بالنسبة الى عامل الوظيفة، إذ وجدت أعلى نسبة إصابة لدى الطلبة 39.13% وتليها لدى رياض الأطفال التي بلغت33.43 % ثم الكسبة وربات البيوت24.349% وأقلها نسبة إصابة لدى الموظفين3.47% وقد شكل هذا الإرتفاع فرقاً معنوياً ذا دلالة أحصائية أقل من 0.05 ويعود السبب الى مدى الإستجابة المناعية التي تختلف بأختلاف الأعمار والوعي الثقافي والإجتماعي والصحي لديهم فمثلاً الطلبة والأطفال أكثر عرضة للإصابة مقارنة بالآخرين يرجع السبب الى عدم تطور الجهاز المناعي لديهم مما يجعلهم الأكثر تعرضاً للإصابة. بينما سجلت أعلى نسبة إصابة بالقرح الجلدية التي تكون اقطارها 1 سم وأقل 64% وأقلها نسبة إصابة بالقرح الجلدية التي تكون بقطر اكبر من 1 سم وبنسبة 36 % وشكل هذا فرقاً معنوياً ذا دلالة إحصائية عند مستوى $P < 0.05$.وقد يصل معدل قطر القرح الجلدية الى سبعة سنتمتر (Gumurdulu *et al*., 2004).

اعتمدت الدراسة الحالية على طرائق مختلفة لتشخيص الإصابة باللشمانيا الجلدية منها التشخيص السريري والتشخيص بالزرع والمسحات المصبوغة بصبغة كمزا والتشخيص النسجي باستخدام المجهر الضوئي، فأعتمد التشخيص السريري على ملاحظة القرحة الجلدية التي تبدأ بالظهور على شكل حطاطة Papule أو عقدة Nodule و تتحول فيما بعد الى قرحة مزمنة ذات حافات غير منتظمة (Singh and Sivakumar, 2003)، إضافة الى الأشكال المتعددة للقرح الجلدية تبعاً للعامل المسبب لها الذي يعود الى الأنواع المختلفة لطفيلي اللشمانيا *Leishmania* في العالمين القديم والجديد (Ramirez *et al*., 2000). كما يتم التأكد من التشخيص السريري للإصابة الجلدية قبل إعطاء العلاج عن طريق تطبيق طرائق التشخيص المختبرية المتمثلة بالفحص المجهري المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة كمزا الذي يعد من أسهل التقنيات

المختبرية وأقلها كلفة والأسرع في التحري عن الإصابة (Sharquie *et al*., 2002). كانت نتائج التشخيص الموجبة في الدراسة الحالية كما يلي: إذ سجلت المسحات المصبوغة بصبغة كمزا نسبة74.78 % من مجموع 115 حالة مشخصة سريرياً وأن السبب الذي شكل هذا الإرتفاع في نسبة التشخيص يعود لكون هذه الطريقة تعتمد على ملاحظة الأطوار اللاسوطية Amastigote في المسحات والذي يعتمد بدوره على شدة الإصابة ووقت الإصابة فكلما كانت الإصابة شديدة وحادة توافرت الأطوار اللاسوطية بنسبة أكبر وقد بين Masmoudi *et al.* (2013) ان حساسية هذه الطريقة تتراوح ما بين 64–80% مستندة على الدقة في أخذ المسحة إذ قد تصل في بعض الإصابات دقتها الى 100% وهذا ينسجم مع ما توصلت له الدراسة الحالية. بينما كانت نسبة التشخيص بالزرع قليلة وبلغت 10.435% ان سبب هذا الإنخفاض في التشخيص بهذه الطريقة قد يرجع لأسباب عدة منها قلة اعداد الاطوار اللاسوطية المأخوذة في اثناء الزرع والتي تتحدد بدقة التقني المختبر وقدرته على أخذ العينة من الموقع المناسب من حافة القرحة، كما ان طبيعة القرحة حادة ام مزمنة تتداخل مع اعداد الطفيلي الموجودة، إذ تكون الاطوار اللاسوطية أقل في القرح المزمنة التي مرت عليها فترة طويلة من الزمن (Khalid ;Kassi and Kasi, 2005) *et al*.,2012 واسباب اخرى مرافقة لعملية الزرع منها تواصل التيار الكهربائي في الحاضنة في أثناء فترة الزرع وعدم حصول تلوث بالفطريات والبكتريا الذي يؤثر في دقة النتائج، وأن توافر الظروف الملائمة في أثناء هذه العملية قد يصل بنسبة التشخيص بهذه الطريقة الى 100%. ويبين Faber *et al*. (2003) ان درجة حساسية هذا الفحص تتراوح بين 40–84%، بحيث تتطلب طريقة الزرع وجود أعداد كبيرة من الطفيليات اللشمانيا للحصول على نسبة موجبة عالية ويعزى السبب الى وجود أعداد قليلة من الطفيلي اللشمانيا في القرح الجلدية وخاصة عندما تكون الإصابة في المرحلة المزمنة Chronic phase. تكشف طريقة التشخيص النسجي عن وجود طفيلي اللشمانيا الجلدية واهم التغيرات النسجية المرضية المرافقة لطبقتي البشرة والأدمة، فقد بين

التشخيص النسجي الحالي نسبة الإصابة باللشمانية الجلدية 89% من مجموع 35 خزعة نسجية التي تدل على وجود الاطوار اللاسوطية داخل – خارج الخلايا البلعمية. بينما أشار Khalid *et al.* (2012) الى ان نسبة التشخيص النسجي المرضي وبوجود أجسام لشمان LD bodies تصل الى 43%من الخزع النسجية للمرضى المصابين *L. tropica* في حين تباينت نسب التشخيص بهذه الطريقة وتراوحت بين 38–75% في بعض الدراسات (Andrade-; Rawlins *et al*.,2001 Narvaez *et al*., 2001) وقد يرجع اسباب النسب المنخفضة في التشخيص الى تحول القرح الحادة الى المزمنة مما يسبب قلة في الاطوار اللاسوطية داخل وخارج الخلايا البلعمية مما يصعب التشخيص النسجي لتوافر هذه الاطوار وميل تلك القرح للشفاء الذاتي وهذا لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية التي أشارت الى إرتفاع نسبة التشخيص بهذه الطريقة مما يؤكد ان اغلب القرح هي حادة نتيجة لإرتفاع نسبة التشخيص يدعم ذلك ما توصل له Gumurdulu *et al*. (2004) في عدم تواجد الاطوار اللاسوطية في 10–20 % من العينات المفحوصة. يرتبط التأثير المرضي لطفيلي اللشمانيا بأنواعه المختلفة مع نوع سلالة الطفيلي Strain، عدد الطفيليات في اللسعة الواحدة والحالة المناعية للمضيف (WHO, 2014)، ويحدد نوع السلالة مسار الإصابة باللشمانيا فهي أما ان تتحدد بالجلد كما هو الحال في اللشمانيا الجلدية Cutaneous leishmaniasis او تتجه الى الأحشاء Visceral leishmaniasis. وفي العراق وتحديداً في المناطق الوسطى تكون الأنواع المسؤولة عن الإصابات باللشمانيا الجلدية هي *L. tropica* المسببة للقرح الجافة و*L. major* المسببة للقرح الرطبة (Al-Aubaidi, 2007) لهذا فقد تنوعت التأثيرات المرضية للإصابات بالقرح الجلدية مابين القرح الجافة والرطبة. والتي تبدأ بحطاطة صغيرة على الجلد ما تلبث ان تكبر مكونة عقدة Nodules قد يتقشر سطحها الخارجي.

