

دراسة عن الفطار العفني الرئوي التجريبي في الفئران المصابة بالسكري المستحث كيميائيا

فاضل عباس الشمري

كلية الزراعة / جامعة بابل

الخلاصة

تم خلال هذه الدراسة تقييم دور داء السكري في تشجيع الإصابة الرئوية بالفطار العفني ، إذ استعملت مجموعتين من الفئران البيض سلالة Balb\C، وتم استحداث داء السكري كيميائيا باستخدام مادة الالوكسان لإحدى المجموعتين وتركت الأخرى كمجموعة سيطرة ، كذلك حققت جميع حيوانات التجربة داخل الأنف بعالق ابواغ الفطر . *Rhizopus sp.*

بينت نتائج الدراسة ظهور اصابة رئوية مميتة بالفطار العفني في الفئران المصابة بالسكري عند حقنها بجرعة من عالق الابواغ بلغت 30 مايكروليتر حجما وتركيز 10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ، وهو مايمثل في مظهرة السريري والنسجي الفطار العفني الرئوي الذي يحدث في الإنسان في الوقت الذي لم تظهر على مجموعة السيطرة علامات الإصابة ، كما بين الاستحصال المزري من سائل غسيل رئات الفئران المصابة بداء السكري نتائج موجبة وذلك بتكوين مستعمرات العامل المسبب للإصابة على وسط السابر ويد مقارنة مع مجموعة السيطرة الذي لم يظهر أي نموا تحت نفس الظروف وعلى نفس الوسط

Study of experimental pulmonary mucormycosis in chemically induced diabetes in mice

F.B.AL-Shimmery

coll. Of Agric. / Univ.of Babylon

Abstract

This study was conducted to assess the influence of diabetic mellitus in predisposing to pulmonary Mucormycosis , amurine model of alloxan induced diabetes was used, intranasal injection into mice in a dose of *Rhizopus sp.* spores' suspension 30 ML. at concentration 10^6 c.f.u./ml. resulted in mucormycosis infection in histopathology resembling pulmonary mucormycosis observed in human , there was no mortality nor infection in inoculated normal mice and germination of infectious agent was observed only in lavage fluid from diabetic mice in compared to control group

المقدمة

يعد الفطار العفني *Mucormycosis* اصابة نادرة الحدوث مالم يتوفر عامل مهيبى يعمل على احداث خلل في اليات دفاع الجسم ضد هذا النوع من الاصابة الفطرية التي يطلق عليها تسميات اخرى مثل الفطار اللاقحي *Zygomycosis* و الفطار الاشنوي *phycomycosis* ، حيث تشمل جميع الاخماج الفطرية المتسببة عن الانواع التابعة الى صنف الفطريات اللاقحية *Zygomycetes* مثل انواع جنس *Rhizopus* ، *Absidia* ، *Mucor* ، *Mortierella* و جنس *Conninghamilla* (2،1) ، حيث تتواجد هذه الانواع في الطبيعة بوصفها رمامات *Saprophytes* بكتافة على روث الحيوانات والخضر والفواكه المتحللة وهي من الملوثات الرئيسية لاساط العزل المايكروبي المستخدمة في مختبرات الاحياء المجهرية (3،2) ، وتعتبر انواع جنس *Absidia* ، *Mucor* ، *Rhizopus* من المسببات الرئيسية للفطار العفني لدى مرضى الخفض المناعي مثل مرضى داء السكري *Diabetes* والفشل الكلوي *Renal failure* و مرضى السرطان وبعدها الداء السكري من ابرز العوامل المهينة للفطار العفني من خلال ملاحظة العلاقة بين المرض وبين زيادة تكرار حدوث هذا النوع من الاصابات الفطرية الذي يتخذ مدى واسع من المظاهر السريرية ، من فطار عفني جلدي *Cutaneous mucormycosis* وحتى اصابة جهازية *Systemic mucormycosis* ، اذ تنفرد مسببات الفطار العفني عن باقي مسببا الاخماج الفطرية الاخرى بميلها الشديد لغزو الاوعية الدموية مسببة قلة تجهيز الدم وفقر دم موضعي وختارا دمويا وتنخرا نسيجيا (4و1) وبعدها الفطار العفني الرنوي من المظاهر السريرية التي تحدث زيادة في تكرار حدوثها لدى مرضى داء السكري باعتبار الاخير عامل خطورة رئيس لهذا النوع من الاصابة (5)

