الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

رد الفعل المناعي تجاه الليشمانيا المثبطة بالميتوميسين على مستوى العقد اللمفية النازحة لدى الفئران.

The immune response against leishmania inhibited by mitomycin-c at the level of draining lymph nodes in mice.

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في التشخيص المخبري.

إعداد

فاطمة محي الدين حسين

إشراف

أ.د. محمد معروف

(كلية الصيدلة)

مشاركة

م. د. فيحاء أبو فخر

(كلية الطب البشري)

2014 م – 1435 هـ

استغرق البحث مدة عامين تقريباً لإتمامه من 2 /10 /2011 وتم الانتهاء منه بتاريخ 15 /1 /2014

أماكن إجراء البحث:

1- الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

2- هيئة الطاقة الذرية.

3- حواضن حيوانات التجربة في كلية الصيدلة – جامعة دمشق.

تاريخ مناقشة الرسالة

يوم الأحد 18 /5 /2014

أسماء أعضاء لجنة الحكم برئاسة أ. د. محمد معروف عضواً مشرفاً

الفاحص الأول أ. م. د. محمود قويدر (كلية العلوم – جامعة دمشق)

الفاحص الثاني م. د. شادن حداد (كلية الصيدلة – جامعة دمشق)

الإهداء Dedication

- إلى نور الدجى ورسول الهدى وقنديل عرش الله سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم.
- أبي وأمّي.
- إخوتي وأخواتي.
- زوجي وولداي محمد ويوسف.
- عمي أبو جمال وعائلته الكريمة.
- إلى طلاب التشخيص المخبري دفعة 2008 -2009 مع تمنياتي لهم بالنجاح والتوفيق.
- إلى دفعة 2008 كلية الصيدلة في جامعة دمشق.
- إلى كل من عرفني وأحبني من أهلي وزملائي وأصدقائي، قد لا تتسع السطور لذكر أسمائهم إلا أن لكل واحد منكم مكان في قلبي ووجداني.

الشكر Acknowledgment

الحمد لله أولاً وآخراً إليك ربّي أقدّم عملي هذا واجعله خالصاً لوجهك الكريم ..

- أتقدّم بأسمى آيات الشكر والامتنان إلى إدارة الكلية ممثلة بالأستاذ الدكتور جمعة الزهوري عميد كلية الصيدلة، والأستاذة الدكتورة سحر الفاهوم نائب عميد الكلية للشؤون العلميّة، والأستاذة المساعدة الدكتورة جمانة الصالح نائب عميد الكلّيّة للشؤون الإدارية لرعايتهم ودعمهم البحث العلمي في الكلية.
- كلّ الشكر لرئاسة قسم الكيمياء الحيويّة السريريّة والأحياء الدقيقة ممثّلة برئيسة القسم الأستاذة الدكتورة فايزة القبيلي .
- كل الشكر للأستاذ الدكتور محمّد معروف لتفضّله بالإشراف على هذا البحث، ولم يتوانَ عن تقديم أيّ دعم في سبيل إنجاز هذا العمل على الوجه الأمثل.
- كلّ الشكر للمدرسة الدكتورة فيحاء أبو فخر التي تفضّلت بالمشاركة في الإشراف على البحث، وأثرتها بملاحظاتها القيّمة.
- أتوجّه بعميق شكري وامتناني للمدرسة الدكتورة شادن حداد التي أعلت هممنا منذ مراحل الدراسة الباكرة في الكلّيّة، والتي تفضّلت بالحكم على البحث.
- كلّ الشكر للأستاذ المساعد الدكتور محمود قويدر لتفضله بتقييم العمل وإغناء البحث بملاحظاته القيمة والذي تفضّل – مشكوراً- بالحكم على البحث.
- كلّ الشكر لأساتذتي في قسم الكيمياء الحيويّة السريريّة والأحياء الدقيقة.
- كلّ الشكر للدكاترة والفنيين العاملين في الهيئة العامة للتقانة الحيوية وهيئة الطاقة الذرية لتقديمهم المساعدة والتسهيلات اللازمة لإنجاز مراحل العمل.
- أتقدّم بخالص امتناني وشكري للدكتور حسان الخوري والدكتورة ريما الدنيا والدكتور عمار الذين دعموني وقدّموا لي المساعدة خلال مراحل العمل.
- كل الشكر للأساتذة في كلية العلوم.
- كل الشكر للعاملين في كلية الصيدلة.

لمحة موجزة عن حياة الباحث (CV)

الاسم: فاطمة محي الدين حسين.

الجنسية: عربي سوري.

البريد الإلكتروني: fatma-hsen@hotmail.com.

مكان وتاريخ الولادة: قامشلي 28 /11 /1985.

حاصل على إجازة في الصيدلة والكيمياء الصيدلية – جامعة مشق عام 2008 بتقدير جيد جداً.

تصريح

الاسم: فاطمة محي الدين حسين.

مكان وتاريخ الولادة: قامشلي 28 /11 /1985.

عنوان البحث:

رد الفعل المناعي تجاه الليشمانيا المثبطة بالميتوميسين على مستوى العقد اللمفية النازحة لدى الفئران.

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم اقتباسه بالكامل من عمل علمي آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أي جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي داخل أو خارج القطر.

لم يتم قبض أي مبلغ مادي أو مكافأة عينية سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام بعمل يمس جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها.

أتعهد بأني لم أقل إلا الحقيقة ولم أخف شيئاً تحت طائلة المعاقبة والمحاسبة القانونية وعليه أوقع

التاريخ توقيع الباحث

فاطمة حسين

قائمة المحتويات List of contents

قائمة الجداول...4

قائمة الأشكال...5

قائمة الاختصارات...9

1- تصنيف الطفيلي...12

2- العامل الناقل..13

3- المستودع...13

4- دورة حياة الطفيلي..14

5- الوبائيات والفيزيولوجية المرضية..16

5 -1 التوزع الجغرافي لأدواء الليشمانيات..16

2-5 التظاهرات السريرية لأدواء الليشمانيات...17

6- طفيليات الليشمانية والاستجابة المناعية..19

1-6 الاستجابة المناعة خلال تطور الإصابة الجلدية.......................................20

2-6 المظاهر المناعية في داء الليشمانية الجلدي الفأري...................................27

7- لقاحات الليشمانية..30

1-7 التلقيح بطفيلي الليشمانية...30

2-7 اللقاحات المحضرة من طفيليات مقتولة...31

3-7 اللقاحات المحضرة من طفيليات حية مضعفة...32

4-7 التلقيح باستخدام فيروسات أو جراثيم مأشوبة كحوامل ناقلة........................36

5-7 التلقيح باستخدام مستضدات منقاة من طفيليات الليشمانية............................37

6-7 التلقيح باستخدام مستضدات مأشوبة...38

7-7 لقاحات الـ DNA..41

8-7 لقاحات تعتمد على المستضدات الموجودة في لعاب ذبابة الرمل......................43
الدراسة العملية..44
1- مبرر البحث..45
2- هدف البحث..45
3- المواد والطرائق..45
1-3 طفيليات الليشمانية..46
1-1-3 الاستنبات على الوسط السائل وحيد الطور RPMI-1640.......................46
2-3 تحديد جرعة الميتوميسين C– المثبطة لتضاعف المشيقات..........................46
3-3 تحضير اللقاح..47
4-3 الفئران المستخدمة...47
5-3 حقن الفئران...48
6-3 استخلاص العقد اللمفية من الفئران...48
7-3 متابعة تطور الإصابة...49
8-3 تحديد حمل الطفيلي في الإصابات الجلدية والعقد اللمفية النازحة.....................50
9-3 تقنية الجريان الخلوي...51
10-3 عزل الـ RNA من العقد اللمفية النازحة...56
11-3 اصطناع الدنا المتمم cDNA...57
12-3 تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي..58
4- الدراسة الإحصائية..59
5- النتائج..60
1-5 توصيف سلالة الطفيليات المستخدمة...60
2-5 تحديد تركيز الميتوميسين الموقفة للتضاعف...61
3-5 تقييم فعالية تمنيع اللقاحات المستخدمة عند الفئران.......................................62
1-3-5 متابعة التغيرات في حجم الآفة...62
2-3-5 متابعة تغيرات حمل الطفيلي في الإصابات الجلدية والعقد اللمفية النازحة.......64

3-3-5 تقييم رد الفعل المناعي في العقد اللمفية النازحة بعد التمنيع وبعد اختبار التحدي68

6- المناقشة..95

7- الاستنتاجات 104

8- المقترحات والتوصيات...105

9- الملخص باللغتين العربية والانكليزية.....................................106

10- المراجع...110

11-الملحق Appendix..119

قائمة الجداول List of tables

الجدول 1: أنواع طفيليات جنس الليشمانية والمتلازمات السريرية الرئيسة التي تسببها..12

الجدول 2: اللقاحات الحية المضعفة التي تم اختبارها ضد داء الليشمانيات................32

الجدول 3: أسماء المشرعات المستخدمة في تفاعل Real-Time PCR وتسلسلها النيكليوتيدي..58

الجدول 4: المواد المستخدمة في تفاعل Real-Time PCR 59

الجدول 5: تأثير التراكيز المختلفة من الميتوميسين على أعداد طفيليات الليشمانية المدارية بعد 24 ساعة وحضن بدرجة حرارة 26 م...61

List of figures قائمةالأشكال

الشكل 1: دورة حياة طفيليات الليشمانية...15

الشكل 2: داء الليشمانيات الجلدي..18

الشكل 3: التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات..19

الشكل 4: الأحداث المناعية المبكرة في داء الليشمانيات الجلدي..........................21

الشكل 5: الاستجابة المناعية الخلوية تجاه طفيليات الليشمانية............................25

الشكل 6: الخلايا التغصنية صلة وصل بين المناعة الخلقية والمناعة التلاؤمية..........26

الشكل 7: الخلايا المناعية التي تدخل في الاستجابة المناعية خلال أطوار الإصابة بداء الليشمانيات الجلدي الفأري...27

الشكل 8: مكان العقد اللمفية النازحة في الفأرة..49

الشكل 9: سلسة التمديدات المستخدمة لتحديد حمل الطفيلي في الأنسجة المصابة.........51

الشكل 10: منحني تكاثر المشيقات لسلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا...60

الشكل 11: تراكيز الميتوميسين-c وأعداد الطفيليات بعد حضن 10^4 طفيلي في وسط RPMI 1640 الكامل مع تراكيز مختلفة من الميتوميسين لمدة 24 ساعة بدرجة 26 م...61

الشكل 12: تطور حجم الآفة مقدرةً بتطور فرق ثخانة قدمي الفئران لدى ثلاث مجموعات مختلفة من الفئران قبل التحدي (أي بعد 4 أسابيع على تلقيحها) في أسفل القدم اليمنى...64

الشكل 13: تطور حمل الطفيلي في القدم لدى ثلاث مجموعات مختلفة من الفئران الممنعة..67

الشكل14: تطور حمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة لدى ثلاث مجموعات مختلفة من الفئران الممنعة 67

الشكل 15: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ ولأعداد الخلايا التائية السامة $CD8^+$ ولأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية$CD49b^+$ ولأعداد الخلايا البائية

$CD19^+$ ولأعداد البالعات $CD11b^+$ ولأعداد الخلايا التغصنية $CD11c^+$ مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من فئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أوالمقتولة بالحرارة أوالمثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.....................................69

الشكل 16: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ 10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD4 وPE-antimouse CD3 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع...70

الشكل 17: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ 10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد PerCP-Cy5.5 antimouse CD8a وPE-antimouse CD3 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع..71

الشكل 18: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ 10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD19 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.............71

الشكل 19: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ 10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد FITC-antimouse CD49b وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع...72

الشكل 20: تغيرات النسبة المئوية لأعداد البالعات في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ 10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD11b وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع...........73

الشكل21: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ 10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD11c وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع...74
الشكل 22: الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة الآغاروز بتركيز 1% لعينات الـ RNA المعزولة يظهروجود gDNA الدنا الجينومي وثلاث عصابات تمثل 28S و18S و5S الخاص بالرنا...75
الشكل 23: التعبير الجيني عن الرنا المرسال للسيتوكينات في العقد اللمفية النازحة بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات السابقة..76
الشكل 24: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...78
الشكل 25: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة CD4+CD3+ في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...............................79
الشكل 26: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...80
الشكل 27: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة CD8+CD3+في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة....................................81
الشكل 28: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...82
الشكل 29: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية $CD19^+$ في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة..84
الشكل 30: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...85

الشكل 31: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية $CD49b^+$ في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة 86
الشكل 32: متوسط النسبة المئوية لأعداد البالعات مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...87
الشكل33:تغيرات النسبة المئوية لأعداد البالعات $CD11b^+$ في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة 88
الشكل 34: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...89
الشكل35: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية$CD11c^+$ في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة...91
الشكل 36: التعبير الجيني عن الرنا المرسال للسيتوكينات في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين بعد مرور أسبوعين W2 وثمانية أسابيع W8 على التحدي................92

List of abbreviations قائمة الاختصارات

A: *Adenine*.

ALM: Autoclaved leishmania major.

APC: Antigen presenting cell.

BCG: *Bacille Calmette–Guerin.*

BT1: Biopterin transporter – 1.

C: Cytosine.

C3: Complement 3.

CMV: Cytomegalovirus.

CP: Cysteine peptidases.

C. parvum: Corynebacterium parvum.

CpG-ODN: Cytosine phosphate guanosine oligdeoxy nucleotide.

Cr1: Complement receptor type 1.

DFRS: Dihydro folate reductase thymidylate synthase.

DNA: Deoxyribonucleic acid.

FML: Fucose mannose ligand.

FW: Forward.

G: Guanine.

H2A: Histone 2A.

HaspB1: Hydrophilic acylated surface protein B1.

MHC II: Major histocompatibility complex II.

HSV-1:*Herpes simplex* virus 1.

IFN-γ: Interferon-γ.

IgG: Immunoglobulin Gamma.

IL-12: Interleukine 12.

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase.

ITGA: Integrine alpha.

KMP-11: Kinetoplastid membrane protein.

LACK: Leishmania homolog of receptors for Activated C Kinase

LCR1: Leishmania chagasi receptor 1.

LeIF: Elongation and initiation factor.

LiESAp: Leishmania infantum excreted-secreted antigen purified.

LiP0: *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0.

Lip-rgp63-CpG-ODN: Liposomes recombinant Cytosine phosphate guanosine oligdeoxy nucleotide.

L. tropica: *Leishmania tropica*.

Lu. longipalpis:*LutozomyiaLongipalpis.*

Mac-1:Macrophage-1 antigen.

mRNA: Messenger ribonucleic acid.

NH36: Nucleoside hydrolase 36.

NO: Nitric Oxide.

PBS: Phosphate buffer saline.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PGE2: Prostaglandin E2.

PSG: Promastigote secretory gel.

P. Tobbi: *Phlebotomus Tobbi.*

RNA: Ribonucleic acid.

RV: Reverse.

SD: Standard Deviation.

SGH: Salivary gland homogenate.

SMP: Serine metalloproteinase.

T: Thymine.

TCR: T cell receptor.

TGF-β: Transforming growth factor beta.

Th1: T helper 1.

TLR-9: Toll like receptor-9.

TNF-α: Tumor necrosing factor alpha.

يتميز طفيلي الليشمانية بأنه يأخذ خلال دورة حياته شكلين مختلفين وهما الشكل الليشمانة amastigote، والذي يمتلك شكلاً بيضوياً يتطفل بشكل مجبر داخل خلايا الجملة الشبكية البطانية للإنسان والثدييات الأخرى، وشكل المشيقة promastigote، والذي يمتلك شكلاً مغزلياً ويتواجد في معي الذبابة أو في المستنبتات الزرعية.

1- تصنيف الطفيلي Taxonomy of Leishmania

اعتماداً على تصنيف منظمة الصحة العالمية يصنفجنسالليشمانية Leishmania ضمن فصيلة المثقبيات Trypanosomatidae، ورتبة ذوات منشأ الحركة Kinetoplastida، وصف السوائط الحيوانية Zoomastigophora، وتحت شعبة السوائط Mastigophora، وشعبة السوائط اللحمية Sarcomastigophora، وتحت مملكة وحيدات الخلية (الأوالي) Protozoa، والمملكة الحيوانية Kingdom Animalia[1].