فقد تباينت التأثيرات المرضية النسجية في طبقة البشرة إذ شملت الفرط التقرن الجلدي Hyperkeratosis، وتغلظ طبقة الجلد الحسكية (حُساك) Acanthosis، خُطل التقرن أو ما

يسمى بالتقرن الصدفي الشكل Parakeratosis، فرط التنسج بتكوين Psedoepitheliomatous hyperplasia وزيادة في الخلايا الصبغية Melanocytes. وهذه النتائج تؤكد ما توصل له Mehregan *et al*. (1997) في ظهور التأثيرات المرضية النسجية السالفة الذكر الكثيرة للبشرة المصابة مضافاً اليها حدوث الضمور Atrophy لخلايا البشرة وتفجي الخلايا Hydropic degeneration لطبقة الخلايا القاعدية التي يلاحظ أحياناً. وبينت النتائج ايضاً عدم ملاحظة الأطوار اللاسوطية في خلايا طبقة البشرة مؤكدة ما أوضحه (Schurr *et al.* 1987) الى عدم توافر الاطوار اللاسوطية في خلايا البشرة وتحديداً في الخلايا المتقرنة Keratinocytes. واسفرت نتائج الدراسة الحالية عن حصول الارتشاح الخلوي الالتهابي Dermal inflammatory infiltration في الادمة يتضمن كل من الخلايا اللمفاوية Lymphocytes، الخلايا النسجية Histocytes، كريات الدم البيض الحمضة والعدلة Eosinophil and Nutrophil leukocytes كما يتوافق مع ما جاء به Souza *et al*. (2000) و Sharquie and Hameed (2012) يصاحبه التوافر الكثير للاطوار اللاسوطية داخل وخارج الخلايا البلعمية واللمفية والعملاقة والنسجية وخاصة في القرح الحادة وأكدت هذه الحالة دراسات سابقة (Mashhood *et al.*, 2014 ;Amin and Khedr, 1999) ولوحظ ان الورم الحبيبي Granuloma نادراً ما يتكون في القرح الحادة ويتكون نتيجة الزيادة العالية في ارتشاح الخلايا الالتهابية وتجمع الخلايا البلعمية بمجاميع تفقد طبقة الادمة تطبقها الطبيعي وسجلت الدراسة الحالية ظهور الورم الحبيبي في بعض الحالات نتيجة تفاقم الإصابة. وظهرت الاطوار اللاسوطية Amastigotes داخل والخلايا المصابة وخارجها سواء كانت الخلايا الملتهمة او الخلايا العملاقة مع تأثيرات مرضية مصاحبة منها ظهور الأحتقانات الدموية Congestions في بعض مناطق الأدمة, كذلك سجلت حالات من بدايات تكوين الاورام الحبيبية Granulomas الناجمة عن تجمعات للخلايا البلعمية او الخلايا النسجية Histocytes والبلازمية وهذا يوافق ما

اشار اليه Andrade-Narvaez *et al*. (2005) في دراسته للتغيرات المرضية المصاحبة للقرح الناجمة عن الإصابة بطفيلي *L. mexicana* في المكسيك لحالة تكوين الاورام الحبيبية. كذلك ظهرت مناطق تنخر خلوي Cellular necrosis في بعض مناطق الادمة نتيجة الإصابة كأحد التأثيرات المرضية المهمة في الدراسة الحالية وجاء هذه النتيجة منسجمة لما اشار اليه Moravvej *et al.* (2013) كتأثير مرضي للقرح الناجمة عن اللشمانيا الجلدية للعالم القديم في ايران. وقد تشابهت التأثيرات المرضية للقرح الجلدية في الحيوانات ايضاً فقد بين Ramos-Vara *et al.* (1996) للتأثيرات المرضية للقرح الجلدية في الخيول المصابة باللشمانيا الجلدية حدوث الإرتشاح الخلوي للخلايا الالتهابية وتكوين الاورام الحبيبية في الادمة. ولاحظ Sharquie and Hameed (2012) ان الإصابة باللشمانيا الجلدية في العراق تسبب ما يعرف Panniculus في طبقات الجلد العميقة للمصابين باللشمانيا الجلدية.

أما بالنسبة للدراسة المناعية تم التحري عن اهم التغيرات المناعية المرافقة للإصابة باللشمانيا الجلدية وكذا الحال للمرضى المعالجين موضعياً بالحقن بعقار البنتوستام Pentostame ومجموعة السيطرة غير المصابة، اذ ارتفع تركيز الحركي الخلوي IFN- γ في مصول المرضى54.118±1.740 بيكوغرام/مل ثم أنخفض في أثناء العلاج فوصل تركيزه 22.498 ±0.795 بيكوغرام/مل بعد اربع جرعات واكثر مقارنة بمجموعة السيطرة غير المصابة 5.092±0.805 بيكوغرام/مل. شهدت المقارنات بين المجاميع المختلفة فروقات معنوية عند مستوى احتمالية اقل من0.05, كما في جدول (4–8) , يرجع سبب ذلك لحدوث الإستجابة المناعية للمضيف نتيجة الإصابة وتنشيط الخلايا التائية المساعدة من النوع الأول Th1 التي تعمل على أنتاج IFN- γ الذي ينشط بدوره الخلايا العملاقة لتقوم بعملها بقتل الطفيليات وفق الالية المعتمدة على الاوكسجين فينتج بيروكسيد الهيدروجين السام، كما يفرز ايضاً انزيم INOS2 لتكوين اوكسيد النتريك NO الذي يعمل على قتل الطور اللاسوطي داخل الخلايا وبذلك يعد هذا

الحركي الخلوي جزيئة المفتاح Key molecule في الإستجابة المناعية لما له أثر مهم في القضاء على الكثير من الممرضات الداخل الخلوية (Roitt *et al*., 2001).

واشار Souza *et al.* (2000) الى ان الإستجابة المناعية ضد الإصابة بانواع اللشمانيا المختلفة تتحدد بنوع الجنس المسبب للإصابة, فوجد عند إصابة الفئران بالنوع *L. major* يحصل تحفيز للإستجابة المناعية النوع الاول Th1 وتنتج IFN- γ و IL-10 بينما عند الإصابة بالنوع *L. amazonesis* يرتفع تركيز IL-4 مما يساعد على نمو الطفيلي وتكاثره داخل الخلايا البلعمية ولا يرتفع تركيز IFN- γ و IL-10 بمراحل متأخرة من الإصابة يحدث تجمع للخلايا البلعمية وداخلها الاطوار اللاسوطية محدثة التنخر Necrosis والالتهابات الورمية الحبيبية Granuloma وتتفق نتائج هذا الحركي مع ما وجده Mahmoodi *et al*. (2005) من خلال إرتفاع تركيز هذا الحركي خلال الإصابة باللشمانيا الجلدية.