تحدث الاصابة نتيجة الى استنشاق ابواغ الفطر المسبب للاصابة يعقبها خثارا دمويا في الأوعية الدموية ونزف واحتشاء نسيج الرئة ولعل اكثر الاشكال فوعة يشاهد لدى الاشخاص الذين يعانون من نقص في الخلايا الدم البيض مشكلة النواة العدلة *Polymorphnuclear Neutrophils* ، الان الحالات تحت الحادة تشاهد لدى مرضى داء السكري (6،7)

تعتبر الخلايا مشكلة النواة العدلة ووحيدات النواة *monocytes* وسيلة الدفاع الرئيسية ضد الاصابة بالفطار العفني ، فالقصور الحاصل في وظيفة هذه الخلايا يسهم في زيادة الاستعداد للاصابة وهي حالة شائعة لدى مرضى الداء السكري غير المسيطر عليه (8) ، ويعتمد التشخيص النهائي للاصابة بالفطار العفني الرنوي على الدراسة النسيجية للخرعة الماخوذة للكشف عن خيطان الفطر واستفراد العامل المسبب للاصابة من عينة القشع (9،4)

ومن اجل الوقوف على حجم المشكلة باعتبار داء السكري عامل مهيبى لمدى واسع للاصابة الفطرية ولتناول معظم الدراسات التي تتعلق بمرضى داء السكري الجاتب الفسيولوجي بعيدا عن موضوع الاصابة البكتيرية والفطرية جاءت الدراسة الحالية كمحاولة للكشف عن دور داء السكري كعامل مهيبى للاصابة بالفطار العفني الرنوي

المواد وطرائق العمل

تم استخدام عزلة من *Rhizopus sp.* استفردت من عينة قشع مريض على وسط السبر ويد الصلب وتم تشخيصها حسب (1،2) ثم نقلت العزلة على وسط Potato dextrose agar وحضنت بدرجة حرارة 37°C ولمدة 72 ساعة بعدها جمعت الابواغ الحافظة بعملية الحصاد Harvesting وتم حساب عدد الابواغ باستعمال مقياس كريات الدم الحمر Heamocytome (2،10)

قسمت حيوانات التجربة إلى مجموعتين كل مجموعة مؤلفة من خمس فئران بيض سويسرية سلالة Balb \ C إناث وضعت في أقفاص لداننية ذات أغطية معدنية وفرشت بنشارة الخشب الناعمة وتم تزويدها بالماء بوساطة قنار من اللدانن وقد جهزت الفئران بالغذاء المعتاد في البيت الحيواني في كلية العلوم. مُنعت حيوانات التجربة المجموعة الأولى عن الأكل مدة 18 ساعة قبل إحداث السكري، ثم حقنت بمادة الالوكسان بتركيز (150 ملغم/كغم) من وزن الجسم تحت الجلد Subcutaneous injection حيث تم الحقن بثلاث مراحل، أي بجرعة كلية (450 ملغم/كغم)، وبعد سبعة أيام تم الكشف عن ارتفاع مستوى سكر الدم ذلك من خلال التحري عن وجود الكلوكوز في البول بوساطة الشريط الكاشف Glucotest كذلك جرى قياس سكر الدم في حيوانات التجربة باستعمال عدة التحليل Kit من نوع (Randox Laboratories Ltd., Co. Antrium, United Kingdom) (11)