يضم جنس الليشمانية أنواعاً متعددة، تم تصنيفها اعتماداً على المظاهر المرضية السريرية التي يسببها طفيلي الليشمانية في العضوية، وتبعاً للتوزع الجغرافي لأماكن وجودها في العالم. في الحقيقة لا يمكن تمييزالأنواع المختلفة لطفيليات الليشمانية اعتماداً على صفات شكلها الخارجي الملاحظ مجهرياً. رغم عدم وجود تصنيف نهائي مقبول عالمياً، تتوفر قائمة بالأنواع المقبولة من قبل منظمة الصحة العالمية، الجدول 1، يعتمد على تصنيف هذه الطفيليات ضمن مجموعة من المعقدات يضم كل معقد منها عدداً من الأنواع التي يجمعها مجموعة من الصفات المشتركة تشمل توزعها الجغرافي وقدرتها المرضية.

الجدول 1: أنواع طفيليات جنس الليشمانية والمتلازمات السريرية الرئيسة التي تسببها.

العالم القديم Old World	العالم الجديد New World	الأشكال السريرية لداء الليشمانيات
معقد الليشمانية الكبرى *L. major Complex* الليشمانية الكبرى *L. major* **معقد الليشمانية المدارية *L. tropica complex*** الليشمانية المدارية *L. tropica* **معقد الليشمانية الأثيوبية *L. aethiopica complex*** الليشمانية الأثيوبية *L. aethiopica* الليشمانية الطفلية *L. infantum*	**معقد الليشمانية المكسيكية *L .mexicana Complex*** الليشمانية المكسيكية *L . mexicana* الليشمانية الأمازونية *L. amazonensis* الليشمانية الفنزويلية *L. venzuelensis* الليشمانية البيفانوية *L. pifanoi* **معقد الليشمانية البرازيلية *L. braziliensis Complex*** الليشمانية البرازيلية *L. braziliensis* الليشمانية البانامية *L. panamensis* الليشمانية الغوانية *L. guyanensis* الليشمانية البيروفية *L. peruviana*	**داء الليشمانيات الجلدي Cutanous Leishmaniasis**

اللیشمانیة الأثیوبیة *L. Aethiopica*	اللیشمانیة الأمازونیة *L. amazonensis*	**داء اللیشمانیات الجلدي المنتشر Diffuse cutanous Leishmaniasis**
اللیشمانیة الاثیوبیة (حالات نادرة) *L. aethiopica*	معقد اللیشمانیة البرازیلیة *L. braziliensis Complex*	**داء اللیشمانیات الجلدي المخاطي Mucocutaneous Leishmaniasis**
معقد اللیشمانیة الدونوفانیة *L. donovani Complex* اللیشمانیة الدونوفانیة *L. donovani* اللیشمانیة الطفلیة *L. infantum*	**معقد اللیشمانیة الدونوفانیة *L. donovani Complex*** اللیشمانیة الشاغاسیة *L. chagasi*	**داء اللیشمانیات الحشوي Visceral Leishmaniasis**

2- العامل الناقل The Vector

تتم العدوى بطفیلیات اللیشمانیة بواسطة أنثى ذبابة الرمل Sand fly،وتعود هذه التسمیة للشبه بین لونها الأصفر ولون حبة الرمل، وتصنف هذه الحشرة ضمن جنس *Phlebotomus* في العالم القدیم وجنس *Lutzomyia* في العالم الجدید.

في عام 1929 تم اكتشاف أول نوع من جنس ذبابة الرمل في سوریة من قبل أدلر وتیودور في حلب وهو *P. papatasi*[2]، ثم في عام 1947 اكتشف تیودور نوعاً ثانیاً وهو *P. sergenti* في دمشق، وفي عام 1958 اكتشف نوعین آخرین هما *P. simici* و[3]*major syriacus* *P.*. وبینت دراسة أجریت في حماه عام 2013 وجود سبعة أنواع من جنس ذبابة الرمل وهي:*P. sergenti*، و*P. alexandri*، و*P. jacusielli*، و *P. syriacus*، و*P. Tobbi*، *P. papatasi*، و*P. galillaeus*[134].

3- المستودع (المضیف الخازن) Reservoir Host

یلعب المستودع الفقاري دوراً هاماً في انتشار طفیلیات اللیشمانیة. ویمكن التمییز، وفقاً لاختلاف الخازن، بین شكلین وبائیین لداء اللیشمانیة وهما:

- مرض حیواني المنشأ Zoonotic disease تنتقل فیه الإصابة من الحیوان إلى الإنسان عن طریق ذبابة الرمل ویكون الحیوان خازناً للمرض.
- مرض بشري المنشأ Anthropontic disease تنتقل فیه الإصابة من الإنسان إلى إنسان أخرعن طریق ذبابة الرمل ویكون الإنسان خازناً للمرض.

یعد داء اللیشمانیة الحشویة مرضاً حیواني المنشأ بالدرجة الرئیسیة إذ تكون الحیوانات البریة والألیفة مثل الكلاب وبنات أوى والقوارض والذئاب خازنة للمرض. كما یمكن أنْ تصاب الحیوانات الأخرى الموجودة في المناطق الموبؤة بالمرض. وتلعب الكلاب دوراً

مهماً في نقل المرض إلى الإنسان حيث تعد الكلاب خازناً رئيسياً للمرض في كل من بريطانيا واسبانيا والصين ومناطق البحر المتوسط[4].

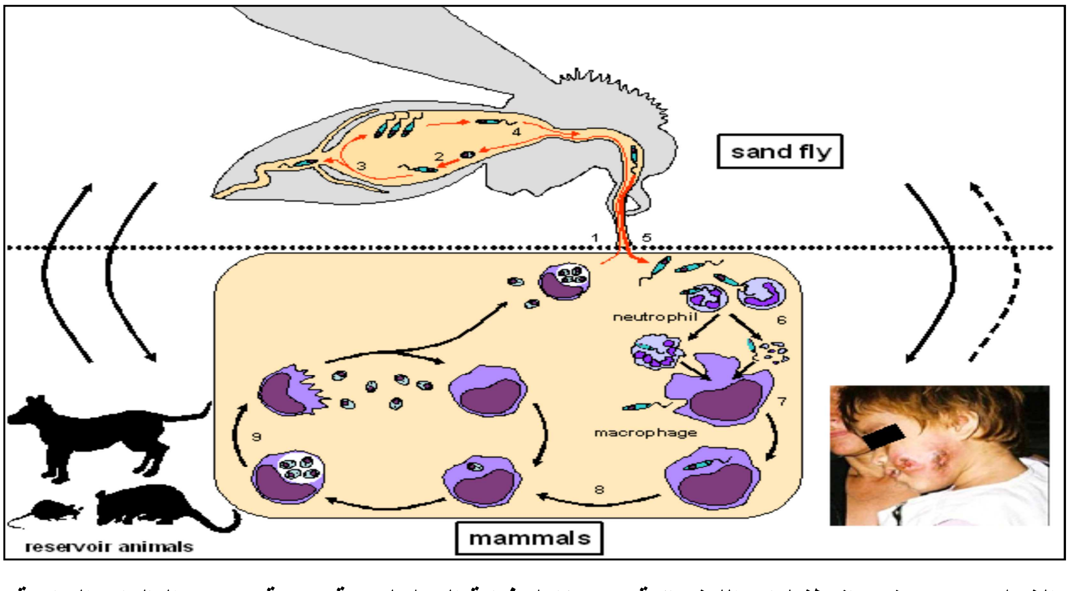
أما في دول الشرق الأوسط وإفريقيا وأمريكا الجنوبية فتعد القوارض البرية Rodents هي المستودع الرئيسي للطفيلي إذ تعد مستودعات رئيسية لطفيليات الليشمانية الكبرى *L. major*. ويعتبر فأر الرمل السمين *Psammomys obesus* من أكثر القوارض انتشاراً في سوريا والعراق وفلسطين والأردن وإيران والسعودية والكويت واليمن ومصر، ويعيش هذا الفأر في المناطق الجافة الصحراوية داخل جحور عميقة، ويتغذى على عشب الشنان *Anabasis articulate*[5].

4- دورة حياة الطفيلي Life Cycle of Leishmania

تعد طفيليات الليشمانية ثنائية الثوي diheteroxene فهي تحتاج إلى ثويين أساسيين لتتم دورة حياتها، وهما أنثى ذبابة الرملالتي تلعب دور المضيف الناقل والفقاريات التي تلعب دور المضيف الخازن[6]. يوضح الشكل 1 دورة حياة هذه الطفيليات التي تبدأ عندما تأخذ أنثى ذبابة الرمل الوجبة الدموية من ثوي مصاب. تبتلع الذبابة مع الدم الكريات البيض الوحيدة monocytes أو البالعات الكبيرة Macrophages الحاوية على الليشمانات. تخرج الليشمانات من البلاعم في معي الذبابة، فتفرز الخلايا المبطنة للمعي غشاء حولها يحفظها لمدة 72 ساعة، تتحول خلال هذه الفترة إلى مشيقات. يمكن التمييز بين نوعين من المشيقات، وفقاً لدرجة تطورها، مشيقات أولية منخفضة القدرة المعدية procyclic promastigote سندعوها تجاوزاً بالمشيقات غير معدية والمشيقات المعدية metacyclic promastegotes. تتكاثر المشيقات غير المعدية بسرعة بالانشطار الثنائي الطولي Binary fission ويتشكل سوط جديد ينجم عن تطور الخيط المحوري الناتج عن منشأ الحركة[7]، وتتصف بقدرة إخماجية منخفضة تجاه المضيف الفقاري[8]. وتتحرك المشيقات غير المعدية في الأمعاء ملتصقة بالطبقة المبطنة للأمعاء. تتوقف المشيقات المعدية عن التكاثر ولا يلتصق بجدران السبيل الهضمي وتتصف بقدرتها الإخماجية المرتفعة تجاه المضيف الفقاري[9]. ويترافق أثناء تحول المشيقات غير معدية إلى المشيقات المعدية إفراز لهلامة بروتيوفوسفوغليكان rich promastigote secretory gel (PSG) تؤدي إلى التصاق الطفيليات مع بعضها مما يؤدي إلى تشكيل سدادة تغلق المعي. تهاجر المشيقات في اليوم السابع إلى البلعوم الأمامي ثم إلى الخرطوم وتسدّه وحينها تصبح الحشرة شرهة للدم تنتظر فرصة جديدة للدغ إنسان سليم. تتقيأ الحشرة أثناء تناول

لوجبة جديدة مما يؤدي إلى انطلاق الأشكال المُعدِيَة metacyclic promastigote إلى المضيف الجديد[10]. في حين تموت أعداد كبيرة من الطفيليات، في أنسجة المضيف الفقاري، نتيجة لاحتواء سوائل أنسجة الجسم على مواد حالة للخلايا، يتغلغل قسم من المشيقات الأخرى داخل النسج ليجد طريقه إلى الكريات البيض البالعة في الجهاز الشبكي البطاني. وتتحول المشيقات السابقة إلى ليشمانات ضمن الخلايا السابقة وتتكاثر داخلها، وتؤدي الزيادة الكبيرة لعدد الطفيليات في البالعات المصابة إلى انفجارها وتحرر الليشمانات الموجودة ضمنها مما يسمح بإخماج خلايا بالعة جديدة وهكذا[11].

تتشابه أنواع طفيليات الليشمانية من حيث الشكل ودورة الحياة، لكنها تختلف في نوعية الأنسجة التي تصيبها، والتأثيرات المرضية التي تسببها، ونوع الناقل، والخازن، ومناطق انتشارها الجغرافي. ففي حين تبقى طفيليات بعض الأنواع مثل الليشمانية المدارية والمكسيكية في الجلد مسببة إصابات جلدية، تهاجر طفيليات أنواع أخرى من الجلد، عبر الدم، لتغزو مناطق أخرى من الجسم. حيث تنتقل طفيليات الليشمانية البرازيلية، مثلاً بعد غزوها الخلايا الشبكية البطانية في الجلد، إلى الأغشية المخاطية للأنف والفم والبلعوم مؤدية إلى تشوهات خطيرة يمكن أن تؤدي إلى موت المريض[12].



الشكل 1: دورة حياة طفيليات الليشمانية (1) تناول ذبابة الرمل لوجبة دموية تحتوي البالعات الحاوية ضمنها على الليشمانات. (2) تتحول الليشمانات إلى مشيقات. (3) تكاثرالمشيقات في المعي المتوسط. (4)هجرة المشيقات إلى الأجزاء الفموية. (5) انتقال المشيقات إلى المضيف الفقاري أثناء لدغة الذبابة. (6) غزو المشيقات للعدلات. (7) بلعمة البالعات المشيقات بشكل مباشر أو بشكل غير مباشرعبر بلعمة العدلات المخموجة بها. (8) تحول المشيقات إلى الليشمانات داخل البالعات. (9) تكاثر الليشمانات بالانشطار الثنائي ثم انحلال البالعات وتحرر الليشمانات لتقوم بغزو خلايا جديدة[13].

5- الوبائيات والفيزيولوجية المرضية Epidemiology and Physiopathology

5-1 التوزع الجغرافي لأدواء الليشمانيات

لأدواء الليشمانيات انتشار عالمي واسع، فهو ينتشر في أربعة قارات آسيا، وأوربا، وأمريكا وأفريقيا. وتستوطِّن أدواء الليشمانيات في 88 بلداً،22 بلداً في العالم الجديد و68 بلداً في العالم القديم. تقدّر منظمة الصحة العالمية الوقوع السنوي بنحو مليوني حالة تشمل نصف مليون حالة من داء الليشمانيات الحشوي ومليون ونصف حالة من داء الليشمانيات الجلدي. شخصت أكثر من 90% من حالات داء الليشمانيات الجلدي في أفغانستان وإيران والمملكة العربية السعودية والجمهورية العربية السورية في العالم القديم، وفي البرازيل وبيرو في العالم الجديد. وتم إحصاء أكثر من 90% من حالات داء الليشمانيات الحشوي في البرازيل وبنغلاديش والسودان ونيبال والهند.

يزداد انتشار المرض في الفئات الفقيرة من المجتمع، نتيجة الأعداد العالية للسكان وعدم إتاحة خدمات الوقاية والتشخيص والعلاج ونقص الوعي الصحي[14].

تم توثيق حالات من داء الليشمانيات في سورية في القرن الثامن عشر، فقد ذكره الطبيب البريطاني بوكوك *Bocock* عام 1745، ثم وضع العالم البريطاني الكسندر روسيل *Alexander Russell* وصفاً للمظاهر السريرية لداء الليشمانيات الجلدي في كتابه "تاريخ حلب الطبيعي" عام 1756 وأطلق عليها اسم قرحة حلب. وبقي داء الليشمانيات الجلدي محصوراً في حلب وما حولها وفي مناطق متفرقة حول الفرات حتى عام 1960 إذ حدثت جائحات محلية شملت أغلب محافظات القطر، خاصة في ريف دمشق في الضمير وما حولها[15].

أصبح داء الليشمانيات من المشكلات الصحية الهامة في القطر، وخاصة في السنوات الأخيرة، إذ شهد القطر ازدياداً كبيراً بعدد الإصابات المسجلة في عدة محافظات مثل دمشق وريفها، حلب، إدلب، الرقة، حمص، حماة، الحسكة والساحل السوري فبعد أن وصل عدد الإصابات إلى ذروته في عام 2003 بتسجيل 28881 إصابة تراجع إلى 17709 إصابة عام 2007 ثم ما لبث أن بدأ بالارتفاع ليسجل أكبر عدد من الإصابات في عام 2011 حيث بلغ 58156 إصابة مما يستوجب قرع جرس الإنذار إذ أصبحت سورية في مقدمة دول إقليم شرق المتوسط بتسجيل عدد الإصابات[16].