كما بينت نتائج الدراسة الحالية حصول إرتفاع للحركي TNF-α في مصول المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية وإنخفاضه في أثناء العلاج مقارنة بمجموعة السيطرة وبفروق معنوية بمستوى احتمالية اقل من 0.05، كما مبين في جدول (4–10)، ان زيادة انتاج TNF-α في اثناء الإصابة نتيجة لافرازه من الخلايا البلعمية لتكوين NO اللازم لقتل الطفيلي، إذ بين Akman *et al*. (2000) الى زيادة انتاج TNF-α من قبل الخلايا البلعمية للسيطرة على طفيلي *L. major* ويعد TNF-α من الاشارات المهمة وخصوصاً TNF-β اللازمة لتنشيط الخلايا البلعمية Green *et al*. (1990)، وفي دراسة داخل الزجاج *in vitro* للخلايا البلعمية للفئران المعرضة للإصابة باللشمانيا *L. major* لوحظ انتاج تراكيز عالية من TNF-α مما عمل على قتل الطفيلي لتكوين NO السام (Belosevic *et al.*, 1988) وجاءت نتائج الدراسة الحالية منسجمة مع ذكر.

وبينت الدراسة الحالية حصول إنخفاض لتراكيز IFN- γ و TNF-α في اثناء العلاج كنتيجة لتماثل المرضى للشفاء وقدرة الخلايا البلعمية للسيطرة على الإصابة وهذا يتفق مع ما وجده Junior *et al*. (2002) في إنخفاض IFN- γ و TNF-α لمستويات هذه الحركيات بعد العلاج من الإصابة باللشمانيا الجلدية وعدها كأحد المؤشرات المهمة لتقييم الإستجابة المناعية للإصابة باللشمانيا الجلدية. وكذا الحال لدراسة Khoushdel *et al.* (2008) من دراسته للإستجابة المناعية للشمانيا الاحشائية وحصول الإنخفاض في تراكيز هذه الحركيات بعد العلاج. وقام Kocyigit *et al*. (2002) ببحث قيم فيه تراكيز بعض الحركيات الخلوية في اثناء الإصابة باللشمانيا الجلدية منها IL-1β, IL-6,IL-8 وTNF-α ولاحظ إرتفاع مستواه عند الإصابة ثم إنخفاضه بعد العلاج.

وشهد الحركي الخلوي IL-12 إرتفاعاً في تراكيزه عند المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية845.598 ± 16.273بيكوغرام/مل ثم انخفض في اثناء العلاج فوصل لمستوى495.578 ±27.038 بيكوغرام/مل مقارنة بمجموعة السيطرة 16.222± 11.761بيكوغرام/مل وبفروقات معنوية عند مستوى احتمالية اقل من0.05, وان هذا يعود للأثر الذي يتركه IL-12 في تنظيم الإستجابة الفطرية وتحديد نوع الإستجابة المناعية المكتسبة، كما اشار Hamza *et al*. (2010) الى دور IL-12 الذي يحفز على انتاج IFN- γ والخلايا التائية من النوع الاول Th1 كما يعمل على تنشيط الخلايا اللمفاوية السمية التائية وخلايا القتل الطبيعي واثبت Mattner *et al*. (1996) وجود إرتفاع مستوى IL-12 عند الإصابة بداء اللشمانيا اذ يحفز خلايا Th1 للتخلص من الطفيلي.

اوضح Scharton-Kersten *et al*. (1995) ان الإصابة التجريبية للفئران بعزلة *L. major* تحدث إنخفاضاً في IL-12 في الحالات المزمنة بينما الحالات الحادة يرافقها إرتفاعاً في مستواه بموازاة الإرتفاع بتركيز IFN- γ. وتبين من دراسة Mutiso *et al*. (2013) ان الخلايا الشجيرية

Dendritic cell (DC) والخلايا البلعمية التي تسهم بأثر فاعل على انتاج IL-12 يعمل على تعزيز دور الخلايا القاتلة الطبيعية في القتل والانتاج الحركي الخلوي IFN- γ وتفضيل إستجابة الخلايا التائية Th1. ان الأثر المهم للحركي الخلوي IL-12 في حدوث الإستجابة المناعية ضد اللشمانيا الجلدية تجلى واضحاً في دراسات Mathew *et al*. (2000) و Trinchieri (2003) و Awasthi *et al*. (2004) التي اشارت لإرتفاعه في مجاميع المرضى المصابين في اللشمانيا الجلدية ويأتي هذا منسجماً مع نتائج الدراسة الحالية.

ان لدور IL-12 لتحفيز خلايا Th1 على انتاج IFN- γ والذي بدوره يحفز الخلايا البلعمية على قتل الطفيلي بدى واضحاً فيما بين Sypek *et al.* (1993) عند حقن الفئران المصابة باللشمانيا الجلدية بتراكيز من IL-12 حدثت إستجابة سريعة للعلاج عند استخدام تراكيز عالية من IL-12.

شهد معدل IL-17A إرتفاعاً في مجموعة المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية إذ كان تركيزه قبل العلاج227.268 ±5.027 بيكوغرام/مل ثم أنخفض في أثناء العلاج ليصل الى 170.512 ±5.481 بيكوغرام/مل بعد 1−3 جرعة من البنتوستام ثم انخفض أكثر بعد اربع جرعات واكثر مقارنة بمجموعة السيطرة غير المصابة الذي كان التركيز فيها 76.463 ± 7.089 بيكوغرام/مل وبفروقات معنوية عند مستوى احتمالية أقل من 0.05 ويعود سبب هذا نتيجة للإستجابة المناعية للمضيف لمستضدات اللشمانيا وتنشيط الخلايا التائية المساعدة نوع Th-17 التي تنتج IL-17A فقد وجد Nylen and Eiedsmo (2012) تراكم لاعداد كبيرة من الخلايا في مناطق الإصابة باللشمانيا الجلدية ومنها خلايا Th17 وكذلك الخلايا العدلة التي تعمل على انتاج الحركي الخلوي IL-17A. وتزداد الخلايا التائية المساعدة نوع Th17 عند التعرض للاصابات الطفيلية وفي تفاعلات الحساسية ويوصف IL-17 من اهم الحركيات الخلوية البادئة

للالتهاب والتي تنتجها Th17 ويأتي هذا منسجماً مع ما وجده Bacellar *et al.* (2009) و Novoa *et al.* (2011) و Katara *et al.* (2013).