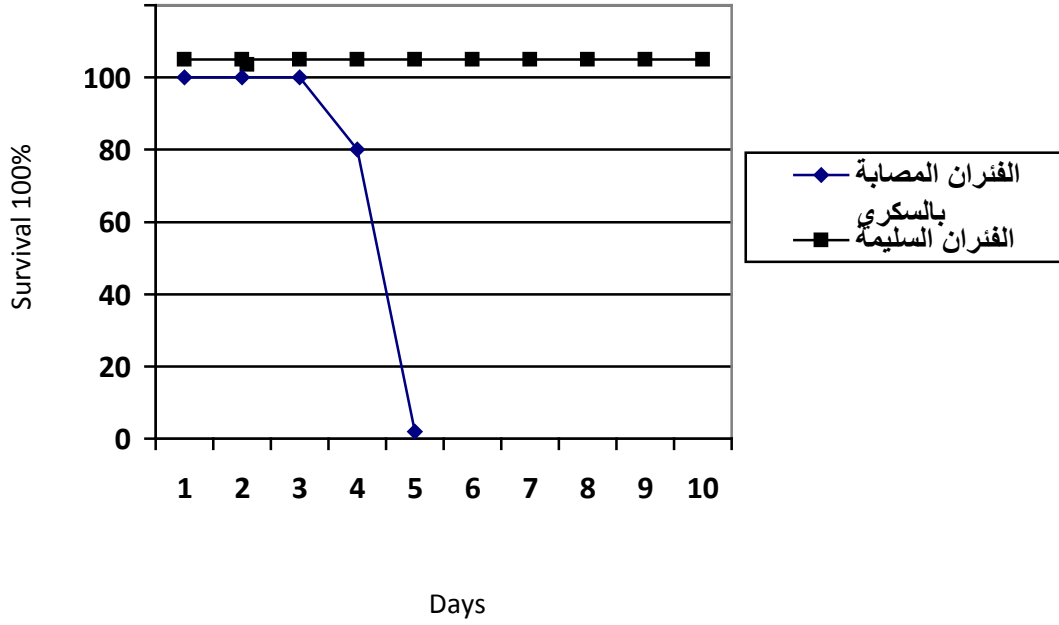
تم إتباع الطريقة التي أشار إليها (10) في حقن مجموعات الحيوانات داخل الأنف بجرعة مقدارها 30 مايكروليتر بعد إزالة التحسس باستعمال خليط من الكلورفورم والكحول الايثيلي والاثير 2:1:3. حقنت الفئران داخل التجويف الانفي بعالق ابواغ الفطر *Rhizopus sp.* بتركيز (10^6 كونيديا / مل) بعدها روقبت الحيوانات مدة خمسة أيام.

تم تشريح الحيوانات المصابة بداء السكري حال موتها اما مجموعة الفئران السليمة فقد ضحي بها في اليوم العاشر حيث استخرجت رئات الحيوانات وجرت معاملته للتحضيرات النسيجية اللاحقة جرى تقطيع نسيج الرئة بإحجام مناسبة بعدها عومل النسيج بطريقة الطمر بشمع البارافين وفق ما جاء في (12)

و للكشف عن قدرة ابواغ العامل المسبب للإصابة على الإنبات كوحدات مكونة للمستعمرات تم إتباع طريقة (13) لأجل استفراد العامل المسبب للإصابة للعينات النسيجية