هذا ويجب الانتباه إلى أن الأعداد المسجلة في المراكز الصحية الخاصة بمكافحة داء الليشمانية قد لا يعبر عن الإصابات الحقيقية في الواقع، وذلك لعدم مراجعة العديد من المصابين لهذه المراكزأو لمراجعتهم أطباء جلديين خاصيين[135].

2-5 التظاهرات السريرية لأدواء الليشمانيات

يظهر داء الليشمانيات Leishmaniasis أشكال سريرية تختلف وفقاً لنوع الطفيلي وفوعته والاستجابة المناعية للمضيف. هذا ويمكننا التمييز بين عدة أنواع رئيسية لداء الليشمانية وسنقوم فيما يلي باستعراضها:

أ- داء الليشمانيات الجلدي Cutaneous leishmaniasis (CL)

يعرف هذا المرض بعدة تسميات محلية منها دمل الشرق أو حبة حلب أو حبة السنة أو حبة بغداد أو النيل أو دلهي أو جرش. تتوضع الآفات على المناطق المكشوفة من الجلد كالوجه واليدين والساعدين والساقين والقدمين ويرتبط توضعها بتقاليد اللباس في كل منطقة من المناطق التي ينتشر فيها الطفيلي[15].

تبدأ الآفة بحطاطة صغيرة حاكة قليلاً، تظهر مكان لدغة ذبابة الرمل، ثم تتوسع ببطء لتشكل قرحة ذات حواف مرتفعة صلبة ومحمرة. يمكن أن تبقى هذه الآفة جافة نسبياً مع قشرة مركزية (الشكل 2- أ) فتدعى بالشكل الجاف وتنجم عن الإصابة بطفيليات الليشمانية المدارية *L. tropica* وتنتشر في المدن، أو يمكن أن تكون الآفة نازة لمواد قيحية وتسمى بالشكل الرطب (الشكل 2– ب) وتنجم عن الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى *L. major* وتنتشر في الأرياف[17].

ينجم داء الليشمانيات الجلدي عن الإصابة بعدة أنواع من الليشمانية تشمل أنواع كل من: معقد الليشمانية المدارية *L. tropica*، ومعقد الليشمانية المكسيكية *L. mexicana*، ومعقد الليشمانية الكبرى *L. major*، ومعقد الليشمانية الأثيوبية *L. aethiopica*، ومعقد الليشمانية البرازيلية *L. braziliensis*[18].

ب أ

الشكل 2: داء الليشمانيات الجلدية: الشكل الجاف (أ)[1]، الشكل الرطب (ب)[19].

ب- داء الليشمانيات الجلدي المخاطي (MCL) Mucocutaneous leishmaniasis

يعرف هذا الداء بأسماء مختلفة وهي: إسبونديا Espondia، وداء الليشمانيات الأمريكي American Leishmaniasis، وقرحة أوتا Uta ulcer، وداء بيان بوا Pian bois، وقرحة شيكلرو Chiclero ulcer[37]. وينجم داء الليشمانيات الجلدي المخاطي بشكل عام عن الإصابة بطفيليات معقد الليشمانية البرازيلية *L. baraziliensis* وفي بعض الحالات النادرة عن الإصابة بطفيليات معقد الليشمانية الأثيوبية. تعكس هذه الإصابة تطوراًمزمناً لآفة جلدية لم تشف بالشكل المطلوب. وبالتالي يمكن أن ينتج داء الليشمانيات الجلدي المخاطي عن معالجة لبعض أنواع الليشمانية المعالجة بشكل غير صحيح أو غير كافي[21].

يتصف هذا النمط من الداء بتآكل الأنسجة الرخوة والغضروفية (الشكل 3 – أ) حيث تعد أغشية الأنف والفم الأكثر عرضة للإصابة وتليها أغشية الخد، والحلق، ولسان المزمار، والحنجرة، والحبال الصوتية، والقصبة الهوائية، والأعضاء التناسلية[22]. ويؤدي التريث في معالجة هذا الشكل إلى تشوهات خطيرة. يمكن أن يؤدي هذا الداء إلى موت المريض.

ث- داء الليشمانيات الحشوي (VL) Visceral leishaniasis

يأتي هذا الداء في المرتبة الثانية بعد الملاريا في تصنيف الأمراض الطفيلية القاتلة في العالم ويُعد مسؤولاً عن حوالي نصف مليون وفاة في العالم سنوياً، ويطلق عليه تسميات متعددة

منها: الكلازار Kala-azar، وتعني الحمى السوداء Black fever، داء سيركاري Sirkari disease، وداء ساهيب Sahib disease، وحمى دوم دوم dum-dum fever، وحمى بورداون Burdown disease[23]. ينجم هذا الداء عن الإصابة بطفيليات معقد الليشمانية الدونوفانية الذي يضم الليشمانية الدونوفانية *L. donovani* والليشمانية الطفلية *L. infantum* في العالم القديم، وطفيليات الليشمانية الشاغاسية *L. chagasi* في العالم الجديد. تصيب هذه الطفيليات خلايا الجملة الشبكية البطانية للأحشاء كالكبد والطحال ونخاع العظم مؤديةً إلى فرط تصنع خلوي شديد. يتظاهر الداء سريرياً، بعد فترة حضانة قد تمتد من بضعة أسابيع إلى ثلاثة أشهر، بحمى متموجة غير منتظمة irregular، وفقدان للوزن، وضخامة شديدة في الطحال وهي ضخامة صلبة غير مؤلمة، وضخامة كبدية، وفقر دم شديد، ونقص الكريات البيض، وفرط غلوبولين الدم (الشكل3–ب) الإصابة بهذا الداء لدى أحد الأطفال. تزداد خطورة المرض عند عدم المعالجة مما يمكن أن يؤدي إلى موت المصابين جميعاً وبالتالي يكتسب التشخيص الدقيق والمعالجة السريعة أهمية كبيرة في الشفاء[24].

أ   ب

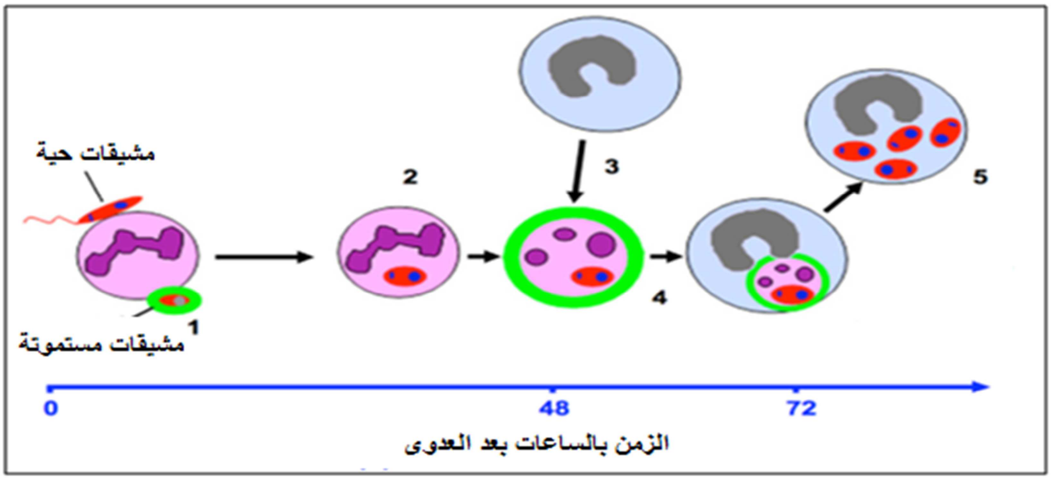
الشكل 3: التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات: الجلدية المخاطية (أ)، والحشوية (ب).

6- طفيليات الليشمانية والاستجابة المناعية

تلعب المناعة الخلوية cellular immunity دوراً أساسياً تجاه طفيليات الليشمانية حيث تلعب الخلايا التائية T cells الدور الرئيسي في السيطرة على تكاثر الطفيلي مقارنة مع المناعة الخلطية humoral immunity التي تلعب دوراً ثانوياً تجاه الإصابة[25].

1-6 الاستجابة المناعة خلال تطور الإصابة الجلدية

الليشمانية هي طفيليات داخل خلوية مجبرة. يستجيب الجهاز المناعي منذ لحظة دخول مشيقاتها إلى المضيف الفقاري بواسطة لدغة ذبابة الرمل. تتخرب هذه الطفيليات نتيجة لآلية الانحلال التي تتوسطها بروتينات المتممة[26].وقد تبين امتلاك لعاب ذبابة الرمل لعدة بروتينات فعالة تسمح للمشيقات بمقاومة الظروف الموجودة حيث تزيد من سرعة حضور الخلايا البلعمية phagocytes لموضع اللدغة، وتثبط فعالية المواد التي تفرزها هذه الخلايا[27]. يتم بلعمة المشيقات التي لم تتخرب من قبل العدلات neutrophils بشكل نوعي عبر مستقبلات تعرف النمط pattern recognition receptors. تعتبر العدلات أول الخلايا المناعية التي تهاجر إلى مكان العدوى infection وتملك نصف عمر قصير حوالي 6-10 ساعات حيث تتعرض بعد ذلك تلقائياً للاستماتة spontaneous apoptosis، في الحقيقة تسمح الجزيئات السكرية الفوسفورية الشحمية الغشائية Lipophosphoglycan (LPG)، بعد بلعمة العدلات لطفيليات الليشمانية، بتثبيط عملية الاستماتة وبالتالي بقاء العدلات المخموجة حية لمدة يومين. يسمح تحول المشيقات إلى الليشمانات بوقف تأثيرعملية الهبة التنفسية respiratory burst مما يضمن بقاءها حية داخل العدلات[28]. وبعد ذلك تتعرض العدلات المخموجة للاستماتة وتفرز البروتين macrophage inflammatory protein1b (MIP-1b) الذي يجذب البالعات إلى مكان العدوى لتقوم ببلعمة العدلات المخموجة المستموتة apoptotic infected neutrophil. تتم بلعمة البالعات للعدلات المخموجة المستموتة دون وساطة أية مستقبلات خاصة على سطح البالعات مما يؤمن دخول صامت silent entry للطفيلي داخل البالعات (الشكل4).



الشكل 4: الأحداث المناعية المبكرة في داء الليشمانيات الجلدي (1) بلعمة العدلات المشيقات الحية أو المشيقات المستموتة. (2) تحول المشيقات إلى ليشمانات داخل العدلات. (3) تعرض العدلات المخموجة للاستماتة بعد مرور 48 ساعة على العدوى وانجذاب البالعات إلى مكان العدوى. (4) بلعمة البالعات للعدلات المخموجة المستموتة مما يؤمن دخول صامت للطفيلي داخل البالعات. (5) تكاثر الليشمانات داخل البالعات.

كذلك تؤدي عملية بلعمة العدلات المخموجة المستموتة إلى زيادة إنتاج السيتوكينات المضادة للالتهاب anti-inflammatory cytokines مثل TGF-β وIL-10 التي تقلل من فعالية البالعات في قتل الطفيلي وتنقص التعبير عنIL-12 وعامل نخر الورم ألفا TNF-a من قبل البالعات مما يتيح الفرصة لليشمانات بالتكاثر داخل البالعات[29].

أما بالنسبة إلى المشيقات، التي لم يتم بلعمتها من قبل العدلات، فتتم بلعمتها عن طريق تفعيل السبيل البديل لبروتينات المتممة الذي يبدأ بتثبيت المكون الثالث C3 على سطح الطفيلي بالارتباط مع الجزيء البروتيني السكري GP63 والجزيءالسكري الفوسفوري الشحمي LPG، وينشطر C3 إلى C3b الذي يرتبط مع مستقبله Complement receptor type 1 (CR1) وإلى C3bi الذي يرتبط بمستقبله النوعي Complement receptor type 3 (CR3) الموجودان على سطح البالعات[30]، يعد هذا المستقبل أحد مكونات المعقد macrophage-1 antigen(Mac-1) الذي يتألف بشكلٍ أساسي من CD11b وCD18[31]. وتشير الدراسات إلى عدم قدرة الأضداد الوحيدة النسيلة المضادة لـ CR3 على التثبيط الكامل لارتباط الطفيليات بالبالعات بشكل كامل وبالتالي وجود مستقبلات أخرى يشكل البحث عنها أساساً للعديد من الدراسات الحالية. وأكدت دراسات عديدة ارتباط طفيليات الليشمانية مع عدة مستقبلات معروضة على سطح

البالعات منها: مستقبل fc receptor، ومستقبل mannose-fucose receptor، ومستقبل CR1 receptor، ومستقبل lectin-like receptor، ومستقبل fibronectin receptors[32].

بعد أن يتم ارتباط المشيقات بمستقبلات متعددة على سطح الخلايا البالعة، تدخل إليها بالبلعمة Endocytosis ويصبح الطفيلي ضمن فجوة هاضمة تسمى يبلوع Phagosome حيث يكون محاطاً بجزء من الغشاء البلازمي للخلية البالعة. بعد ذلك تندمج اليحاليل Lysosomes مع هذا اليبلوع مشكلة يباليع يحلولية Phagolysosomes. يتطلب بقاء هذه الطفيليات حية داخل اليباليع اليحلولية أن تتحول من مشيقات إلى ليشمانات. يترافق مع هذا التحول تغيرات في شكل الطفيلي، وتغيرات استقلابية تسمح بتكيف الطفيلي مع الوسط الحمضيداخل الفجوة، وتغيرات في التركيب البيوكيميائي لغشاء الخلية[33].

تسمى هذه المرحلة الأولية من العدوى بالطور الصامت phasesilent، الذي يدوم حوالي 5-4 أسابيع بعد العدوى، ويتميز بعدم ظهور أية إصابة جلدية[34].

تتكاثر الليشمانات داخل البالعات حتى تصل إلى أعداد كبيرة، مما يؤدي إلى انفجار البالعات وتحرر الليشمانات منها والتي تؤدي بدورها إلى إخماج بالعات أخرى. لا يتوفر الكثير من المعلومات المتعلقة بآلية دخول الليشمانات إلى البالعات مع أن هذه المرحلة تعد المسؤولة عن الإمراضية لدى المضيف الفقاري[35].ولكن أكدت دراسة أن استخدام أضداد ضد المستقبل CR3 يؤدي إلى تثبيط بلعمة الليشمانات من قبل البالعات في الفئران BALB/c المخموجة بالليشمانية الكبرى[36]. كما أدى إخماج الفئران BALB/c المعدلة وراثياً، تعاني من عوز في الخلايا البائية B وفئران تفتقد إلى السلسلة γ للمستقبل Fc، بليشمانات طفيليات الليشمانية المكسيكية إلى تطور آفات جلدية ولكن بشكلٍ ضعيفٍ جداً. مما يؤكد أهمية كل من الأضداد والمستقبل Fc والمستقبل CR3 في بلعمة الليشمانات وحدوث الخمج[37].

وبعد انفجار البالعات وتحرر الليشمانات منها، تتدفق أعداد أكثر منالبالعات والخلايا الالتهابية مثل العدلات والحمضات والخلايا البدينة إلى مكان العدوى وتزداد تراكيز السيتوكينات قبل الالتهابية proinflammatory cytokines التي تفرزها البالعات المخموجة مثل TNF-a. تفعل السيتوكينات السابقة البالعات لقتل الطفيلي وذلك من خلال

تحريضها على إنتاج أكسيد النتريك NO في البالعات وزيادة في فعالية NADPH oxidase وبالتالي إنتاج المزيد من الوسائط الأوكسيجينية الفعالة reactive oxygen species (ROS). تؤدي هذه الوسائط الفعالة (NO،ROS) إلى قتل وتخريب طفيليات الليشمانية التي تم بلعمتها.