أما فيما يخص الجاذب الخلوي MCP-1 فقد اوضحت النتائج ان هناك إرتفاعاً في معدل الجاذب الخلوي MCP-1 في مصول المرضى ووصل تركيزه 111.039 ± 6.985 بيكوغرام/مل ثم انخفض في اثناء العلاج ووصل الى 71.084 ± 2.636 بيكوغرام/ مل بعد (1−3) جرعة من عقار البنتوستام وانخفض اكثر بعد اربع جرعات واكثر مقارنة بمجموعة السيطرة غير المصابة 12.268 ± 1.609 بيكوغرام/مل وشكلت فروقات معنوية عالية عند مستوى احتمالية اقل من 0.05 وهذا يعود للإستجابة المناعية ضد الإصابة وتنشيط الخلايا البلعمية واللمفاوية التي تعمل على انتاج MCP-1، مما ادى زيادته في مجموعة المصابين واشارت دراسة Laufs *et al.* (2002) على مرضى مصابين بالقرح الجلدية نتيجة الإصابة بالانواع *L. tropica* و *L. major* إذ إزداد تركيز هذا الحركي في مصل المصابين الذي يفرز من قبل خلايا Poly morphnuclear cells (PMNs) والذي ينشط باقي الخلايا المناعية اللمفية على انتاج IL-8 والذي يعرف CxCL8 ويمتاز في قدرته على تثبيط نمو الطفيلي داخل الخلايا. وتحدث عملية التنشيط المبكر للخلايا القاتلة الطبيعية بوساطة عوامل جذب كيمياوية منها (MCP-1) و IP-10 و lymphotacin إذ ان هذه الخلايا القاتلة الطبيعية تعمل على تحليل الخلايا البلعمية المصابة بالاطوار اللاسوطية من طفيلي اللشمانيا ان اهمية الخلايا القاتلة الطبيعية تمكن من خلال تنشيط IFN- γ والذي يؤدي دوراً مهماً في دفاعات المضيف (Nylen *et al*., 2003). تناولت دراسة Kumar *et al.* (2010) دور IL-8 و MCP-1 عند الإصابة *L. major* اذ ارتفع مستوى MCP-1 لدى المرضى ووصل الى 39.25±5.29 بيكوغرام / مل ولكن ارتفع تركيزه اكثر بعد العلاج ووصل الى47.77. ±3.03 بيكوغرام /مل وهذا لا يتفق مع الدراسة الحالية التي حدث فيها إنخفاض تركيز هذا الجاذب في اثناء العلاج نتيجة لحصول عملية الشفاء الناجمة عن أثر

MCP-1 لتنشيط البلاعم لإتمام عملية القتل بوساطة NO. إذ ان للعلاج بوساطة Pentavalent antimonial تأثيراً مناعياً محفزاً لإتمام الفعالية المضادة للعوامل المرضية (Kocyigit *et al*., 2002).

-١٢

١٣- ملحق رقم (١)

١٤- استمارة معلومات

١٥- اسم المريض: العمر:

١٦- الجنس: المهنة:

-١٧

١٨- <u>العنوان</u>

١٩- القضاء: الناحية: القرية: المحلة:

٢٠- أقرب نقطة دالة: تاريخ المراجعة: //

-٢١

٢٢- رقم الهاتف:

٢٣- <u>الأعراض المرضية:</u>

٢٤- ١-حبة منفردة ٢-متعدد

٢٥- **موقع الإصابة:**

٢٦- الوجه ( ) الجذع ( ) الأطراف ( )

٢٧- الوجه-الأطراف ( ) الوجه-الأطراف-الجذع ( )

٢٨- **قطر القرحة:**

-٢٩

٣٠- المصادر العربية

٣١- الالوسي، إبراهيم توفيق ودحام، كامل آمال (2011). مسح وبائي لداء اللشمانيا الجلدية في محافظة صلاح الدين. مجلة ديالى للعلوم الزراعية،26(2): 63-67.

٣٢- الحديثي، أسماعيل عبد الوهاب وعواد، عبد الحسين حبش (2000). علم الطفيليات، الطبعة الثانية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل: 486 صفحة.

٣٣- الزغيبي، إحسان محمد صلبي؛ الجبوري، ضمياء أبراهيم علوان والغراوي، علي كريم حسن(2010). دراسة إحصائية ووبائية عن الأصابة بداء اللشمانيا الجلدية المتسبب عن طفيلي Leishmania tropica في محافظة كربلاء، مجلة كربلاء العلمية، المجلد 3:208-215.

٣٤- الطائي، لازم حميد كايد (2002). دراسة تأثير بعض المساعدات الحيوية على الأستجابة المناعية ضد الأصابة بطفيلي اللشمانيا الحشوية في الفئران المختبرية، رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد: 114صفحة.

٣٥- المختار, كواكب عبد القادر والراوي, عبد الحكيم احمد (2000).علم النسج. الطبعة الثانية, دار الكتب والوثائق ببغداد, جامعة بغداد:419 صفحة.

٣٦- حبيب، مفيد عبد اللطيف وحسن، كاظم صالح (2011). دراسة جرثومية لذبابة الرمل Sandflies "Diptera: Psychodidae; Phlebotominae" في البصرة/ جنوب العراق. مجلة أبحاث البصرة،4(37): 1-12.

٣٧- شعبان، مها والنحاس، سمر (2003). وبائية داء اللشمانيا الجلدية لمراجعي مستشفى الأمراض الجلدية والزهرية والعيادات الشاملة في دمشق، مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، المجلد 19 :114-124.

٣٨- كاظم، جابر عودة (2012). وبائية تشخيصية لداء اللشمانيا مع نشاط الطفيلي المسبب بواسطة تقنية PCR والأنواع الناقلة من ذبابة الرمل Sand fly في محافظة ديالى. أطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة تكريت: 203 صفحة.

٣٩- المصادر الأجنبية REFERNCES

40- Abdellatif, M. Z. M.; Elmabrouk, K. and Shmania lousaneis, A. A. (2013). An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Al-Jabal Al-Gharbi, Libya. Kor. J. Parasitol., 51(1): 75-84.

41- Acha, P. N. and Szyfers, B. (1980). Zoonoses and communicable disease common to man and animal. American Health organization, Washington, New York: 401pp.

42- Adler, S. and Theodor, O. (1927). The inoculation of canine cutaneous leishmaniasisinto man and behavior of various strains of *Leishmania* in mice. Ann. Trop. Med. Parasitol., 24:197-210.

43- Afghan, A. K.; Kassi, M.; Kasi, P. M.; Ayub, A.; Kakar, N. and Marri, S. M. (2011). Clinical manifestation and distribution of cutaneous leishmaniasis in Pakistan. J. Trop. Med., 2011(22):8pp.

44- Aggarwal, S.; Ghilardi N.; Xie M. H.; de Sauvage, F. J. and Gurney, A. L.(2003).Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell

activation state characterized by the production of interleukin-17. J.Biol. Chem., 278: 1910-1914.

45- Akman, L.; Aksu, H. S.; Wang, R. Q.; Ozensoy, S.; Ozbel, Y.; Alkan, Z.; Ozcel, M. A.; Culha, G.; Ozcan, K.; Uzun, S.; Memisoglu, H. R. and Chang, K.P. (2000). Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotype predieting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region. J. Eukaryot Microbiol., 47: 545-554.

46- Al-Aubaidi, I. K. (2007). Effect of some plant extracts on growth and viability of cutaneous and visceral leishmanial parasites *in vitro* and *in vivo*. Ph. D. Thesis, Coll. Sci., Univ. Baghdad: 221pp.

47- Al-Jeboori, A. H. (2002). Effect of some antiparasitic agent andmedicinal plant extracts on the growth and metabolism of leishmanial and helminthic parasitic. Ph. D. thesis, Coll. Edu. Univ. Tikrit,:128pp.

48- Al-Mohamadawi, T. A. H.(1989).Comparative study for the immune response and pathogenicity of cutaneous leishmaniasis in two strains of mice (C57/Black and Balb/c). M. Sc .Thesis, Coll. Edu. Ibn Al-Haitham, Univ. Bagdad: ll8 pp.