النتائج

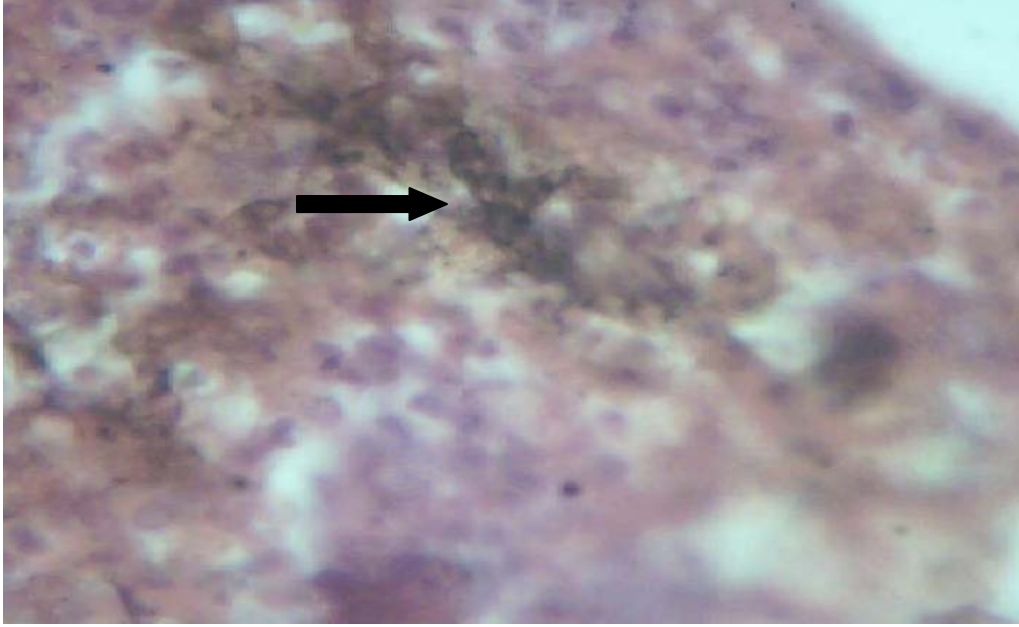
يبين الشكل (1) معدل بقاء الفئران المصابة بالسكري والفئران السليمة حية بعد حقنها داخل التجويف الأنفي بعالق ابواغ الفطر *Rhizopus sp.* والذي شكل نسبة 100% (5/5) مقارنة بمجموعة الفئران غير المصابة بداء السكري إذ شكلت نسبة الموت فيها 0% (0/5)



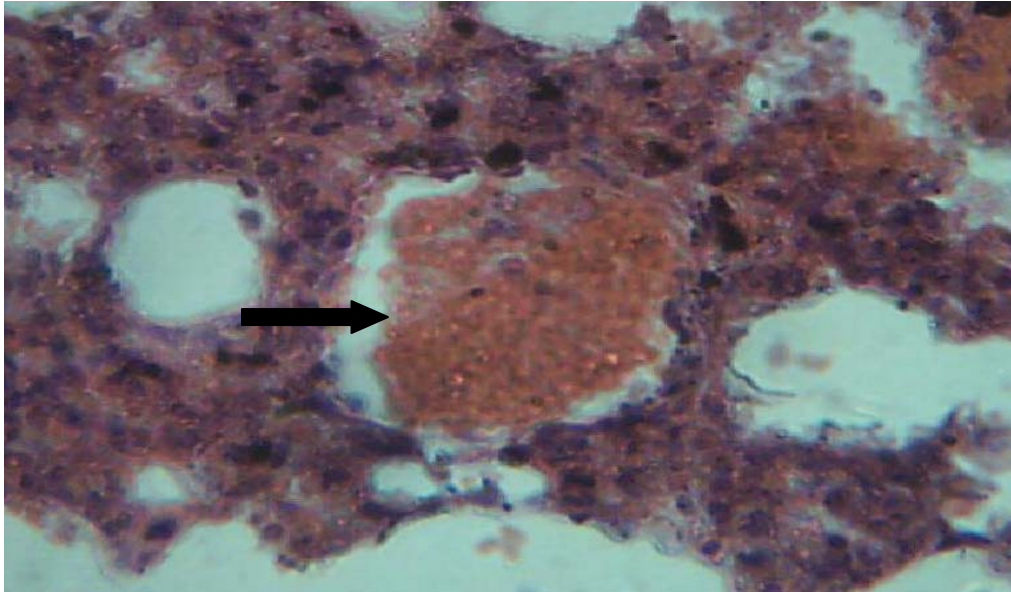
شكل (1) معدل بقاء الفنران المصابة بداء السكري التجريبي والفنران السليمة حية بعد حقنها داخل التجويف الأنفي بعالق ابواغ الفطر *Rhizopus sp*