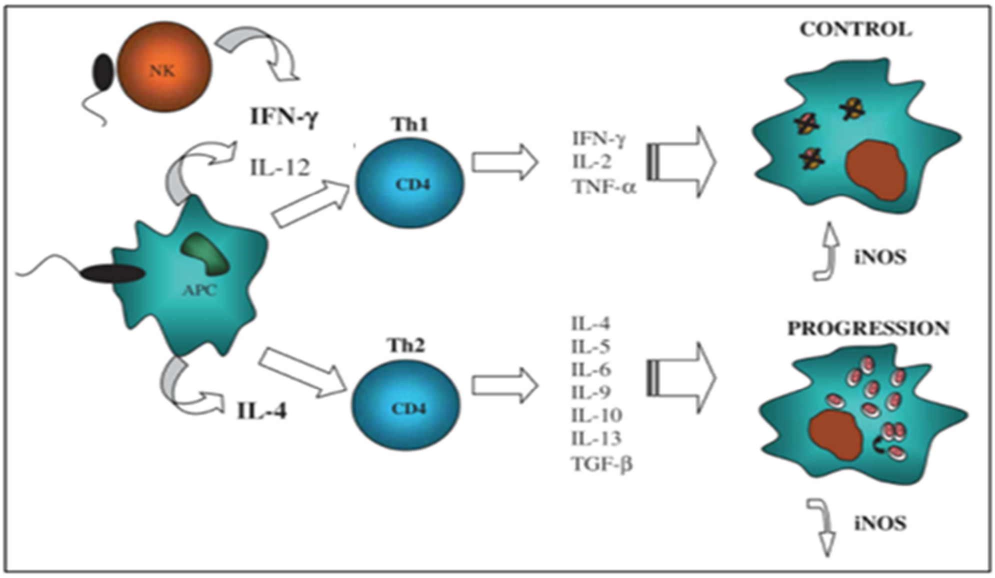
تمتلك البالعات آليات دفاعية متعددة ضد الأجسام الغريبة داخلها وكذلك تمتلك طفيليات الليشمانية إستراتيجيات دفاعية تمكنها من مقاومة تلك الآليات والعيش في محيط عدائي جداً ضمن الييلوع - اليحلولي في البالعات. حيث يتمكن الطفيلي من المحافظة على قيمة Ph معتدلة لوسطه الداخلي وقد يعود ذلك إلى وجود مضخات البروتون proton pumps على الغشاء البلاسمي للطفيلي في كلا الطورين تعمل على ضخ البروتونات خارج الطفيلي. كما يمنع تحول المشيقات التي تمت بلعمتها إلى الليشمانات الهبة التنفسية، وتبقى داخل البالعات، إذ تعتمد الطفيليات في هذه المرحلة على جزيئات LPG في تثبيط فعالية إنزيم بروتين كيناز C. يعتمد بقاء الليشمانات على قيد الحياة داخل البالعات على التوازن بين كفاءة الاستجابة المناعية للإصابة من جهة ومقاومة حالات قتل الأحياء الدقيقة microbiocidal داخل اليباليع اليحلولية في البالعاتمن قبل الطفيلي من جهة أخرى[38].

تؤدي الاستجابة المناعية السابقة إلى الإضرار بأنسجة المضيف (Pathologic tissue injury) وبالتالي تُعزى التأثيرات المرضية التي تصاحب العدوى بطفيليات الليشمانية إلى الاستجابة المناعية للمضيف وليس إلى الطفيلي بحد ذاته. وتسمى هذه المرحلة من العدوى بالطور الثاني أو الطورالالتهابي phaseinflammatory، الذي يتميز بظهور الإصابة الجلدية.

تلعب البالعات والخلايا التغصنية، وهي من الخلايا المقدمة للمستضد، دور صلة الوصل ما بين المناعة الخلقية والمناعة التلاؤمية. وتلعب دوراً هاماً في التعرف على المشيقات الممنعة بلدغة ذبابة الرمل في الجلد ومن ثم تهاجر إلى العقد اللمفية النازحة التي تشكل المكان الملائم والمجهز لتقديم المستضد إلى الخلايا التائية وتفعيلها للقيام بالاستجابة المناعية المناسبة[39]. تتواكب هذه الهجرة مع نضج الخلايا المقدمة للمستضد ويترافق ذلك مع دخول جزيئات معقد التوافق النسيجي من الصف الثانيMHC II بالنسبة للبالعات وجزيئات معقد التوافق النسيجي من الصف الأول والثاني بالنسبة للخلايا التغصنية إلى اليباليع الحاوية على الليشمانات. يرتبط المعقّد MHC مع الببتيدات التي تنشطر من الليشمانات نتيجة

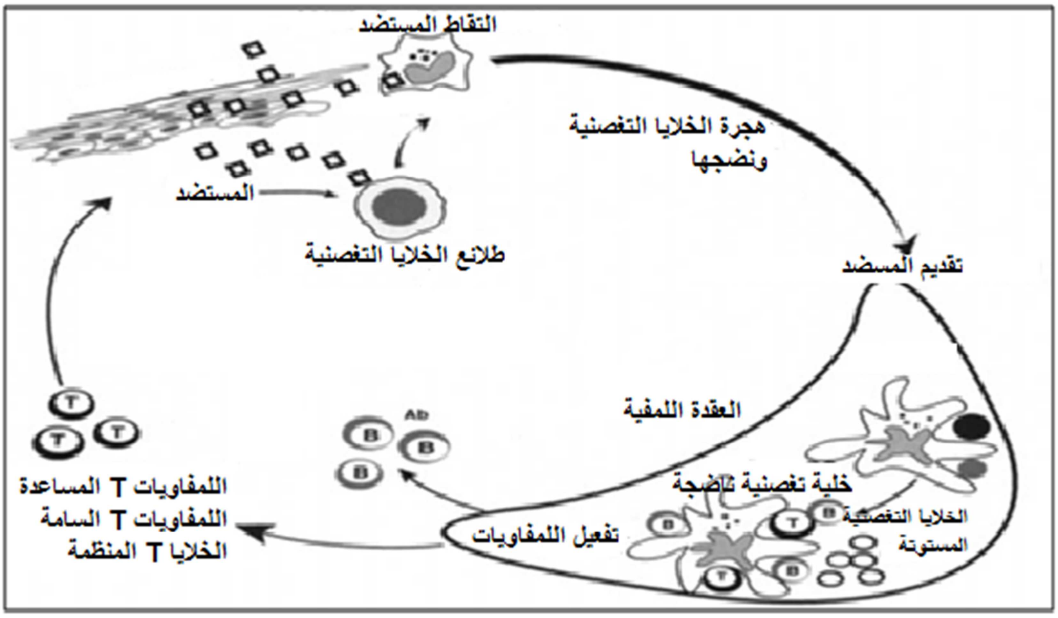
تأثيرالأنزيمات الحالة فتتشكل جزيئات المعقد المرتبطة بالببتيدات التي تنتقل نحو الغشاء الخارجي للخلايا المقدمة للمستضد. يؤدي انتشار الجزيئات السابقة على سطح الخلايا المقدمة للمستضد إلى تنبيه مباشرللخلايا التائية وذلك نتيجة امتلاك الخلايا التائية لمستقبلاتTCR تستطيع أن تتعرف على المعقد ببتيد–MHC وبالتالي الارتباط معها[40]. يؤدي حدوث التعرف السابق إلى حدوث استجابة مناعية تبدأ عندما تظهر الخلايا المقدمة للمستضد إشارة إضافية للخلية التائية. يعتبر الجزيء B7 الموجود على سطح الخلية المقدمة للمستضد أحد جزيئات السطح القادرة على القيام بهذه الوظيفة الإضافية حيث يرتبطمع المستقبل CD28، وهو مستقبل غشائي نوعي على سطح اللمفاويات التائية. يعتبر ارتباط مستقبل الخلية التائية TCR مع المعقد ببتيد - MHC وارتباط الجزيء B7 مع المستقبل CD28 أموراً ضرورية لكي تظهر الخلايا التائية الاستجابة المثلى[41]. يمكن أن يؤدي غياب الإشارة B7 المساعدة إلى أن تصبح الخلية التائية عاجزة عن الاستجابة للمستضد[42]. يؤدي استقبال الخلية التائية الساذجة للإشارة المزدوجة إلى تفعيلها فتتمايز وتتكاثر differentiation. تتعرض معظم هذه الخلايا التائية المفعّلة للاستماتة في العقد اللمفية ويتحول قسم منها إلى خلايا تائية ذاكرة فعالة T effector memory وخلايا تائية ذاكرة مركزية T central memory. تهاجر الخلايا التائية الذاكرة الفعالة إلى مكان العدوى وتطلق السيتوكينات وفقاً لنوعها. تقسم الخلايا التائية إلى تحت مجموعتين تسميان الخلايا Th1 والخلايا Th2، تمارسان وظائف مختلفة نتيجة إنتاجهما لسيتوكينات مختلفة. يحرض IL-4 المنتج من الخلايا التغصنية الخلايا التائية من نمط Th2على إفراز مجموعة من السيتوكينات، وهي IL-4 وIL-5 وIL-10 وIL-13، التي تثبط تشكيل NO المسؤول عن قتل الطفيليات داخل البالعات وبالتالي تمنع قتل الطفيليات والتخلص منها. كما يحرض IL-12 المنتج من الخلايا التغصنية الخلايا التائية من نمط Th1على إفراز IFN-γ وIL-2 وTNFα، حيث تسهم السيتوكينات السابقة وخاصة الانترفيرون غاما في تحريض البالعات على قتل الطفيلي عبر تشكيل NO.

وفي الحقيقة يتم أيضاً تحريض إفراز الخلايا التائية للـIFN-γ وIL-2، نتيجة لتأثير IFN-γ المنتج من قبل الخلايا الطبيعية القاتلة NK الذي يسهم أيضاً بزيادة التعبير عن مستقبلات IL-12 على سطح الخلايا التائية الفعالة[43،44] (الشكل 5).



الشكل 5: الاستجابة المناعية الخلوية تجاه طفيليات الليشمانية حيث ترتبط المقاومة والحساسية للداء على نمط السيتوكينات المفرزة، يحرض IL-4 المنتج من الخلايا التغصنية الخلايا التائية من نمط Th2على إفراز IL-4 وIL-5 وIL-10 وIL-13 وTGF-β، التي تثبط تشكيل NO المسؤول عن قتل الطفيليات داخل البالعات وبالتالي تمنع قتل الطفيليات. ويحرض IL-12 المنتج من الخلايا التغصنية و الـIFN-γ المنتج من قبل الخلايا الطبيعية القاتلة NK الخلايا التائية من نمط Th1على إفرازγ -IFN وTNFα وIL-2، حيث تسهم السيتوكينات في تحريض البالعات على قتل الطفيلي عبر تشكيل NO[45].

تجول خلايا التائية الذاكرة المركزية في النسج اللمفية لتستجيب بسرعة في حال تعرض الجسم للعامل الممرض مرة أخرى. كذلك الأمر بالنسبة للخلايا البائية فيتم تنشيطها في العقد اللمفية، بعد ارتباطها بالخلايا التائية والخلايا التغصنية، لتهاجر بعدها إلى مكان العدوى وتتمايز إلى الخلايا البلاسمية لتنتج الأضداد[46]. تتعرض الخلايا التغصنية بعد قيامها بتفعيل اللمفاويات (الخلايا التائية $CD4^+$ والخلايا التائية السامة +CD8والخلايا البائية) للاستماتة[47] (الشكل6).



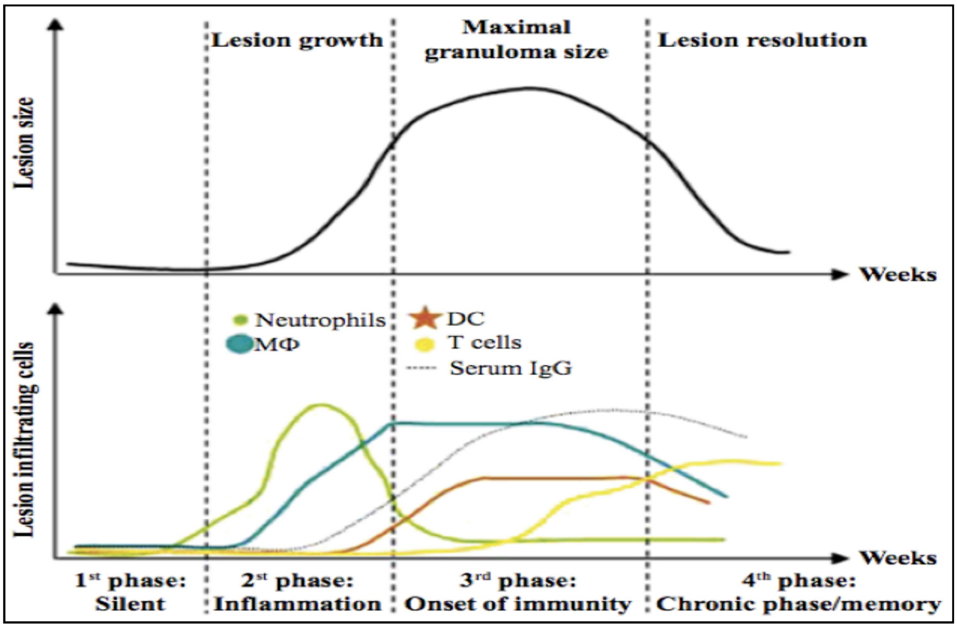
الشكل 6: الخلايا التغصنية صلة وصل بين المناعة الخلقية والمناعة التلاؤمية. تلتقط الخلايا التغصنية غير الناضجة المستضد بعد دخوله إلى العضوية ومن ثم تهاجر إلى العقدة اللمفية وتنضج لتقدم المستضد إلى اللمفاويات التائية والبائية الساذجة مما يؤدي إلى تفعيل هذه خلايا فتتمايز وتتكاثر ومن ثم تهاجر إلى مكان العدوى ومن ثم تتعرض الخلايا التغصنية للاستماتة بعد قيامها بتفعيل اللمفاويات.

تتفاقم الإصابة الجلدية في هذه المرحلة من العدوى حيث تظهر في مكان العدوى الخلاياالبائية +CD19 والغلوبولينات المناعية IgG والخلايا التائية ($CD4^+$و$CD8^+$)[48]. تعتبر الغلوبولينات المناعية IgG ضرورية لطهاية الطفيلي والارتباط مع المستقبل Fc الموجودة على سطح البالعات والخلايا التغصنية. فقد أدى إخماج فئران C57BL/6 تعاني من عوز في الخلاياالبائية B وتفتقر إلى السلسلة غاما للمستقبل Fc بطفيليات الليشمانية الكبرى إلى نقص أعداد الخلايا التغصنية المصابة بالطفيلي في مكان العدوى ونقص إنتاج IFN-γ من الخلايا التائية وتحولها من فئران مقاومة إلى فئران حساسة للإصابة مما يؤكد أهمية IgG في بلعمة الخلايا التغصنية للطفيلي وتطور مناعة فعالة ضد طفيلي الليشمانية [49].

تترافق حالات الشفاء من الإصابة الجلدية مع غلبة الخلايا المنتجة للـ IFN-γ بينما تترافق حالات عدم الشفاء مع غلبة الخلايا المنتجة للـ IL-4 وIL-5. أما بالنسبة للطور المزمن chronic phase من الإصابة فقد لوحظت استجابة مختلطة تنجم عن التأثير المشترك لكل من خلايا Th1 وTh2 وتترافق مع زيادة في إنتاج الـ IL-10 وIL-2. تلعب الخلايا التائية المنظمة CD4 CD25 T reg دوراً رئيسياً في هذا الطور حيث تنظم الاستجابة

المناعية للخلايا التائية عبر إفراز IL-10 وTNF-β.وقد تبين أن IL-10 يلعب دوراً هاماً في بقاء الطفيلي في حالة كمون، ويعتبر بقاء الطفيلي بشكل كامن في الخلايا التغصنية هاماً جداً لاستمرار بقاء الخلايا التائية الذاكرة. حيث تماثلت الفئران المعوزة للـ IL-10 بمفرده، أو المعوزة لكل من IL-10 وIL-4 معاً، إلى الشفاء بشكل كامل من الطفيلي ولم يبقى لديها أي طفيلي حي. كما تم التخلص من كامل الطفيليات عند الفئران C57BL/6 المعالجة، أثناء الطور المزمن، بأضداد مستقبل IL-10[50][51].,

ويوضح الشكل7 الخلاياالمناعية التي تدخل في الاستجابة المناعية خلال أطوار الإصابة بداء الليشمانيات الجلدية الفأري.