49- Al-Samarai, A. M. and Al-Obaidi, H. S. (2009). Cutaneous leishmaniasis in Iraq. J. Infect. Develop. Count.,3(2): 123-129.

50- Amin, A. M. and Khedr, M. A. (1999). Histopathological study of three *Leishmania major* strains. J. Kau. Med. Sci., 7(1): 67-75.

51- Anderson, C. F.; Stumhofer, J.; Hunter, C. A. and Sacks, D. (2014). IL-27regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in non healing *Leishmania major* infection. J. Immun., 30 :4619-4627.

52- Andrade-Narvaez, F. G.; Medina-Peralta, S.; Vargas-Gonzalez, A.; Canto-Lara, S. B. and Estrada-Parra, S. (2005). The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania*

mexicana in the Yucatan peninsula, Mexico. Rev.Int. Med. Trop., 47(4):191-194.

53- Andrade-Narvaez, F. J.; Vargas- Gonzalez, A.; Canto-Lara, S. B. and Damian-Centeno, A. G.(2001). Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania mexicana* in the yucantan peninsula, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96: 163-167.

54- Aronson, N.; Coleman, R.; Coyne, P.; Hack, D.; Polhemus, M.; Wortmann, G.; Cox, K.; Weina, P. and Herwaldt, B. L. (2003). Cutaneous leishmaniasis in U.S. Military personnel: Southwest/ Central Asia. Morb. Mort. Week. Rep., 52(42): 1009-1012.

55- Ashford, R. W. and Sang, D. K. (2001). Review of *Leishmania tropica* infection in East Africa. Proceedings of the second international congress on *Leishmania* and leishmaniosis, Hersonissos, Crete, Greece,: 1-14.

56- Ashford, R. W. and Bates, P. A. (1998). Leishmaniasis in the old world. In: Cox,F.E.G., Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley Wilson's microbiology and microbial infections, 9th ed. Parasitoloy, Oxford University Press, New York, USA.,255pp.

57- Asillian, A.; Khamesipour,A. and Modabber,F. (1998). Leishmaniasis postgrad. Doc. Med. Eas., 21(5): 174-181.

58- Assafa, D.; Kibru, E.; Nagesh, S.; Gebreselassie, S.; Deribe, F. and Ali, J. (2004). Medical parasitology. Ethiopia public Health Training initiative, Ethiopia, Med. Rep.: 139pp.

59- Awasthi, A.; Mathur, R.K. and Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. Indian J. Med. Res., 119:238-258.

60- Aytekin, S.; Ertem, M.; Yagdiran, O. and Aytekin, N. (2006). Clinicoepidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Diyarbakir, Turkey. Dermatol. Online J., 12(3): 1-14.

61- Bacellar, O.; Faria, D.; Nescimento, M. Cardoso, T. M.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. Scott, P. and Carvalho, E. M. (2009).

Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. J. Infect. Dis., 200(1): 75-78.

62- Bailey, M. S. and Diana, N.J. (2007).Cutaneous leishmaniasis. Clin. Dermatol.,25: 203-211.

63- Bancroft, J. D. and Stevens, A. (1975). Histopathological stains and their diagnostic uses Churchill Livingstone. Edinburgh.London New York.: 149pp.

64- Bancroft, J. D. & Stevens, A. (1996). Theory and practice of histological techniques. 4th ed., Churchill Livingstone, New York. :766 pp

65- Bari, A. U. and Rahman, S.B. (2008). Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host – parasite – vector inter relationship, J. Pak. Assoc. Dermatol., 18: 42- 48.

66- Baron, S.; Tyring, S. K.; Fleishman, W. R.; Coppenhaver, D.H.; Niesel, D.W.; Klimpel, G.R.; Stanton, G.J. and Hughes, T. K. (1991). The interferons: Mechanism of action and clinical applications. JAMA., 66(10):1375-1383.

67- Beaver, P. C. H. and Jung, R. C. (1985). Animal agents vector's of human diseases. 5th ed. Lea and Febiger, Philadelphia: 281pp.

68- Beck, J.W. and Davies, J. E. (1981). Medical parasitology, 3rd ed. C. V. Mosby, St Louis: 355pp.

69- Belosevic, M.; Davis, C. E.; Meltzer, M. S. and Nacy, C. A.(1988). Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. J. Immunol., 141: 890-896.

70- Berman, J.D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis., 24: 684-703.

71- Berman, J. D. and Nera, F. K. (1981). Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigote within monocyte derived macrophages *in vitro.* Am. J. Trop. Med. Hyg., 149:302-318.

72- Boggild, A. K.; Romos, A. P.; Espinosa, D.; Valencia, B. M.; Veland, N.; Miranda-Verastegui, C.; Arevalo, J.; Low, D. E. and Llanos-Cuentas A. (2010). Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 83(2):345-350.

73- Borish, L. C. and Steinke, J.W. (2003). Cytokines and chemokines, J. Allergy. Clin. Immunol. 111(2): S460-S475.

74- Bosan, A. H.; Dil, A. S.; Kakar, F. and Sadaryddin, A. (2002). The efficacy of intraregional treatment of cutaneous leishmaniasis with Glucantame. Pakistan. J. Med. Res. 41(2): 1 – 5.

75- Bullen, D. V. R.; Baldwin, T. M.; Curtis, J. M.; Alexander, W.S. and Handman, E. (2003). Persistence of lesions in suppressor of cytokine signaling-1 deficient mice Infected with *L. major*. J. Immun., 170:4262-4267.

76- Burns, T.; Breathach, S.; Cox, N. and Griffths, C. (2004). Rooks textbook of dermatology. 7th ed., Sci. Ltd. USA: 157pp.

77- Chapel, H.; Haeney, M.; Misbah, S. and Snowden, N. (1999). Essentials of clinical immunology, 4th edn. Blackwell Sci., Oxford: 351pp.

78- Cheng, T. C.(1973). General parasitology. Acad. Press, New York: 965pp.

79- Corware, K.; Harris, D.; Teo, I.; Rogers, M.; Naresh, K.; Muller, I. and Shaunak, S. (2011). Accelerated healing of cutaneous leishmaniasis in non-healing BALB/c mice using water soluble amphotericin B-polymethacrylic acid.Biomaterials, PMC., 32(1):8029-8039.

80- Cruse, J. M. and Lewis, R. E. (2000). Atlas of immunology. CRC Press, N. Y., USA, 185-209.

81- Cummins, A. J.; Moody, A.H.; Lalloo, K. and Chiodini, P. L.(1994). Development of a rapid latex agglutination test for detection of visceral leishmaniasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 88(3): 300pp. (Abstract only).

82- Dawson, R. M.; Elliot, D. C.; Elliot, W. H. and Jones, K. M. (1969). Data for biochemical research. Claeden Press. Oxford, 508-600.

83- De Doncker, S.; Hutse, V.; Abdellati, S.; Rijal, S.; Singh-Karki, B. M.; Decuypere, S.; Jacquet, D.; Le Ray, D.; Boelaert, M.; Koirala, S. and Dujardin, J. C. (2005). A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 99: 25-31.

84- Donovan, M. J.; Maciuba, B. Z.; Mahan, C.E. and McDowell, M. A. (2010). *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-macrophage apoptosis in a strain dependent manner. Exp. Parasitol. J. 123(1):58-64.