كما أوضح الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المعمولة لرنات الفنران المصابة بالسكري وجود مكونات العامل المسبب للإصابة ممثلة بشكل خطيان فطرية غير محجرة (شكل -2-) تجمع كريات الدم الحمراء داخل الاسناخ (شكل -3-) ونضوح الخلايا مشكلة النواة العذلة ووحيدات النواة الى داخل الاسناخ (شكل -4-)

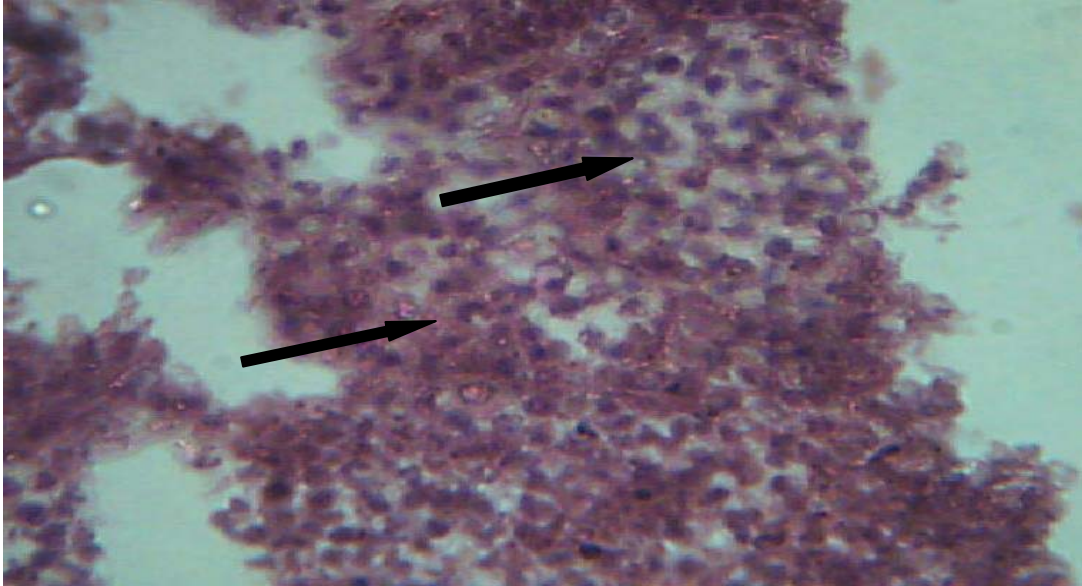
بين الاستحصال المزري للعامل المسبب للإصابة الفطرية من رنات الفنران المصابة بداء السكري والسليمة والذي اجري من اجل التحري عن قابلية مكونات العامل المسبب للإصابة على تكوين مستعمرات في الوسط ألزري نتائج موجبة من خلال ظهور مستعمرات الفطر على وسط السابرويد بالنسبة للفنران المصابة بالسكري مقارنة بالنتيجة السالبة للفنران السليمة .



شكل (2) مقطع في نسيج رئة مصبوغ بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين حيث تظهر مكونات العامل المسبب للاصابة مضمورة داخل النسيج المخموج (400x)



شكل (3) مقطع في نسيج رئة مصبوغ بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين يظهر فيه تجمع خلايا الدم الحمر داخل الفسحة الهوائية للرئة



شكل (4) مقطع في نسيج رئة مصبوغ بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين يظهر فيه ارتشاح للخلايا الالتهاب

المناقشة

يعتبر داء السكري واحد من بين العوامل الرئيسية لحدوث الإصابة بالفطار العفني ولعل من بين أكثر مظاهره تكرارا لدى مرضى داء السكري هو الفطار العفني الانفي الدماغي والفطار العفني الرئوي (7،2)، وتعتبر انواع جنس *Mucor*، *Absidia*، *Rhizopus* مسببات رئيسية لهذا النوع من الإصابة الفطرية .