الشكل7:الخلايا المناعية التي تدخل في الاستجابة المناعية خلال أطوار الإصابة بداء الليشمانيات الجلدية الفأري[46].

2-6 المظاهر المناعية في داء الليشمانيات الجلدي الفأري

تم استخدام عدة نماذج حيوانية مثل الهامستر والكلاب والقرود لدراسة داء الليشمانيات الحشوية والجلدية، ولكن بسبب صعوبة وكلفة ونقص الكواشف reagents اللازمة لتحديد الاستجابة المناعية أعاقت استخدام هذه النماذج الحيوانية وتم استبدالها بالفئران المخبرية.

إن توافر الفئران والكواشف والفئران المعوزة لإحدى الجزيئات المناعية، والتي تسمح بدراسة دور هذه الجزيئات في تطور المرض، جعلت من الفئران النماذج الحيوانية الأكثر أهمية لدراسة العلاقة بين المضيف والطفيلي[52][53].,

كذلك تم اكتشاف الدور الهام والمركزي للخلفية الجينية genetic background للمضيف في الإصابة بداء الليشمانيات عن طريق النماذج الفأرية المختلفة المتوفرة حيث توفرت فئران حساسة وأخرى مقاومة لهذا الطفيلي. ورغم أن أغلب السلالات الفأرية المخبرية مقاومة للإصابة بداء الليشمانية إلا أن الفئران BALB/C غير قادرة على ضبط الانتان المحدث بطفيليات الليشمانية مما يسمح بتطور داء الليشمانية لديها. سمح تحليل الرنا RNA المرسال المأخوذ من خلايا الطحال أو من العقد اللمفاوية للفئران BALB/C المصابة بإيضاح الاختلافات الأساسية في نموذج اللمفوكينات المنتجة من قبلها. حيث تعبر الفئران الحساسة BALB/C، بعدإصابتها بهذا الطفيلي، عن الرنا RNA المرسال الذي يرمز للـIL-4 وIL-10 بينما تعبر الفئران المقاومة مثل C57BL/6 عن الرنا RNA المرسال الذي يرمز للـIL-12وIFN-γ.

في حين يرتبط التأهب الجيني للفئران المقاومة باستجابة مناعية تائية $CD4^+$ T من نمط Th1 فإنه يرتبط لدى الفئران الحساسة باستجابة مناعية من نمطTh2.في الحقيقة لاتزال الآليات المسؤولة عن تمايز Th_1 عند الفئران المقاومة والآليات المسؤولة عن تمايز Th_2 عند الفئران الحساسة غير مفهومة بشكل كامل[54].

أكدت دراسات عديدة أن المناعة تجاه هذا الداء تعتمد على الاستجابة المناعية الخلوية والتي تنظمها بشكل أساسي الخلايا التائية.حيث لا يتبدل تطور المرض عند الحيوانات التي تم استنفاذ الخلايا البائية منها، كما تبقى الفئران BALB/C حساسة للإصابة بعد تمنيعها بالأضداد المعزولة من الفئران الممنعة. كما تتطور الإصابة بداء الليشمانية لدى الفئران التي استؤصلت منها غدة التيموس بسهولة مقارنة مع الفئران الشاهدة، ويتم إعادة اكتسابها للمقاومة لها بعد نقل الخلايا التائية إليها[33].

يفرز IL-12 بشكل رئيس من الخلايا المقدمة للمستضد APC كالبالعات الكبيرة والخلايا التغصنية. يحرض IL-12 إنتاج IFN-γ من الخلايا NK والخلايا T ويعتبر من أهم السيتوكينات المفرزة في المراحل الباكرة من الإصابة[55]. أكدت دراسة أن معالجة الفئران BALB/C الحساسة للإصابة بالليشمانية، بالـIL-12 يؤدي إلى تحولها إلى فئران مقاومة. كما بينت دراسات عديدة أن هذا الإنترلوكين ضروري لتوجيه الاستجابة المناعية في المراحل الأولى للإصابة إلى مناعة من النمط Th1[56]. أكدت الدراسات التي أجريت على

الفئران C57BL/6 المعدلة جينياً، فئران تفتقر إلى جين IL-12، دورIL-12 في مقاومة الإصابة حيث أبدت هذه الفئران حساسية تجاه الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى[57].

يؤدي INF-γ وTNF-α، المفرزان من قبل الخلايا التائية من النمط Th1، دوراً جوهرياً في مقاومة الخمج. فقد بينت التجارب في الأوساط الصنعية *In vitro* التأثير التآزري لكل من INF-γ وTNF-α حيث يحريض كل منهما البالعات على إنتاج جذور نترية حرة ذات تأثير قاتل للطفيلي. كما بينت التجارب دورINF-γ المضاد للطفيلي في الحي *In vivo* أيضاً، حيث يتوسط INF-γ إنتاج NO في البالعات مما يعزز عملية القتل داخل البالعات المخموجة للتخلص من الطفيلي[58]. تتفاقم الإصابة عند إخماج فئران معدلة جينياً، تفتقر إلى جين INF-γ أو جين مستقبل INF-γ، مما يشير إلى دوره في مقاومة العداوى بطفيليات الليشمانية[6059].,

يشكل IL-4 عنصراً أساسياً في تطور استجابة مناعية من نمط Th2. ففي الحقيقة تنجم جميعا لإجراءات المناعية القادرة على تحويل الإستجابة من النمط Th2 إلى Th1 عن تثبيط إنتاج IL-4 في الأسبوع الأول من الإخماج. كما تؤدي معالجة الفئران BALB/C بأضداد IL-4 في بداية الإخماج بـ *L. major* إلى تثبيط استجابة مناعية من النمط Th2 مما يسمح بتطور استجابة من النمط Th1 ويجعل الفئران مقاومة للخمج[61]. وبالتالي يبدو أن IL-4 يوجه الاستجابة المناعية إلى استجابة من النمط Th2 وعلى العكس فإن IL-12 يمكن أن يؤدي إلى تطور استجابة من النمط Th1 أثناء الإخماج بـ*L. major*[62]،

وعلى الرغم من توافر الأدلة على أن IL-4 يوجه الاستجابة المناعية إلى استجابة من النمط Th2فقد تبين أن الفئران المعوزة لـ IL-4 أو المعوزة لمستقبلات IL-4 والمخموجة بإحدى سلالات *L. major* تبقى حساسة للإصابة بداء الليشمانية مما يشير إلى وجود سيتوكين آخر يعمل على مستقبلات IL-4 ويساهم في حساسية الفئران للإصابة وهو الانترلوكين 13. فقد تبين أن IL-13 ينظم سلبياً down regulation فاعلية البالعات، المتضمنة إنتاج IL-12 وNO وTNF، ويزيد إنتاج البروستاغلاندين PGE2 الذي يثبط التعبير عن مستقبلات IL-12على سطح الخلايا التائية[63].

تساهم الخلايا التائية القاتلة $T\ CD^{+8}$ في السيطرة على الخمج من خلال إنتاجهالـ INF-γ وفعاليتها الحالة للخلايا lytic activities[64].

تعتبر الخلايا القاتلة الطبيعية NK من المصادر الأولية لـ INF-γ وقد أكدت الدراسات دورها في السيطرة على تكاثر الطفيلي في المراحل المبكرة من الإصابة، ودورها في بدء تمايز الخلايا التائية الساذجة إلى Th1[65].

7- لقاحات الليشمانية

شجعت الوقائع التي بينت أن الأفراد المصابون بداء الليشمانية الجلدي والذين شفيت إصاباتهم لا يصابون مرة أخرى بالداء الباحثين على تطوير لقاح ضد هذا الداء. وعلى الرغم من جهود الباحثين الحثيثة للتوصل لهذا اللقاح فإنهم لم يتوصلوا بعد إلى تحضير لقاح فعال وآمن لوقاية الإنسان من الإصابة. ومن المشاكل التي تواجه الباحثين:

1- المعرفة غير الواسعة بآلية الليشمانية الإمراضية.

2-آليات رد الفعل المناعي المعقدة.

3-عدم إمكانية تطبيق هذه المعارف لإيجاد الطريقة المناسبة للقضاء على هذا الخمج.

إلا أن الاهتمام المتزايد في السنوات الأخيرة بالحصول على لقاح ناجع مترافقاً بتطوير سواغات جديدة لهذه اللقاحات يعطينا الحافز والأمل بالتوصل لصيغة لقاح ناجعة مرتكزين بذلك على التطورات اليومية بفهم الآليات المناعية ضد الطفيلي.

أجريت عدة محاولات تجريبية في دول مختلفة لتطوير لقاح مضاد لداء الليشمانيات استخدمت فيها في البدء طفيليات حية، ثم طفيليات مقتولة، ثم طفيليات حية مضعفة الفوعة، ثم مستضدات معزولات أو مستضدات صنعية نوعية تم تحضيرها بطرائق التقانات الحيوية الجزيئية والتأشيب[66].

1-7 التلقيح بطفيلي الليشمانية Leishmanization

يعد تعريض مناطق مخفية من الجسم (بعيدة عن الوجه واليدين) للدغة الذبابة وتركها لتتطور بشكل طبيعي نحو الشفاء من أقدم طرق اللقاح المستخدمة ضد داء الليشمانية الجلدي. وسمح نجاح Nicole وManceam بتحضير وسط خاص يسمح بنموالمشيقات لهذه الطفيليات، باستخدام مشيقات الليشمانية الكبرى *L.major* الحية المفوعة على نطاق واسع في التلقيح في الفترة ما بين عام 1970s و1980s. ونظراً لإمكانية تطور آفات

جلدية كبيرة، وانخفاض فعالية اللقاح المحضر من المشيقات السابقة نتيجة لانخفاض فوعة الطفيلي الناجم عن تكرار زرعها، توقفت الدراسات السابقة واستبدلت بدراسات تركز على تطوير لقاح يعتمد على استخدام طفيليات مقتولة[67].

ثم اتبع نهجاً آخر من اللقاحات الحية المفوعة من قبل بريتون Breton وزملاؤه الذين استخدموا سلالة غير ممرضة للبشر وهي *L. tarentolae* لتمنيع الفئران، اعتماداً على تفاعلات التمنيع التمصالب بين الأنواع، وقد أعطى هذا اللقاح حماية للفئران ضد داء الليشمانيات الحشوي عند الإخماج بطفيليات الليشمانية الدونوفانية[68].

2-7 اللقاحات المحضرة من طفيليات مقتولة Killed parasite vaccine

جرت عدة محاولات لإعداد محضرات مختلفة من الأنواع المختلفة للطفيليات، أضيف لبعضها مواد مساعدة للوقاية من داء الليشمانية الجلدي في البرازيل وكولومبيا والإكوادور وفنزويلا وإيران. كما جرت محاولات أخرى في السودان للوقاية من داء الليشمانيات الحشوي.

استخدمت معظم التجارب في القارة الأمريكية خلاصة الليشمانية الأمازونية المقتولة بالحرارة الرطبة (ALA) *L.amazonesis*autoclavedlysate، أو خلاصة الليشمانية البرازيلية *L.braziliensis* أو خلاصة *L. guyanensis*. أما في العالم القديم فقد استخدمت التجارب *L.major*.

جرى اختبار 3 لقاحات وهي لقاح مايرنك Mayrink vaccine في البرازيل الذي يتكون من *L. guyanensis* المقتولة بمادة الميرتيولات merthiolate بدون استخدام أي مادة مساعدة عند المتبرعين الأصحاء وقد أدى إلى فعالية تقدر بـ 53%، ولقاح كونفيت Convit vaccine في فنزويلا الذي يتكون من *L. mexicana* المقتولة بالحرارة مع لقاح BCG كمادة مساعدة، ولقاح الليشمانية الكبرى المقتولة بالحرارة الرطبة (autoclaved leishmania major (ALM مع لقاح BCG كمادة مساعدة في معهد باستور في طهران الذي سمح بتحوّل 83% من الأشخاص سلبيي تفاعل الليشمانين الجلدي إلى إيجابيين. شجعت نتائج الاختبارات السابقة إمكانية استعمالها في المعالجة المناعية الكيميائية للمصابين بداء الليشمانية الجلدي حيث أصبحت معتمدة في فنزويلا والبرازيل[69]. هذا وقد بينت تجربة في السودان على مصابين بداء الليشمانيات الجلدي المستمر التالي للكلازار أن معدل الشفاء باستخدام المعالجة المناعية الكيميائية كان أعلى بشكل ملحوظ من المعدل المسجل عند استخدام المعالجة الكيميائية وحدها حيث تم استخدام

مزيج من الليشمانية الكبرى المقتولة بالحرارة الرطبة والمدمصة على هلامة هيدروكسيد الألمنيوم بالإضافة إلى لقاح BCG[70].

هذا وأدى استخدام لقاح *L. amazonensis* المقتولة بالحرارة الرطبة، مع IL-12 كمادة مساعدة، وهلامة هيدروكسيد الألمنيوم إلى تحريض استجابة مناعية واقية عند القرود ضد داء الليشمانيات الجلدي[71].

كما تم اختبار فعالية طفيليات الليشمانية المقتولة في الحماية ضد داءالليشمانيات الحشوي، حيث أظهرت دراسة أجريت في إيران أن التمنيع بمزيج من طفيليات الليشمانية الكبرى المقتولة بالحرارة الرطبة autoclaved *Leishmania major* ولقاح BCG وهلامة هيدروكسيد الألمنيوم يقدم حماية للكلاب ضد داء الليشمانيات الحشوي[72]. كما حرّض مزيج اللقاح المكون من *L.braziliensis* المقتولة بالحرارة، والسابونين saponine كمادة مساعدة، استجابة مناعة قوية لدى الكلاب ضد الإصابة بداء الليشمانيات الحشوي. وفي الهند تم حماية الهامستير ضد داء الليشمانيات الحشوي باستعمال مزيج من طفيليات الليشمانية الدونوفانية المقتولة بالحرارة الرطبة autoclaved *Leishmania donovani* (ALD) ولقاح BCG.

يعود الفشل الناجم عن استخدام الطفيليات المقتولة، كما أكد الباحث De Luca وآخرون، إلى تبدل في بنية معظم بروتينات طفيليات الليشمانية بالحرارة ممايؤدي بالنتيجة إلى نقص القدرة على تحريض مناعة immunogenicity ضد الطفيلي. وبالتالي حوّل الباحثين جهودهم باتجاه إيجاد لقاحات بديلة عن لقاحات الطفيليات المقتولة[73].

3-7 اللقاحات المحضرة من طفيليات حية مضعفة Live attenuated leishmania vaccines

أكدت التجارب إمكانية تضعيف طفيليات الليشمانية بطرق عديدة منها: أشعة غاما γ-irradiation، أو تقانة تكرار زرع الطفيلي، أو استخدام مواد كيميائية مولدة للطفرات chemical mutagenesis، أو تطفير جينات معينة. ويلخص الجدول 2 اللقاحات الحية المضعفة التي تم اختبارها ضد داء الليشمانيات.

الجدول2: اللقاحات الحية المضعفة التي تم اختبارها ضد داء الليشمانيات[74].

نوع طفيلي الليشمانية	البلد	العام	عملية التضعيف	الحيوان المستخدم
L. major L. tropica	إيران	1984	الزرع المتكرر في الزجاج	الفئران BALB/C و C57BL/6
L. major	Switzerland	1993	أشعة غاما	الفئران BALB/C و

CBA				
الفئران BALB/C	استخدام مواد كيميائية مولدة للطفرات	2005	إيران	*L. major*
الفئران BALB/C	الزرع المتكرر في الزجاج بوجود تراكيز عالية من الجنتاميسين	2003	المملكة المتحدة	*L. Mexicana* *L. major*
الفئران BALB/C والقردة	لا تملك الجين المرمز لـ Dihydrofolate reductase - thymidylate synthase	1995	أمريكا	*L. major*
الفئران BALB/C و C57BL/6 والهامستر	لا تملك جينات أنزيمات السيستئين بروتيناز (*cpa/cpb*)	1998	المملكة المتحدة	*L. mexicana*
الفئران BALB/C	حذف الجين المرمز للفوسفو غليكان السطحي(*lpg2*)	2003	البرازيل	*L. major*
الفئران BALB/C والهامستر	تعطيل ناقل البيوبتيرين biopterin transporter -1 (BT-1)	2002	كندا	*L. donovani*
الفئران BALB/C	حذف جين Silent information regulatory 2	2007	البرتغال	*L. infantum*

سمح إضعاف فوعة طفيليات الليشمانية الكبرى بواسطة أشعة غاما وحقنها في الفئران Balb/c أو الفئران CBA بتأمين حماية لهذه الفئران ضد الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى[75].