85- El-Deen, L. D.; Al-Hab, J. and Abdulah, S. A. (2006). Clinicoepidemiological study of cutaneous leishmaniasis in a sample ofIraqi Armed Forces. Iraqi J. Comm. Med., 19(2): 98-103.

86- Evans, D. A.; Godfrey, D.; Lanham, S.; Lanotte, G.; Modabber, F. and Schnur, L. (1989). Handbook on isolation, characterization and ctyopreservation of *leishmania.* WHO, Geneva, Switzerland,: 45pp.

87- Faber, W. R.; Oskam, L.; Gool,T. V.; Kroon,N. C. M.; Kristine, K. J. K.; Hofwegen, H.; Vanderwal, A. C. and Kager, P. A.(2003). Value ofdiagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. J. Am. Acad. Dermatol., 49(1):70-74 .

88- Fellah, H.; Rhajoui, M.; Ouahabi, S.; Belghiti, D. and Lyagoubi, M. (2007).Occurrence of human cutaneous leishmaniasis in Zouagha my Yacoub Province (Morocco). Int. J. Agri. Biol., 9 (1):197-198 .

89- Garcia, L. S. and Ash, L.R.(1979). Clinical laboratory manual Mosby, St. Louis, Missouri.: 174pp.

90- Green, S. J.; Crawford, R. M.; Hockmeyer, J. T.; Meltzer, M. S. and Nacy, C. A. (1990). *Leishmania major* amastigotes initiate the L-ariginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- alpha. J. Immunol., 145:4290-4297.

91- Gumurdulu, D.; Ergin, M.; Tuncer, I.; Uzun, S. and Memisoglu, H.(2004). Histopathological and clinical evolution of the cutaneous leishmaniasis in southern Anatolia, Turkey. Aegean Pathol. J., 1(1): 57-61.

92- Hamza, T.; Barnett, J.B. and Li, B. (2010). Interleukin-12 a key immunoregulatory cytokine infection applications, Int. J. Mol.Sci., 11:789-806.

93- Hashimoto, T.; Akiyama, K.; Kobayashi, N. and Mori, A. (2005). Comparison of IL-17 production by helper T cells amongatopic and nonatopicnasthmatics and control subjects. Int. Arch Allergy Immunol., 137(11): 51-55.

94- Herwaldt, B.L., (1999). Leishmaniasis. Lancet , 354, 1191-1199.

95- Humason, G. L. (1979). Animal tissue technique, 4th ed. W. H. Freeman and Co., Francisco.: 661pp.

96- Jacobson, R. L. (2003). *Leishmania tropica* (Kinetoplaslida: Trypanosomatidae) - a perplexing parasite. Folia Parasitol., 50: 241 – 250.

97- Junaid, A. T. (1986). Treatment of cutaneous leishmaniasis with infra-red heat. Int. J. Dermatol., 25:470-472.

98- Junior, A. D.; Machado, P.; Bacellar, O.; Cheng, L. H.; Almeida, R. P. and Carvalho, E. M.(2002). Evaluation of IFN-gamma as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 35(1):1-4.

99- Katara, G. K.; Raj, A.; Kumar, R.; Avishek, K.;Kaushal, H.; Ansari, N. A.; Bumb, R. A. and Salotra, P. (2013). Analysis of localized immune response reveals presence of Th-17 and treg cell in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. BMC. Immunol.,14: 58-66.

100- Kassi, M. and Kasi, P.M.(2005). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by fine needle aspiration cytology: areport of 66 cases.J. Trop. Med., 35(1):50-56.

101- Keitaro, N.; Masayuki, Y.; Seizaburo, A. Maria, O. and Yoshikazu, Y. (2012). Skin accumulation of advanced glycation end products and life style behaviors in Japanese. Anti-aging Med. J., 9(6): 165-173.

102- Khalid,A.;Ahmed,S.A.;Haque,A.U. and Mukhtar,R.(2012). Diagnostic microscopicfeatures of cutaneous leishmaniasis other than *Leishmania tropica* bodies, Intern. J. pathology, 10(1):21-25 pp.

103- Khan, Z. (2005). Cutaneous leishmaniasis in N. W. F. P. J. Pak. Assoc. Dermatol., 19(2): 226-234.

104- Khoushdel, A.; Al-Borzi, A. A. V.; Manouchehr, R. and Elham, T. (2008). Effects of drug therapy of visceral leishmaniasis on serum level of IFN-gamma, IL-10 and IL-12 in visceral leishmaniasis patients. Zahdan J. Res. Med. Sci., 10(1):9-15.

105- Kocyigit, A.; Gur, S.; Gurel, M. S.; Bulut, V. & Ulukanligil, M. (2002). Antimonial therapy induces circulating

proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. Infect. Immun., 70(12): 6589-6591.

106- Kolls, J. K. and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity, 21:467-543.

107- Kumar, R.; Bumb, R. A. and Salotra, P. (2010). Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors. J.Immunology, 130(2):193-201.

108- Kumar, R. Bumb, R.A. and Salotra, P. (2012). Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: interleukin-8, monocytechemotactic protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors Blackwell publishing Ltd., Immunol., 130:130 – 193.

109- Laskay, T.; Rollinghoff, M. and Solbach, W. (1993). Natural killer cells participates in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. Eur. J. Immunol., 23:2237-2241.

110- Laufs, H.; Muller, K. and Fleischer, J. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heal- labile serum factors. Infect. Immun., 70: 826-861.

111- Lainson, R. (1988). Ecological interaction in the transmission of the leishmaniasis. Phil. Trans. Roy. Sco. London., 321:389-404.

112- Lesho, E. P.; Wortmann, G.; Neafie, R. and Aronson, N. (2005). Nonhealing skin lesions in a sailor and a journalist returning from Iraq. Cleveland Clin. J. Med., 72(2): 93-106.

113- Liew, F. Y.; Parkinson, C.; Millott, S.; Severn, A. and Carrier, M. (1990). Tumor necrosis factor (TNF-α) in Leishmaniasis: 1-

TNF-α mediates host protection against cutaneousleishmaniasis. Immunology, 69: 570 – 573.

114- Lukes, J.; Mauricio, I. L.; Schonian,G.; Dujardin, J.; Soteriadou, K.; Dedet, J.; Kuhls, K.; Tintaya, W.; Jirku, M.; Chocholova, E.; Haralambous, C.; Pratlong, F.; Obornik, M.; Horak, A.; Ayala, F.J. and Miles, M. A. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with revision of current taxonomy. Proceeding of the national academy of science USA., 104 (22): 9375-9380.

115- Machado, P. R.; Carvalho, A. M.; Machado, G. U.; Dantas, M. L. and Arruda,S. (2011). Development of cutaneous leishmaniasis after Leishmania skin test. Case reports in Medicine, 3(1): 1-4.

116- Maheshwari, N. (2008). Clinical microbiology and parasitology, 2nded., Jaypee brothers medical publishers (P) LTD, New Delhi, India, 310pp.

117- Mahmoodi, M.; Rajabalian, S.; Fekri,A. and Esfandiarpour, I. (2005). Evaluation of *in vitro* production of IFN- γ- IL-10, IL-12 and IL-13 by blood cells in patients with cutaneous leishmaniasis lesions. Iran. J. Allargy, Asthma and Immunology,4(1):1-21.