بينت نتائج الدراسة قدرة جنس *Rhizopus sp.* على احداث اصابة بالفطار العفني الرئوي اذ ينفرد هذا الجنس بقدرة عالية على الالتصاق بسطح الخلايا الخارجي و انتاجه انزيم هاضم للبروتين وامتلاكه انزيم *Keton reductase* الذي يعد عامل ضراوة يمكن الفطر للنمو في وسط حامضي وغني بالكوكوز وهي حالة معروفة لدى مرضى داء السكري (7) ، و تم تاكيد الإصابة من خلال مشاهدة مكونات العامل المسبب للإصابة داخل نسيج الرئة المخموج اذان وجود مكونات العامل المسبب للإصابة الفطرية داخل انسجة المظيف يعتبر دليلا قطعيا على الإصابة (7،1) ، كما اشارت دراسة (14) الى ان وجود خيطان فطر *Mucor sp.* داخل نسيج الدماغ المخموج دليلا على وجود اصابة بالفطار العفني الدماغي في الفئران المصابة بالسكري المستحث كيميائيا .

بينت دراسة المقطع النسيجي المعمول لرنات الفئران ظهور نضحة ليفينية في تجاويف الاسناخ فضلا عن الوذمة واحتقان الشعيرات الدموية السنخية و حالة نزف في الاوعية الدموية والذي يعود الى وجود المواد الغريبة التي

تدخل الدورة الدموية وتعمل على تلف بطانة الاوعية الدموية ،كما إن ظهور كريات الدم الحمراء بكثرة في رنات الحيوانات يرجع الى حالة من القصور التنفسي نتيجة الى تلف الحويصلات الرئوية وينتج عنه حصول نقص في تجهيز الاوكسجين مما يؤدي إلى حدوث زيادة في معدل إنتاج كريات الدم الحمراء فوق الحدود الطبيعية (15) ،وكذلك ظهور حالة من فرط التنسج الى الحواجز بين الاسناخ نتيجة الى ارتشاح جدرانها بالخلايا البلعمية والخلايا العدلة وقد امتدت الاستجابة الالتهابية الى تجاويف الاسناخ المجاورة والتي تعتبر كدليل على ضراوة العامل المسبب للاصابة في تحفيز الية دفاع المضيف الخلوية كنوع من الاستجابة المناعية (16).

وتشير النتيجة الموجبة للاستحصال المز رعي واستفراد العامل المسبب للاصابة من رنات الفئران المصابة بالسكري الى القصور الحاصل في الية دفاع المضيف الخلوية ضد الاصابة الفطرية الجهازية نتيجة للاصابة بداء السكري التجريبي مع الاخذ بنظر الاعتبار الدور الرئيس الذي تلعبه وحيدات النواة ومشكلة النواة العدلة والخلايا اللمفية في درء الاصابة عن طريق ابادة الكائنات التي تقوم ببلعمتها او القضاء المباشر عليها (17)،فالخلل الحاصل في وظيفة خلايا الدفاع وهو من تعقيدات الاصابة بداء السكري يساعد وبشكل كبير في جعل ابواغ العامل المسبب للاصابة ذات قدرة على الاتبات داخل وخارج انسجة المضيف، وهو ما يعزى الية ايضا لظهور علامات الاصابة الفطرية و موت الحيوانات المصاب بالسكري مقارنة بالحيوانات غير المصابة بالسكري بالرغم من حقن كلا المجموعتين داخل الأنف بنفس الجرعة وبنفس التركيز ذلك ان داء السكري يعتبر عامل خطورة اساسي لحدوث الاصابة الرئوية بالفطار العفني (5،17) وان هذا النوع من الاصابات الفطرية يعتبر من الاصابات الفطرية المميته لدى مرضى الخفض المناعي (18) وخصوصا في حال تأخر علاج الاصابة الرئوية مما يؤدي الى تكهف الرئة وانتشار دموي لعوامل الخمج وحصول اصابة انتشارية وفشل تنفسي والتي تعد الأسباب الرئيسية لموت المضيف (7).