هذا ولم يؤد حقن *L. major* و*L.mexicana*، المضعفة بواسطة تكرار زرعها في الوسط الزرعي مع وجود تركيز عالي من الجينتاميسين يبلغ 20 مكغ/مل إلى ظهور إصابة لدى الفئران Balb/c حتى بعد حقنها بطفيليات الليشمانية ذات الفوعة[76].

سمحت تطور التقانات الجينية بتعديل جينات طفيليات الليشمانية وتحويل هذه الطفيليات إلى ذراري مضعفة جينياً لها القدرة على توليد استجابة مناعية مماثلة للاستجابة المناعية الناجمة عن الإصابة بطفيليات حية مفوعة بدون أن تسبب التظاهرات السريرية المترافقة للداء. هذا وقد سمح معرفة التسلسل الجينومي لطفيليات الليشمانية بإمكانية إزالة أو حجب

أو استبدال جينات معينة والحصول على طفيليات معدلة جيبنياً تعرف باسم knock-out parasites.

كانت ذراري *L. major* التي لا تملك الجين المرمز لأنزيم الـ Dihydro Folate Reductase Thymidylate Synthase DFRS أول الطفيليات المعدلة جينياً والمستخدمة كلقاح فقد أكدت دراسة على قدرة هذه الطفيليات المعدلة على تحريض استجابة مناعية من النمط Th1 عند الفئران BALB/C الملقحة وأكسبت الفئران حماية من الإصابة عند إعادة الإخماج[77]. وأكدت دراسة على عدم قدرة هذه الطفيليات في حماية القرود عند إعادة الإخماج[78].

يؤدي حذف الجين المرمز للفوسفو غليكان السطحي لدى *L. major* إلى الحصول على ذراري (lPg2) تستطيع البقاء أكثر من سنتين من دون أن يترافق وجود الطفيليات لدى الفئران BALB/C مع ظهور أية إصابات حتى في حال نقص مناعة هذه الفئران بالإضافة إلى تقديم الحماية لهذه الفئران ضد *L. major* ذات الفوعة الطبيعية مما يوحي بإمكانية استخدام هذه الطفيليات المطفرة كلقاح ضد داء الليشمانية[79]. وبالمقابل احتفظت *L.mexicana* التي لا تملك الجين المرمز للفوسفو غليكان السطحي *lpg2* بفوعتها وإمراضيتها للفئران الحساسة للإصابة بداء الليشمانية، مما أدى إلى البحث عن جينات أخرى مسؤولة عن ترميز بروتينات لها علاقة بفوعة وإمراضية *L.mexicana*. تمكن الباحثون من تحضير *L.mexicana* مطفرة (ΔCP) من خلال حذف الجينات المرمزة لأنزيمات cysteine protinase، حيث تمتلك هذه الطفيليات أنواع متعددة وفعالة من أنزيمات السيستئين بروتياز cystein proteinases التي تلعب دوراً هاماً في الإمراضية من خلال توجيه الاستجابة المناعية نحو استجابة Th2. وقد تم تحديد ثلاثة جينات مسؤولة عن ترميز هذه المجموعة من الأنزيمات وهي جين CPa وجين CPb وجين CPc. وبالتالي تم الحصول على الأنماط المطفرة لطفيليات الليشمانية المكسيكية *L.mexicana* حسب الجين المستهدف: طفيليات ΔCP عند حذف جين CPa وطفيليات ΔCPb عند حذف جين CPb وطفيليات ΔCPa/ΔCPb عند حذف جين CPa مع جين CPb. وقد أكدت دراسة أن إمراضية الطفيليات ΔCPa مماثلة لحد كبير لإمراضية الطفيليات الحية ذات الفوعة، وإن إمراضية الطفيليات ΔCPb أو الطفيليات ΔCPa/ΔCPb أقل من إمراضية الطفيليات الحية ذات الفوعة. وقد أدى حقن الفئران BALB/C بالطفيليات ΔCPb أو بالطفيليات ΔCPa/ΔCPb إلى ظهور

إصابات صغيرة وتحول كبير في الاستجابة المناعية من استجابة Th2 إلى استجابة Th1 عند هذه الفئران بالمقارنة مع الطفيليات ذات الفوعة الطبيعية، مما يشير إلى أهمية أنزيمات cysteine proteinases في فوعة وإمراضية الطفيلي وتعديل الاستجابة المناعة وبالتالي إمكانية الحصول على لقاح ضد هذه الطفيليات[80].

يعتبر الجين Silent information regulatory 2 ضرورياً لنمو وتطور الشكل اللاسوطي لمختلف أنواع طفيليات الليشمانية داخل الخلايا. أظهرت دراسة أن *L. infantum*، المعوزة لنسخة واحدة من جين Silent information regulatory 2 (LiSIR2)، تبقى حية لمدة ستة شهور بعد حقنها للفئران BALB/C. ففي حين لم يؤدي وجود هذه الطفيليات لدى تلك الفئران إلى ظهور أية إصابة لديها، فقد أدى وجود هذه الطفيليات إلى توليد مناعة فعالة عند الفئران حيث ترافق إعادة إخماج هذه الفئران بطفيليات الليشمانية الطفلية ذات الفوعة الطبيعية مع تحريض إنتاج كميات كبيرة من الانترفيرون غاما وكميات قليلة من الانترلوكين 10. مما سمح بأن يكون هذا اللقاح مؤهلاً ليكون لقاحاً فعالاً ضد داء الليشمانية الحشوية الكلبية[81].

بما أن البيوبتيرينات ضرورية لنمو الأنواع المختلفة لطفيليات الليشمانية، فقد تم تحضير *L. donovani* المطفرة بتعطيل ناقل البيوبتيرين biopterin transporter – 1 (BT1). أدى حقن الفئران BALB/C والهامستر بهذه الطفيليات المطفرة السابقة إلى تحريض استجابة مناعية من نمط Th1 [82].

كما يمكن الجوء إلى طرق أخرى للحصول على أنواع أخرى من هذه اللقاحات وذلك بإدخال جينات قاتلة suicidal cassette إلى جينات الليشمانية فتصبح هذه الطفيليات حساسة لمواد سامة تقوم بقتل الطفيلي عند تعرضها لهذه المواد في الوسط الخارجي. حيث تم مثلاً تحضير ذراري من *L.major* تملك جين أنزيم thymidine kinase المأخوذ من فيروس الحلأ HSV-1 الذي يجعل الطفيليات حساسة لدواء ganciclovir، أو جين لأنزيم saccharomyce cerevisae cytosine deaminase الذي يجعلها حساسة لدواء ٥- فلوروسيتوزين 5-fluorocytosin. وأدى حقن الفئران BALB/C بالطفيليات الطافرة السابقة إلى ظهور إصابات شديدة تسمح معالجتها بهذين الدوائين أو بأحدهما بشفاء الإصابات خلال أسبوعين من المعالجة وبالتالي تصبح هذه الفئران المعالجة مقاومة لمدة ٤ أشهر على الأقل ضد الإصابة مرة أخرى بطفيليات الليشمانية الكبرى ذات الفوعة الطبيعية[83].

تمتاز اللقاحات المضعفة جينياً بمزايا تجعلها أكثر جاذبية من الأنواع الأخرى للقاحات ويعود ذلك لأسباب عديدة منها:

1- تحافظ هذه اللقاحات على معظم مستضدات الطفيلي.

2- تؤمن هذه اللقاحات تقديم مستضدات طفيليات الليشمانية بشكل مستمر نتيجة بقائها لفترة طويلة في الأنسجة وبالتالي يحرض مناعة تدوم لفترة طويلة.

3- تحافظ هذه اللقاحات على فوعتها المضعفة عند حقنها في حيوانات التجربة[84].

4-7 التلقيح باستخدام فيروسات أو جراثيم مأشوبة كحوامل ناقلة vaccines recombinant viruses and bacteria as delivery vehicles:

تم استخدام جراثيم أو فيروسات حية مأشوبة للتعبير عن مستضدات معينة لطفيليات الليشمانية. وتعمل الفيروسات أو الجراثيم في هذه اللقاحات كحوامل للتعبير عن المستضدات الطفيلية بالإضافة إلى عملها كعوامل مساعدة في تحريض المناعة، ونذكر من أهم الجراثيم والفيروسات المستخدمة:

1- جراثيم السالمونيلا تيفيموريوم الطافرة salmonella thypymurium mutant بإدخال جين أنزيم البروتياز السطحي gp63 لـ *L.major*. استخدمت فيها هذه الجراثيم الطافرة والتي أدت إلى حماية الفئران BALB/C من الليشمانية الجلدية الناتجة عن الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى[85].

2- جراثيم BCG مطفرة بإدخال جين أنزيم البروتياز السطحي gp63 لليشمانية الكبرى وقد استخدمت دراسة هذه الجراثيم الطافرة والتي أدت إلى حماية الفئران BALB/C من الليشمانية الجلدية الناتجة عن الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى[86].

3- جراثيم BCG المأشوبة بإدخال جين مستضد LCR1 لـ *L.chagasi*. المستضد LCR1 المشتق من طفيليات الليشمانية الشاغاسية هو بروتين يحوي تتاليات من الحموض الأمينية تشبه التتاليات الموجودة في عديدات الببتيد السوطية الخاصة بالمثقبية الكروزية Trypanosoma cruzi. وأدى استخدام الجراثيم السابقة كلقاح في دراسة إلى حماية الفئران BALB/C من الإصابة بـ *L.chagasi*[87].

4- طفيليات المقوسات الغوندية المضعفة attenuated *toxoplasma gondii* المأشوبة بإدخال جين مستضد البروتين السوطي kinetoplastid membrane

protein KMP-11 إليها. سمح هذا اللقاح بحماية الفئران BALB/C من الإصابة بالليشمانية الجلدية التي تسببها طفيليات الليشمانية الكبرى[88].

5- فيروس جدري البقر *vaccinia* الطافر بإدخال الجين الذي يعبر عن البروتين السكري السطحي GP46/M2 للأشكال المشيقية *L.amazonesis*. أكدت دراسة قدرة هذا الفيروس الطافر من حماية الفئران BALB/C من الإصابة بالليشمانية الأمازونية[89].

6- فيروس جدري البقر الطافربإدخال الجين الذي يعبر عن المستضد LACKالخاص بـ *L. infatum* المشابه لمستقبلات أنزيم كيناز C المفعلة لخلايا الثدييات activated mammalian c kinase. أدى هذا اللقاح إلى وقاية الفئران BALB/C الملقحة به من الإصابة بـ *L. major*[90] . وتمكن هذا الفيروس الطافر من حماية الكلاب من الليشمانية الطفلية[91].

5-7 التلقيح باستخدام مستضدات منقاة من طفيليات الليشمانية purified leishmania antigens

تعتمد هذه اللقاحات على استخدام أجزاء منقاة من الطفيلي مثل البروتينات أو الليبوفوسفوغليكان. تعتبر ربيطة فوكوز مانوز Fucose mannose ligand (FML) مثالاً عن هذه المستضدات وهي عبارة عن معقد بروتيني سكري موجود على سطح طفيليات الليشمانية، تم تنقيته وعزله من *L. donovani*. واستخدم المستضد FML مع السابونين كمادة مساعدة في تحضير لقاح يعرف باسم leishmune® ضد الليشمانية الحشوية الكلبية واجتاز هذا اللقاح تجارب الأطوار الأولى وأصبح لقاحاً معتمداً في البرازيل وهو فعال لدى 93-97% من الكلاب الملقحة وتدوم فعالية اللقاح لأكثر من 3.5 سنة ويؤمن حماية ضد الكلازار الكلبية[92].

كما سمح البروتين المستخلص من السائل الطافي للوسط الزرعي لطفيليات الليشمانية الطفلية *L. infantum*Leishmania infantum excreted-secreted antigen purified (LiESAp) مع العامل المساعد muramyl dipeptid (MDP) بتحريض استجابة مناعية من نمط Th1 ترافق بإنتاج كميات كبيرة من الانترفيرون غاما واستجابة مناعية خلطية مترافقة بإفراز أضداد IGg2 عند الكلاب الملقحة حتى بعد إعادة الإخماج بطفيليات الليشمانية الطفلية ذات الفوعة الطبيعية [93].

كذلك تفرز هذه الطفيليات في الوسط الزرعي البروتين Ric-1 الذي يتجاوز وزنه الجزيئي 75 كيلو دالتون والبروتين Ric-2 الذي يقل وزنه الجزيئي 37 كيلو دالتون. وقد سمح حقن الفئران BALB/C بهذين البروتينين بتوليد مناعة جزئية ضد الليشمانية الحشوية الناجمة عن *L. infantum*[94].

6-7 التلقيح باستخدام مستضدات مأشوبة Recombinant antigens:

تم اختبار إمكانية استخدام عدد من المستضدات كلقاح ضد الليشمانية الجلدية والحشوية. تشمل هذه المستضدات: البروتين السكري gp63، والبروتين السكري السطحي gp46، والسيستئين بروتيناز cysteine proteases A (CPA)، والسيستئين بروتيناز cysteine protease B(CPB)،والبروتين LD1 والبروتين LCR1 والبروتين Q والبروتين Leishmania homolog of receptors for activated C"LACK" kinase، والبروتين السطحي B1 المؤستل والمميه hydrophilic acylated surface protein B1 (HaspB1)، والهيستون H1، والبروتين النوعي المضاد لأكسدة التيول thiol-specific antioxidant (TSA)، وبروتين ال stress-inducible protein-1 (LmSTI1)، وعامل بدء التطاول في اصطناع بروتينات الليشمانية elongation and initiation factor (LeIF)[94].

يبلغ الوزنه الجزيئي للمستضد البروتيني السكري gp63 حوالي 63 كيلو دالتون. يوجد المستضد السابق على سطح المشيقات والليشمانيات لجميع أنواع طفيليات الليشمانية[95]. يتمتع هذا البروتين بفعالية أنزيمية وبينت دراسات عديدة دوره في آلية دخول مشيقات طفيليات الليشمانية إلى البالعات الكبيرة، بعد دخولها إلى جسم المضيف. وكما يساهم هذا المستضد في التهرب من آلية الانحلال التي تتوسطها بروتينات المتممة حيث يقوم بتحويل المكون C3b، بعد أن يرتبط بالطفيلي، إلى iC3b الذي يرتبط بدوره مع المستقبل 3 للمتممة complement receptor3 (CR3) الموجود على سطح البالعات الكبيرة. ونظراً لأهمية هذا المستضد ودوره في فوعة وإخماجية طفيليات الليشمانية فقد كان من أكثر المستضدات التي استخدمت ودرست في تجارب اللقاحات التجريبية المضادة لليشمانية الجلدية والحشوية. أدى تمنيع القرود بالمستضد GP63 المأشوب، مع BCG كعامل مساعد، إلى توليد مناعة جزئية لديها. وأظهرت دراسة أن تلقيح الفئران BALB/c بالمستضد GP63 المأشوب، مع CpG-ODN كعامل مساعد، بشكل جسيمات شحمية كاتيونية (Lip-rgp63-CpG ODN) يؤدي إلى زيادة الاستجابة المناعية وتأمين حماية

للفئران الممنعة ضد *L. major* وترافقت هذه الحماية مع مستويات عالية من IFN-γ ومستويات منخفضة من IL-4 وزيادة في نسبة الأضداد[96] IgG2a/IgG1. وقد بينت إحدى الدراسات المحلية أن تمنيع الفئران BALB/c بمزيج من المستضدين 43 و63 كيلودالتون بالمشاركة مع العامل المساعد فروند الناقص يؤدي إلى تحفيز استجابة من النمط Th1[136].