118- Markle, W.H. and Makhoul, K. (2004). Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. American Family Physicain, 69(6):1-9.

119- Marquardt, W. C.; Demaree, R. S. and Grieve, R. B. (2000). Parasitology and vector biology. 2nd edition. Academic Press,:59. 1455 –1463.

120- Mary, C.; Faraut, F.; Lascombe, L. & Dumon, H. (2004). Quantification of *Leishmania infantum* DNA bya real-time PCR assay with high sensitivity. J. Clin. Microbiol., 42:5249-5255.

121- Mashhood, A. A.; Ahmad, S. and Malik, M. M. (2014). Is slit-skin smear an alternate to histopathology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis ?, J. Pakistan Assoc.Dermatol.,24(1):34-39

122- Masmoudi, A.; Hariz, W.; Marrekchi, S.; Amouri, M. and Turki, H.(2013). Old world cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. J. Dermatol. Rep., 2: 31-41.

123- Mathews, D. J.; Emson, C. L.; Mckenzie, G. J.; Jolin, H. E.; Blackwell, J. M. and Mckenzie, A. N. J. (2000). IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. J. Immunol., 164(3): 1458-1462.

124- Matsuzaki, G. and Umemura, M. (2007). Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity againstinfections. Microbiol. Immunol., 51:1139–1186.

125- Mattner, F.; Magram, J. Ferrante, J.; Launois, P.; Di padova, K. and Behin, R. (1996). Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. Eur. J. Immunol., 26:1553-1539.

126- McCall, L.; Zhang, W. and Matlashewski, G. (2013). Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. Pathologens org.,9 (1): 1-7.

127- Mckerrow, J. H.(1999). Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action . J. parasitol.,29(6): 833-840.

128- Mehregan, D.R.; Mehregan, D. A. and Mehregan, A. H. (1997). Histopathology of cutaneous leishmaniasis. Gulf J. Dermatol. Venereol., 4 (2): 1-9.

129- Memisoglu, H. R.; Uzun, S. and Uslular, C. (2001). Turkiye's cutaneous leishmaniasis in dermal. Ulusal Clin. Microbiol. Adana, Turkiye, 13:44-46.

130- Mohammed, E. A.; Wright, E. P. and Pondman, K.W. (1985). ELISA using intact promastigote for immunodhagnosis of Kala-azar. Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg., 79: 344-577.

131- Molan, A. and Faraj, A. M. (2010). Concise medical parasitology. First edition, Shabab Printing House-Erbil, Iraq :386 pp.

132- Moseley, T.A.; Haudenschild, D.R.; Rose L. and Reddi, A.H. (2003). Interleukin-17family and IL-17 receptors. Cytok. Gro. Fact. Rev., 14:155-219.

133- Moravvej, H.; Barzegar, M.; Nasiri, S.; Ablhasani, E. and Mohebali, M. (2013). Cutaneouse leishmaniasis with unusual clinical and histoloical presentation: Roport of four cases. Case report, Acta Med. Iran.,51 (4): 274-278.

134- Moseley, T.A.; Haudenschild, D. R.; Rose L. and Reddi, A.H.(2000). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. Cytok. Gro. Fact. Rev., 14:155-219.

135- Mutiso, J. M.; Macharia, J. C.; Gicheru, M. M. and Ozwara, H.(2013). Immunology of leishmaniasis. J. Sci. Parasitol., 14(2):51-61.

136- Najim, W. S.; Salih, Y. I.; Hanna, N. N. and Marbut, M. M. (2007). Assessment of Leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. Tikrit, Med. J., 13(2): 136-140.

137- Nasrabadi, H. N.; Ebrahimi, T. M.; Banadaaki, D. S.; Kajousangi, T. M. and Zahhedi, F. (2011).Study of cutaneous wound healing in rats treated with *Lactobacillus plantarum* on days 1,3,7,14and 21. Afr. J. Pharm. Pharmacol., 5(21): 2359-2401.

138- Neal, R.A.; Bueren, J. V. and Hooper, G. (1987). The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L.major* and *L. enriettiiin vitro* and *in vivo*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 85 (5): 453-456.

139- Novoa, R.; Bacellar, O. Nascimento, M.; Cardoso, T. M.; Ramasawmy, R.; Oliveira, W. N.; Schriefer, A. and Carvalho, E. M. (2011). IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. Parasite Immunol., 33(2):132-136.

140- Nylen, S. and Eiedsmo, L. (2012). Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol., 34: 551-561.

141- Nylen, S.; Maasho, K.; Soderstrom, K.; Ilg, T. and Akuffo, H. (2003). Live *Leishmania* promastigote can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. Clin. Exp. Immunol., 131(3):457-467.

142- Odom, R. B.; James, W. D. and Berger, T. G. (2000). Andrew's diseases of the skin: Clinical dermatology, 9thedn., W.B. Saunders, Philadelphia: 536pp.

143- Oppenheim, J. J.; Ruscetti, F. W. and Flatynek, C. (1994). Cytokines. In:Basic and clinical immunology. 8th ed., Large Med. Pub., USA,: 105-122.

144- Paniker, C. J. (2007). Textbook of medical parasitology-6th edition. Ajanta Offset and Packaging, Medical publishers, LTD., New Delhi, 248pp.

145- Rahi, A. A. (2010). Cutaneous leishmaniasis waist governorate. Baghdad. Sci. J., 8 (2): 286-288.

146- Rahi, A. A.; Nsaif, S.; Hassoni,J.J. ; Ali, M. A. and Hamza, H. A. (2013). Comparison of diagnostic methods in cutaneous leishmaniasis in Iraq. Am. J.Bio. Sci.,1(1): 1-5.

147- Ramirez, J. R.; Agudelo, S. and Muskus, C. (2000). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. J. Clin. Microbiol., 38: 3768-3773.

148- Ramos-Vara, J. A.; Ortiz-Santiago, B.; Segales, J. and Dunstan, R.W. (1996).Cutaneous leishmaniasis in tow horses. Vet. Pathol. online, 33(1):731-734.

149- Ravanbod, M. (2000). Kala-azar in Adults: Acae presentation and review, Sem. J., 3 (4):1-21.

150- Rawlins, S. C.; Tiwari, T.; Chadee, D. D.; Validum, L. Alexander, H.; Nazeer, R. and Rawlins, R. S.(2001). American cutaneous leishmaniasis in Guyana, South America. Ann. Trop. Med. Parasitol., 95:245-251.

151- Reithinger, R. and Dujardin, J. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. J. Clinic. Microbiol., 45(1):21-25.

152- Roberts, L. S. and Janovy, J. (2005). Foundation of parasitology, 7th edition, Higher education, The McGraw. Hill companies, Inc., New York., 405pp.

153- Roberts, M. T. M. (2006). Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. Bri. Med. Bull.,76: 115-130.

154- Rohousova, I.; Subrahmanyam, S.; Volfoa, V.; Mu, J.; Volf, P.; Valenzuela, J.G. and Jochim, R. C. (2012). Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and

Phlebotomus sergenti, vectors of leishmaniasis. Plos. Ints. Org., 6 (5): 1-27.

155- Roitt, I., Brostoff, J. and Mole, D. (2001). Immunology 6th ed., Mosby, Spain: 243-260.