المصادر

- 1- Ellis. D. H. (1994). Clinical Mycology: The human opportunistic Mycosis. Gillingham printers Pty Ltd, Australia: 166 pp.
- 2-Emmons, C. W.; Binford, C. H.; Utz, J.P. and Kwon- Chung, K. J (1977). Medical Mycology, 3 rd. edn. Lea & Febiger, Philadelphia: 592 PP
- 3-Ingram, C.W.; Sennesh,J.; Cooper, J.N. and Perfect, J.R. (1989). Disseminated zygomycosis: Report of four cases and review. Rev. infect. Dis. 11(5): 741 – 754
- 4- Conant, N.F.; Smith, D.T.; Baker, R.D. nad Callaway, J.L.(1971). Manual of Clinical Mycology, 3rd. end. W. B. Saunders Company, London. 755 pp.

- 5- Lee, F.Y.W.; Mossad,S.B.; Adal,K.A. (1999). Pulmonary Mucormycosis The Last 30 Years *Arch Intern Med.* 159:1301-1309
- 6- Rinaldi, M. G. (1989). Zygomycosis. *Infectious Disease Clinical North. America* 3: 19 – 41
- 7- IBRAHIM , A.S. ; EDWARDS JR, J.E. AND FILLER, S.G.(2003) Zygomycoses In: DISMUKES ,W.E. ; PAPPAS,P.G. and SOBEL,J (eds). *CLINICAL MYCOLOGY.* Oxford University Press, Inc.
- 8- Chen, J.-S.; Lin, C.-C.; Lin, S.-L. and LU, J.-Y.(1995) Zygomycotic lung abscess: A case report, *chin. Med. J.* 56: 129.133
- 9 - Sugar, A.M.(1992). Mucormycosis. *Clin. Infect. Dis* 14(suppl): 126-129
- 10 - Mondon, P.; DE – Champs, C.; Donadille, A; Ambroise – thomas, P. and Grillot, R. (1996). Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in amurin model of invasive pulmonary Aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* 45: 186 – 191.
- 11- Alargon - Aguilor, F.J.; Estrada, M.J. ; Chilpa, R.R. ; Gonzalez - Poredes, B.; Contreas - Weber, C.C. and Roman - Romons, R. (2000). Hyperglycemic activity of root water decoction sequiter penoids and one polysaccharide fraction from *pacalium decompositum* in mice .*J.Entopharma col.* 69: 207 – 215
- 12 -Presnell, J. K. and Schreibman, M. P. (1997). Humason`s Animal tissue Techniques, 5th edn. The Jobus Hopkins press Ltd. London.
- 13- McGinnis, M.R.(1980).Laboratory Handbook of Medical Mycology.Academic press, New York .USA
- 14- راضي ، فاضل عباس (2002).التحري عن الفطريات الانتهازية لدى مرضى داء السكري في محافظة بابل.(رسالة ماجستير)كلية العلوم . جامعة بابل
- 15 - Anderson , J.R.(1980). Muir`stext Book of pathology .11th.edn.Edward Arnold , Norwich. U.k.
- 16- Adam ,D.D.(1976).the granulomatous inflammatory response *Am. J.Path.*84:164-191.

- 17 - Waldorf, A. R. ; Ruderman, N. and Diamond, R. (1984) . Specific Susceptibility to Mucormycosis in Murine diabetes and bronchoalveolar Macrophage defence against Rhizopus. J. Clin. Inves. 74. 150-160.**
- 18 - Vazquez, J.A. and Sobel, J.D. (1995) Fungal infection in diabetes. Infectious disease clinics of North America. 9 (1) : 97-116.**

Study of experimental pulmonary mucormycosis in chemically induced diabetes in mice

F.B.AL-Shimmery

coll. Of Agric. / Univ.of Babylon

Abstract

This study was conducted to assess the influence of diabetic mellitus in predisposing to pulmonary Mucormycosis , amurine model of alloxan induced diabetes was used, intranasal injection into mice in a dose of *Rhizopus* sp. spores' suspension 30 ML. at concentration 10^6 c.f.u./ml. resulted in mucormycosis infection in histopathology resembling pulmonary mucormycosis observed in human , there was no mortality nor infection in inoculated normal mice and germination of infectious agent was observed only in lavage fluid from diabetic mice in compared to control group