أكدت العديد من الدراسات أيضاً قدرة المستضد GP46 على تحفيز استجابة مناعية وقائية عند الفئران. فقد أدى تلقيح الفئران CBA بالجزيء GP46/M2 المستخلص من طفيليات الليشمانية الأمازونية وبوجود *C. parvum* كعامل مساعد، ثم إخماجها بالنوع ذاته من الليشمانية إلى الكشف بأن الفئران CBA أصبحت مقاومة بشكل كامل للخمج. بينما أدى تطبيق ما سبق على الفئران BALB/c إلى اكتساب هذه الفئران مناعة جزئية، ترافقت مع تناقص أعداد الطفيليات في الآفات الجلدية وزيادة في نسبة الأضداد[97] IgG2a/IGg1. كذلك سمح حقن الفئران BALB/C فيروس جدري البقر المخفف الطافر Vaccinia virus المستخدم هنا كناقل حي للبروتين GP46/M2، بتحفيز مناعة واضحة عند هذه الفئران الممنعة تجاه الإصابة بطفيليات الليشمانية الأمازونية[98].

يتوضع المستضد LACK في سيتوبلاسما طفيليات الليشمانية كما يرتبط بالكينتوبلاست والغشاء البلازمي، ويوجد على سطح المشيقات والليشمانيات لأنواع مختلفة من الليشمانية. أكدت قدرة البروتين LACK المأشوب على تحفيز استجابة مناعية، بتمنيع الفئران BALB/c بهذاالمستضد، إلى الحصول على استجابة مناعية وقائية واضحة تجاه الإصابة بـ *L.amazonensis*[99].

يوجد المستضد السطحي للطفيلي PSA-2 على سطح المشيقات والليشمانات لجميع أنواع طفيليات الليشمانية باستثناء *L. braziliensis*. يعتبر هذا البروتين بروتين غشائي وبروتين مفرز وذلك لأنه يتألف من عائلة تتكون من ثلاثة عديدات ببتيد تتثبت على الغشاء البلاسمي للشكل المشيقي بوساطة glycosylphosphatidylinositol (GPI)، وفي حال عدم توفر GPI يقوم الطفيلي بإفرازه إلى الوسط خارج الطفيلي. سمح حقن المستضد المأشوب PSA-2 لـ *L. major*، المأشوب مع الجراثيم الوتدية الغدية Corynebacterium parvum كعامل مساعد، داخل بيرتوان الفئران C3H/He إلى جعل الفئران مقاومة للإصابة بداء الليشمانية الجلدية[100].

تتألف بنية المستضد LCR1 المشتق من *L. donovani* من تتاليات من الحموض الأمينية تشبه التتاليات الموجودة في بنية عديدات الببتيد السوطية الخاصة بالمثقبية

الكروزية *Trypanosoma cruzi*.أدى حقن هذا المستضد للفئران BALB/C بتحريض مناعة جزئية ضد الإصابة بطفيليات الليشمانية الدونوفانية. كما أظهرت دراسة أن مشاركة البروتين LCR1 مع لقاح BCG يقدم حماية للفئران BALB/C ضد الليشمانية الحشوية التي تسببها [101] *L. infantum*.

بينت دراسة قدرة البروتين HaspB1 على توليد المناعة وتأمين حماية للفئران BALB/C ضد الإصابة بالليشمانية الدونوفانية[102].

البروتين السطحي A2 المعروف أيضاً بـ P2، بروتين مميزوخاص بالشكل الليشماني لمعقد *L. donovani*. يعتبر هذا المستضد من عوامل الفوعة بالنسبة للطفيلي لأنه يستطيع تعديل الاستجابة المناعية للمضيف، مما قاد إلى استخدمه في تحضير لقاحات تجاه داء الليشمانية. فقد أكدت دراسة قدرة البروتين A2 المأشوب، مع الانترلوكين 12 كعامل مساعد، حماية الفئران BALB/C من الإصابة بداء الليشمانية الحشوية الناجمة عن الليشمانية الدونوفانية[103].

بينت دراسة قدرة الهيستون H1 بالمشاركة مع العامل المساعد Montanide ISA 721،حماية القرود من الإصابة بالليشمانية الجلدية التي تسببها الليشمانية الكبرى[104].

كما استخدم مستضداً آخر وهو البروتين Q الذي تم تصنيعه عن طريق الاندماج الجيني لأربعة قطع من جينات أربعة بروتينات سيتوبلاسمية، البروتين Lip2a والبروتين Lip2b والبروتين P0 والهيستون H2A، لطفيليات الليشمانية الطفلية. فقد أدى حقن البروتين Q مع العامل المساعد BCG، إلى حماية الكلاب الملقحة به من الإصابة بالليشمانية الحشوية الناجمة عن الليشمانية الطفلية[105].

كما سمح استخدام لقاح مكون من مزيج من المستضدين CPb وCPa مع مزيج العاملين المساعدين Montanide 720 وCpG-ODN بتحريض استجابة مناعية من نمط Th1 وبالتالي حماية الفئران BALB/C من الإصابة بطفيليات الليشمانية الطفلية[106].

كما تمكن لقاح مكون منالمستضدين البروتين TSA وبروتين ال LmSTI1، وكل من الانترلوكين 12 وهلامة هيدروكسيد الألمنيوم كعاملين مساعدين من تأمين حماية قوية للفئران BALB/C والقرود ضد طفيليات الليشمانية الكبرى المسببة لداء الليشمانية الجلدية.

كما تمكن اللقاح Leish-111f المكون من مجموعة من البروتينات المأشوبة من حماية الفئران من الإصابة بالليشمانية الجلدية والحشوية. يحتوي البروتين TSA ل *L. major*،

وبروتين ال LmSTI1 لطفيليات الليشمانية الكبرى، وبروتين LeIF لـ *L. braziliensis* وذلك في صيغة واحدة مع العامل المساعد MPL-SE وهو مكون من لبيد أحادي الفوسفوريل monophosphoryl lipid MPL والسكوالين squalene. لكن اللقاح السابق لم يستطع حماية الكلاب الملقحة به من الإصابة في تجارب الطور III[107].

كما تم تنقية المستضد NH36 الذي يعتبر مستضداً رئيسياً من معقد ربيطة فركتوز- مانوز FML لدى الأشكال المشيقية لطفيليات الليشمانية الدونوفانية. سمح استخدام NH36 بالمشاركة مع سابونين Quill A كعامل مساعد، بحماية الفئران BALB/C من الإصابة بالليشمانية الشاغاسية[108].

7-7 لقاحات الـ DNA

جرب فريق من العلماء أسلوباً جديداًلإيجاد لقاح ضد داء الليشمانيات يعتمد على استخدام بلاسميد من الدنا DNA يحتوي على الجين المرمز لمستضد معين ويحقن عادة في العضل وتقوم الخلايا الموجودة في هذا الموقع بأخذ البلاسميد المحقون والتعبير عن المستضد الذي يرمزه. تلتقط الخلايا التغصنية المستضدات المفرزة من خلايا العضلات إلى الفراغات بين الخلوية للعضلة[109]. ترتبط تسلسلات الـ CpG غير الممتيلة الخاص بالبكتريا المستخدمة كناقل non-methylated CpG sequences of bacteria بالمستقبل TLR-9 الموجود على سطح الخلايا التغصنية ويحرض اصطناع الانترلوكينين 12و18 واللذان يحفزان الخلايا التائية الساذجة على التمايز إلى Th1 والتي تولد بدورها مناعة متواسطة بالخلايا، وتحفز الخلايا T السامة،وتحرض كذلك الخلايا البائية B cells على اصطناع أصناف محددة من الأضداد مثل IgG2 في الفئران، ويلعب مجموع الخلايا السابقة بأكملها دوراً هاماً في توفير الحماية ضد الإصابة بطفيليات الليشمانية طبيعية الفوعة.

تتميز لقاحات الـ DNA بخصائص متعددة تجعلها متميزة عن بقية اللقاحات وهي:

١- آمنة.
٢- سهلة التصنيع ورخيصة الثمن.
٣- ثابتة بمختلف درجات الحرارة مما يجعل عملية النقل والتخزين سهلة ورخيصة.
٤- يمكن تجميع جينات متعددة تعبر عن عدة مستضدات وبالتالي تشكيل مناعة ضد معظم أنواع الليشمانية.
٥- تحرض استجابة مناعية خلوية من النمط Th1.

لكن وبالرغم من ميزاتها الآنفة الذكر فإن لقاحات الـ DNA لم تصل حتى اليوم إلى مرحلة تجارب الطور III. هذا ويمكن استخدام عدد من البلاسميدات الحاوية على المستضدات،تشمل هذه المستضدات كل من LMSTI1 وTSA وLeif وLACK وKMP-11 وCPb وCPa وH1 وNH36، لقاحات واعدة خلال السنوات القليلة القادمة.

سمح استخدام لقاح DNA المكون من مزيج بلاسميدات كل من TSA وLmSTI1 و LACK بتأمين حماية للفئران C57BL/6 المقاومة للإصابة والفئران BALB/c الحساسة للإصابة من الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى[110].

وأكدت دراسة أخرى أن لقاح الـ DNA المكون من مزيج بلاسميدات CPa+CPb حرض استجابة مناعية من نمط Th1 عند الفئران BALB/C ترافقت مع إنتاج خلايا طحال هذه الفئران لكميات كبيرة من INF-γ وبالتالي حمايتها من الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى. وهذا لم يسمح استخدام كل من بلاسميد على حدة بتحقيق ما سبق[111].

وقد سمح حقن الفئران BALB/c بلقاح الـ DNA للبروتين الريبوزومي الحمضي لطفيليات الليشمانية الطفلية *L. infantum* acidic ribosomal protein P0 LiP0، بحمايتها من الإصابة بالليشمانية الكبرى[112].

أدى حقن الفئران BALB/c بلقاح مكون من بلاسميد يحوي GP46 DNA أو بلاسميد يحوي DNAGP63 أو بلاسميد يحوي DNA CPB بتوليد مناعة جزئية ضد طفيليات الليشمانية المكسيكية. بينما سمح حقن الفئران السابقة بلقاح DNA مكون من مزيج من البلاسميدات المرمزة للجينات السابقة إلى زيادة الاستجابة المناعية وتأمين حماية ضد الإصابة بالليشمانية المكسيكية[113].

سمح لقاح دناDNA مكون من مزيج بلاسميدات الهيستونات الأربع، H2A وH4 وH3 وH2B، بحماية الفئران BALB/C من الإصابة بالليشمانية الكبرى[114].

لم يستطع لقاح الـ DNA المكون من مزيج بلاسميدات، تحوي جينةKMP-11 وجينة TRYPوجينة LACK وجينة gp63، من تأمين حماية للكلاب من الإصابة بالليشمانية الطفلية.

وقد أدى استخدام لقاح دنا DNA لجينة المستضد A2 إلى حماية الفئران من الإصابة بالليشمانية الدونوفانية [115]. وقد أدى استخدام لقاح دنا DNA يحوي جينة المستضد KMP-11 إلى حماية الهامستر من الإصابة بالليشمانية الدونوفانية[116].

8-7 لقاحات تعتمد على المستضدات الموجودة في لعاب ذبابة الرمل vaccines based on sand fly salivary antigens:

أكدت الدراسات أن بروتينات لعاب ذبابة الرمل تلعب دوراً هاماً في تطور الإصابة بداء الليشمانية وذلك لأنها:

1-تزيد من سرعة تجمع البالعات في مكان اللدغة وتثبط الخلايا المقدمة للمستضد.

2- تثبط تشكل أكسيد النتريك في البالعات.

3- تمنع تكاثر اللمفاويات التائية[117].

في الحقيقة يظهر الأشخاص الذين تعرضوا للدغة ذبابة الرمل استجابة مناعية خلوية و/أو خلطية قوية تجاه بروتينات لعاب الذبابة، مما قاد إلى العمل على تطوير لقاحات ضد البروتينات الموجودة في لعاب ذبابة الرمل أو ضد مستضدات في بلعوم الحشرة وذلك بهدف تخفيف حدة المرض وإنقاص قدرة الطفيلي على التكاثر. أدى تمنيع الفئران بلعاب غدة ذبابة *papatasi*salivary gland homogenate(SGH)، أو التعرض للدغة ذبابة الرمل غير حاملة للشكل المعدي لطفيليات الليشمانية، إلى مقاومة الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى. كما سمح حقن الفئران بكل من بروتين *Maxadilan*، وهو ببتيد موسع للأوعية الدموية تم الحصول عليه من النوع *Lu. longipalpis*، والبروتين SP15 الذي تم الحصول عليه من النوع *Ph. Papatasi* لم تعرف وظيفته بعد، إلى جعل هذه الفئران مقاومة للإصابة بالليشمانية الكبرى[118].

كما أدى حقن الهامستير بـالبروتين LJM19 الذي تم الحصول عليه من النوع *Lu. longipalpis* إلى ارتفاع نسبة IFN-γ/TGF-β في الطحال والكبد، لمدة تزيد عن خمسة شهور، وبالتالي توفير حماية ضد الإصابة بالليشمانية الطفلية والليشمانية الشاغاسية[119].

الدراسة العملية

1- مبرر البحث: تعد سورية من المناطق الموبوءة بداء الليشمانية الجلدية. إذ لاحظنا في السنوات الأخيرة تزايد عدد الإصابات الجلدية بشكل كبير في جميع المحافظات السورية مما يشكل مشكلة صحية هامة تستدعي وضع خطة منظمة للقضاء على هذا المرض من خلال مكافحة الحشرة الناقلة والسيطرة على مخازن الطفيلي. يتطلب تحقيق الخطة السابقة صرف مبالغ كبيرة تثقل كاهل ميزانية الدولة، تضاف إلى تكاليف العلاج الباهظة جداً التي تدفعها وزارة الصحة سنوياً. ونظراً لعدم وجود دواء نوعي فعّال وآمن، تكتسب الوقاية من الإصابة بهذا الداء أهمية كبيرة ويلعب فيها وجود لقاح فعال ما زال غير متوفر حتى الآن دوراً كبيراً.

2- هدف البحث: تهدف دراستنا إلى المساهمة في المحاولات الهادفة للوصول إلى لقاح فعال، وقررنا في سبيل ذلك استقصاء إمكانية استخدام طفيليات حية مثبطة الانقسام. استخدمنا الميتوميسين mitomycin-c، الذي يثبط تضاعف DNA الأشكال المتحركة لطفيليات الليشمانية، لتثبيط انقسام سلالة الليشمانية المدارية المأخوذة من بلدنا. وتحرينا قدرة هذه الطفيليات المثبطة على توليد المناعة من خلال القيام بما يلي:

١- دراسة ومقارنة الأذيات الجلدية المحدثة نتيجة تمنيع الفئران BALB/C بواسطة الطفيليات المثبطة بالميتوميسين، والطفيليات المقتولة بالحرارة، والطفيليات ذات الفوعة.

٢ - دراسة ومقارنة حمل الطفيلي في الأذيات الجلدية والعقد اللمفية النازحة عند الفئران BALB/C.

٣- دراسة وتنميط التجمعات الخلوية في العقد اللمفية النازحة خلال العدوى المحدثة لدى الفئران BALB/C.

٤- دراسة التعبير الجيني عن السيتوكينات في العقد اللمفية النازحة للفئران BALB/C.

3- المواد والطرائق materials and methods

تمت هذه الدراسة بالتعاون بين كلية الصيدلة وكلية العلوم والهيئة العامة للتقانة الحيوية وهيئة الطاقة الذرية بدمشق.

1-3 طفيليات الليشمانية

تم استخدام ذراري strain من المشيقات لطفيليات الليشمانية المدارية *L.tropica* المأخوذة من كلية العلوم بجامعة دمشق.