156- Rosenblatt, J. E. (2009). Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasite. Clin. Inf. Dis., 49(7): 1103-1108.

157- Salora, P.; Sreenivas, G.; Ramesh, V. and Sundar, S.(2001). A simple and sensitive test for field diagnosis of post Kala-azar dermal leishmaniasis. Brit. J. Dermatol. 145(4): 630-632.

158- Sarkar, A. (2008). A text book of parasitology. Sachin printers, New Delhi,:254pp.

159- Scharton-Kersten, T.; Afonso, L.C.; Wysocka, M.; Trinchieri, G. and Scott, P. (1995). IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper-1 cell development in experimental leishmaniasis. J. Immunol., 154(10):5320-5330.

160- Schoone, G.J.; Hailu, A.; Kroon, C. C.; Nieuwenhuys, J.L.; Schallig, H. D. and Oskam, L. (2001). A fast agglutination-screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.,95(4):400-401(Abstract only).

161- Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004). Interferon-γ: an overview of signals, mechanisms and functions. J. Leuk. Biol., 75: 163-189.

162- Schurr, E.; Wunderlich, F. and Tadesse, G.(1987). Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. Acta. Trop., 44:395-407.

163- Sharma, R. C.; Mahajan, V. K.; Sharma, N. L. and Sharma, A. (2003). Anew focus of cutaneous leishmaniasis in Himachal Pradesh (India). Ind. J. Dermatol. Venereol. Leprol., 69(2): 170-172.

164- Sharquie, K.E.; Hassan, A.S.; Hassan, S. A. and Al-Hamami, I. A. (2002).Evaluation of diagnosis of cutaneous leishmaniasis by direct smear, culture and histopathology. Saudi Med. J., 23: 925-928.

165- Sharquie, K. E. and Najim, R. A. (2004). Disseminated cutaneous leishmaniasis. Saudi. Med. J.,25 (7):951-954 .

166- Sharquie, K. E. and Hameed, A.F. (2012). Panniculitis is an important feature of cutaneous leishmaniasis pathology. Hindawi publishing corporation, Case reports, Dermatol. Med.,:1-4.

167- Shirian, S.; Oryan, A.; Hatam, G. R. and Daneshbod, Y. (2012). Mixedmucosal leishmaniasis infection caused by *L. tropica* and *L. major*. J. Clin. Microbiol., 50(11): 3805-3808.

168- Sidding, M.; Ghalib, H.; Shillington, D. C. and Petersen, E.A. (1998). Visceral leishmaniasis in Sudan: Comparative parasitological methods of diagnosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med.,3(2):23-28.

169- Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J. Med. Res., 123(3): 311-330.

170- Singh, S. and Sivakumar, R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. JPGM.: 55-60.

171- Sivakumar, V. (2004). Studies on the kinesinrelated antigen of *Leishmania donovani* and its diagnostic application. Indian Inst. Med. Sciences, Ph.D. Thesis, New Delhi, India,:128pp.

172- Salora, P.; Sreenivas, G. and Pogue, G. P. (2001). Development of a specific PCR assay for detection of *L. donovani* in clinical samples form patients with kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. J. Clin. Microbiol., 39:849-854.

173- Soares, R. P.; Barron, T.; McCoy-Simandle, K.; Svobodova, M.; Warburg, A. and Turco, S. J.(2004). *Leishmania tropica*:

intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different phlebotomus species. Eperim. Parasitol., 107: 105-114.

174- Souza, V. L.; Souza, J. A.; Silva, T. M. C.; Veras, P. S. T. and De-Freitas, L. A. R. (2000). Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. Microbiol. Inf., 2: 1807-1815.

175- Sundar, S.; Pai, K.; Sahu, M.; Kumar, V. and Murray, H. W. (2002). Immunochroomatography strip test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. Ann. Trop. Med. Parasitol., 96(1): 19-23.

176- Sypek, J. P.; Chung, C. L.; Mayor, S. E.; Subramanyam, J. M.; Goldman, S. J.; Sieburrth, D. S.; Wolf, F. and Schaub, R. G.(1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis : interleukine 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. J. Exp. Med., 177: 1797-1802.

177- Thompson, W. D. (1991). Effect modification and the limits of biological inference from epidemiologic data. J. Clin. Epidermiol., 44(3):221-232.

178- Tilg, H.; Trehu, M.; Atkins, M.; Dinarello,C. and Mier, J. (2014). Interleukin-6(IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: inductionof circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55.Blood J., 83(1): 113-118.

179- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nature publishing group, 3: 133-146.

180- Trinchieri, G. (2014). Interleukin-12: a cytokine produced by antigen –presenting cell with immunoregulatory function in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood J., 84(12) : 4008-4027.

181- Vidigal, C. P.; Marcussi, V. M.; Marcussi, L. M.; Mikcha, J. M.; Arraes, S. M.; Lonardoni, M. V. and Silveira, T. G. (2008). Enzyme immunoassay using *Leishmania braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Acta. Trop., 107:208-212.

182- Vidyasshankar, C. and Agrawal, R. (2002). Leishmaniasis. Med. J., 3(7): 1-21.

183- Weigle, K. A.; Valderrama, L.; Arias, A.L. Santrich, C. and Saravia,N. G. (1988). Leishmanin skin test standardization and evaluationof safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization.Am. J. Trop. Med. Hyg., 44(3): 260-271.

184- Weigel, M. M. and Armijos, R. X. (2001). The traditional and conventional medical treatment of cutaneous leishmaniasis in rural Ecuador. Am.J. Public Health, 10(6):355-404.

185- World Health Organization (1984). Control of the leishmaniasis. WHO, Tech. Reb., 701: 2-4.

186- World Health Organization (1990). Control of leishmaniasis, report of export committee, Technical report series, 743:14pp.

187- World Health Organization (2000). WHO report on global surveillance of epidemic- prone infectious diseases, Chapter 10:*Leishmania* /HIV confection, WHO department of communicable disease surveillance and response: 121-127.

188- World Health Organization (2003).Communicable disease working group on Emergencies, HQ division of communicable disease control, WHO office, Baghdad, : 39-44.

189- World Health Organization (2006). Control of leishmaniasis. Tech. Reportseries,: 265pp.

190- World Health Organization (2007). Report of the consultative meeting consentaneous leishmaniasis. Neglected tropical diseases, WHO Document production services, Geneva, Switzerland: 31pp.

191- World Health Organization (2010). Control of the leishmaniasis. In proceedings of a meeting of the WHO, Expert committee, Geneva: 22-26.

192- World Health Organization (2014). Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO eastern mediterran region. Series35. Regional office for the eastern Mediterranean: 48 pp.

193- Zajac, A. M. and Conboy, G. A. (2011). Veterinary clinical parasitology, 8thedn., Willey-Black well, Ajohn and sons, Inc., India,: 320pp.

194- Zeibig, E. A.(1997). Clinical parasitology: Apractical approach. W. B.Saunders, Philadelphia: 320pp.

195- Zijlstra, E. E.; Nur, Y.; Desjeux, P.; Khalil, E. A.; El-Hassan, A. M. and Groen, J. (2001). Diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. Trans. Trop. Med. Hyg., 6: 108-113.

١٩٦-

١٩٧- مصادر الانترنت

198- **www.en.m.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis**

199-