1-1-3 الاستنبات على الوسط السائل وحيد الطور RPMI – 1640

تم شراء الوسط السائل RPMI-1640 من شركة sigma على شكل فلاكونات جاهزة سعة كل منها 500 مل. يتم قبل استعمال الوسط مباشرة تعطيل متممة مصل جنينالعجل،وذلك بتسخين مصل جنين العجل في حمام مائي بدرجة حرارة 56°م لمدة 30 دقيقة، ومن ثم إضافته بنسبة 10%. عقم الوسط بعد ذلك باستخدام مرشحة قياس 0.22 ميكرون من شركة سارتوريوس تحت خيمة عقيمة. نوزع الوسط المعقم في فلاسكات سعة 250 مل بمعدل 5 ميلي ليتر في كل منها. سوف نستخدم تعبير وسط RPMI-1640الكامل للدلالة على الوسط السابق بكامل مكوناته.

يتم زرع مليون طفيلي/مل منوسط RPMI-1640 الكامل. وتتم مراقبة الطفيليات لمراقبة التغيرات التي تطرأ عليها من حيث الشكل والحركة والعدد بواسطة المجهر المقلوب بقوة تكبير 40X.

2-3 تحديد جرعة الميتوميسين –C المثبطة لتضاعف المشيقات

1- تحضير محلول mitomycin-c الأم: سمح حل 1 ملغ من mitomycin-c (sigma) في 1 مل من الإيتانول المطلق 95%، بالحصول على محلول بتركيز 1000 مكغ/مل.

2- يوضع 1 مل وسط RPMI 1640 الكامل الحاوي على 10^4 من المشيقات المأخوذة من الطور اللوغاريتمي في كل بئر من آبار صفائح الزرع المشتراة من شركة cell star.

3- تمت معالجة المشيقات بتراكيز متزايدة من mitomycin-c شملت 0 و2.5و5 و7.5 و10و12.5و15و25 مكغ/مل وذلك بإضافة الحجوم التالية من محلول الميتوميسين الأم 0 و2.5 و5 و7.5 و10و12.5و15و25 مكل من المحلول 1000 مكغ/مل.

4- حضنت الآبار السابقة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 26°م ثم تم تحديد عدد الطفيليات باستخدام عدادة نيوباور.

5- تم تحديد أقل تركيز قادر على تثبيطتكاثر الطفيليات خلال 24 ساعة دون أن تقتلها.

3-3 تحضير اللقاح

1- طفيليات الليشمانية المدارية المفوعة:نأخذ 10^4 من المشيقات المزروعة في وسط RPMI الكامل ثم نقوم بتثفيلها بسرعة 2400 دورة/الدقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم نتخلص من السائل الطافي ونضيف 1 مل من المصل الفيزيولوجي ونثفل مرة أخرى ونتخلص من السائل الطافي تكرر هذه العملية ثلاث مرات ثم يعاد تعليق الطفيليات مرة أخرى بالمصل الفيزيولوجي ليصبح الحجم النهائي 100مكل.

2 - طفيليات الليشمانية المثبطة بالميتوميسسن- c: تم حضن 10^4من المشيقات في مل من وسط RPMI الكامل الحاوي على الميتوميسين – C بتركيز 12.7 مكغ/مل لمدة 24 ساعة، ثم ثفلت بسرعة 2400 دورة/الدقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم نتخلص من السائل الطافي وأضفنا1 مل من المصل الفيزيولوجي وثفلنا مرة أخرى وتخلصنا من السائل الطافي وكررنا هذه العملية ثلاث مرات ثم قمنابتعليق الطفيليات مرة أخرى بالمصل الفيزيولوجي ليصبح الحجم النهائي 100مكل.

3- طفيليات الليشمانية المقتولة بالحرارة Heat-killed leishmania: نأخذ 10^4 من المشيقات المزروعة في وسط RPMI الكامل ثم نقوم بتثفيلها بسرعة 2400 دورة/الدقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم نرمي السائل الطافي. نضيف 1 مل من المصل الفيزيولوجي ونثفل مرة أخرى ونرمي السائل الطافي ونكرر هذه العملية ثلاث مرات ثم نعيد تعليق الطفيليات مرة أخرى بالمصل الفيزيولوجي بحجم 1مل. ونقوم بعد ذلك بقتل الطفيليات بوضعها بالصاد الموصد autoclave بدرجة حرارة 121 ولمدة 20 دقيقة، ثم نعيد تعليق الطفيليات مرة أخرى بالمصل الفيزيولوجي ليصبح الحجم النهائي 100مكل.

4-3 الفئران المستخدمة

استخدمنا في هذه الدراسة إناث فئران BALB/C الحساسة للإصابة بالليشمانية، تراوحت أعمار هذه الفئران بين6-8 أسابيع. قسمت الفئران إلى أربعة مجموعات مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المفوعة وتضم 45 فأرة، ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وتضم 45 فأرة، ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وتضم 45 فأرة، وتضم المجموعة الرابعة الشاهدة ثلاثة فئران.

5-3 حقن الفئران

تم حقن الفئران في أسفل القدم اليمنى تحت الجلد بواسطة محقنة 1 مل.

1-المجموعة الأولى: حقنت كل فأرة من هذه الفئران بـ 100 مكل من المصل الفيزيولوجي الحاوي على 10^4 منالمشيقات ذات الفوعة.

2-المجموعة الثانية: حقنت كل فأرة من هذه الفئران بـ 100 مكل من المصل الفيزيولوجي الحاوي على 10^4 من المشيقات المثبطة بالميتوميسين.

3- المجموعة الثالثة: حقنت كل فأرة من هذه الفئران بـ 100 مكل من المصل الفيزيولوجي الحاوي على 10^4 من المشيقات المقتولة بالحرارة.

4- المجموعة الرابعة الشاهدة control: حقنت كل فأرة من هذه الفئران بـ 100 مكل من المصل الفيزيولوجي.

تم إجراء اختبار التحدي challenge بعد مرور أربعة أسابيع على تمنيع الفئران باللقاحات السابقة وذلك بحقن 10^6 من مشيقات الليشمانية المدارية الحية في نفس مكان حقن اللقاحات واعتبر يوم إجراء التحدي هو بداية زمن دراستنا ورمزنا له بالأسبوع 0 أو W0 وتم إجراء الاختبارات المطلوبة ومراقبة تطور الإصابة في الأسبوع 0أو "W0"، وبعد 2 أسبوع "W2" على التحدي وبعد 4 أسابيع "W4" على التحدي وبعد 6 أسابيع "W6" على التحدي، وبعد 8 أسابيع "W8" على التحدي.

6-3 استخلاص العقد اللمفية من الفئران:

تمت إزالة العقدة اللمفية النازحة في الأسبوع 0"W0"،وبعد 2 أسبوع "W2" على التحدي و4 أسابيع "W4" على التحدي و6أسابيع "W6" على التحدي و8 أسابيع "W8" على التحدي من فئران المجموعات المدروسة. وفقاً للإجراءات التالية:

1- تم التضحية في الزمن المحدد بثلاثة فئران من كل مجموعة ومن ثم قلبها على ظهرها على سطح فليني جاف ونظيف.

2 - يتم تعقيم بطن الفأرة بالإيتانول 70% منعاً للتلوث.

3 - يقص جلد البطن بشكل طولي بواسطة مقص التشريح.

4 - يباعد الجلد المقصوص بواسطة الملقط باتجاه الجوانب، ثم يقص الجلد على مسار الساق اليمنى للفأرة.

5 - يتم التعرف على العقدة اللمفية النازحة القريبة من مكان الآفةفي ساق الفأرة،حيث تكون كروية الشكل، وكريمية اللون، وموجودة ضمن نسيجٍ شحمي (الشكل 8).

6- يتم استئصال العقدة القريبة من مكان الحقن بواسطة ملقط نظيف وتوضع عقدة كل فأرة في أنبوب أبندروف سعة 2 مل تحتوي على1 مل وقاء فوسفاتي PBS مع 2% من مصل العجل الجنيني. وتم ترقيم الأنابيب وفقاً للمجموعات المدروسة وللأسبوع الذي أخذت فيه العينة W0 أو W2 أو W4 أو W6 أو W8. مع الأخذ بعين الاعتبار وضع الأنابيب الحاوية على العقد في البراد بدرجة حرارة +8 مئوية ريثما يتم الانتهاء من استئصال العقد اللمفية من كل الفئران.

الشكل 8:مكان العقد اللمفية النازحة في الفأرة.

7-3 متابعة تطور الإصابة

اعتمدنا قياس مقدار التورم في قدم الفئران الممنعة باللقاحات السابقة لمتابعة تطور الإصابة في المجموعات المدروسة. حيث قمنا بقياس ثخانة قدمي كل فأرة، القدم الممنعة باللقاح والقدم الأخرى الشاهدة غير الممنعة، بواسطة المسماك caliper وحساب الفرق بين ثخانتي القدم الممنعة بالطفيليات والقدم الأخرى لكل فأرة من فئران كل مجموعة. أخذنا وسطي هذا الفرق ل 3 فئران. تم تكرار عملية القياس كل أسبوعين بدءاً من الأسبوع 0 الذي حقنا فيه التحدي ولمدة 8 أسابيع.

تم التعبير عن النتيجة بحساب وسطي الفوارق في الثخانة بين قدمي الفأر الممنعة من كل مجموعة. ثم عالجنا البيانات بواسطة برنامج Microsoft excel ورسمنا الخط البياني لتطور الإصابة في المجموعات المدروسة.

8-3 تحديد حمل الطفيلي في الإصابات الجلدية والعقد اللمفية النازحة

اعتمدت طريقة limiting dilution assay لتحديد حمل الطفيلي في الإصابات الجلدية والعقد اللمفية النازحة المعزولة من فئران المجموعات المدروسة في الأسبوع 0"W0"، وبعد مرور2 أسبوع "W2" على التحدي، و4 أسابيع "W4" على التحدي، و6 أسابيع "W6" على التحدي، و8 أسابيع "W8" على التحدي، وفقاً للخطوات التالية:

١) تم التضحية بثلاث فئران من كل مجموعة وعزلت الإصابة الجلدية من أسفل القدم اليمنى الممنعة للفئران الملقحة، حيث طهرت القدم بالإيتانول 70%ثم تم قص جلد أسفل القدم مع أخذ الطبقة السفلية للجلد بواسطة مشرط عقيم، وكذلك تم أخذ العقد اللمفية النازحة القريبة من منطقة الإصابة بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة 2-6.

٢) تم وضع العقدة اللمفية والإصابة الجلدية كل واحدة على حدة في علب بتري عقيمة تحوي على 500 مكل من الوسط RPMI-1640 الكامل وكتب عليها رقم المجموعات المدروسة وتاريخ أخذ العينة.

٣) تم تقطيع الأنسجة المأخوذة العقد والإصابات إلى قطع صغيرة بواسطة مشرط. تهرس الأنسجة السابقة باستعمال مكبس سيرنغ مطاطي لتفريق الخلايا عن بعضها، ثم نسحب المعلق الناتج وندفعه بواسطة الميكروبيبيت عدة مرات لتأمين المزج والتجانس فنحصل على معلق خلوي متجانس.

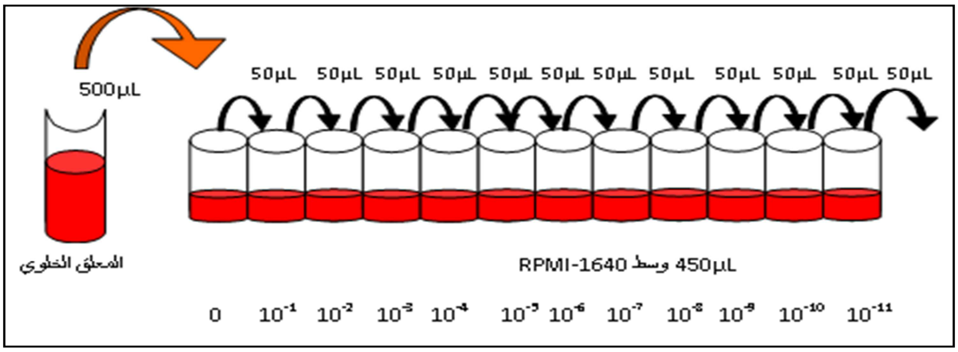
٤) تم استخدام صفائح تحوي 48 بئراً، ذات قعر مدور، من شركة cell star لتحضير سلسلة التمديدات لتحديد حمل الطفيلي في الأنسجة المأخوذة. نخصص 12 بئراً من الصفيحة لمعلق الآفة و12 بئراً من الصفيحة لمعلق العقدة المأخوذة من كل فأرة من فئران مجموعات الدراسة. نضيف 500 مكل من المعلق الخلوي في البئر الأول و450 مكل من وسط RPMI-1640 الكامل في كل بئر من آبار أحد عشر.

٥) تؤخذ 50 مكل من المعلق الخلوي الموجود في البئر الأول بعد مجانسته، وتوضع في البئر الثاني وتمزج جيداً مما يسمح بتمديد عدد الطفيليات بنسبة 10^{-1}. ثم تنقل 50 مكل من المزيج الموجود في البئر الثاني بعد مجانسته وتوضع في البئر الثالث الذي يليه

وتمزج جيداً مما يسمح بتمديد عدد الطفيليات في البئر الثالث بنسبة 10^{-2}.ثم تؤخذ 50 مكل من البئر الثالث إلى البئر التالي فتصبح نسبة التمديد فيه 10^{-3} وهكذا تكرر العملية حتى نصل إلى الأنبوب الثاني عشر فتأخذ منه 50 مكل ونرميها (الشكل 9). تتم جميع الخطوات السابقة تحت الخيمة العقيمة.

٦) تغطى الصفائح وتحضن بدرجة 25 درجة مئوية لمدة 7 أيام.

٧) تتم مراقبة نمو الطفيليات بواسطة المجهر الضوئي المقلوب. حيث يمثل أعلى تمديد ظهرت فيه الطفيليات بالشكل المتحرك حمل الطفيلي في النسيج المراد تحديد حمل الطفيلي فيه.



الشكل9: **سلسلة التمديدات المستخدمة لتحديد حمل الطفيلي في الأنسجة المصابة.**

9-3 تقنية الجريان الخلوي Flow cytometry

أ- المواد والأدوات المستخدمة

تم استخدام الأضداد الفأرية من شركة Bioscience لوسم الخلايا المناعية في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران الممنعة باللقاحات السابقة. تمتاز جميع المواد المتألقة المرتبطة بالأضداد السابقة بحساسيتها للضوء وتبيعها الشركة على شكل محلول في أنابيب بلاستيكية غامقة اللون تحتوي كل منها 100 مكل من محلول الأضداد المطلوبة بتركيز 0.5 ملغ/مل. تتطلب معايرة كل نوع من الخلايا المناعية 50 مكغ من الأضداد التي تسمح بتلوينها في العينة المفحوصة حيث يبلغ الحجم النهائي لهذه العينة 100 مكل.

تم استخدام ثمانية أنواع مختلفة من الأضداد سنقوم فيما يلي باستعراضها:

1- أضداد للمستضدالفأري CD49b:

تعرف هذه الأضداد باسم انتيغرين ألفا integrine alpha2 (ITGA). تكون هذه الأضداد موسومة بمادة FITC، فلوروسيئين ايزوثيوسيانات fluorescein isothiocyanate، التي تضفي على الخلايا التي سترتبط بها تألقاً بلون أخضر.

يسمح تفاعل هذه الأضداد مع المستضدات CD49b الموجودة على معظم الخلايا الفأرية القاتلة الطبيعية NK cells.

2- أضداد للمستضدالفأري CD19:

هذه الأضداد موسومة بمادة APC، Allo Phyco Cyanin،التي تضفي على الخلايا التي سترتبط بها تألقاً بلون زهري.

يسمح تفاعل هذه الأضداد مع المستضدات CD19 الموجودة على سطح الخلايا البائية

B cells، والتي يعبر عنها في كافة مراحل تطور الخلايا البائية باستثناء مرحلة تمايزها إلى خلايا بلاسمية.

3- أضداد للمستضدالفأري CD8α:

وتعرف هذه الأضداد باسم Ly-2، أو Ly-35، أو Ly-B، أوLyt-2. تكون هذه الأضداد موسومة بمادة PerCP-Cy5.5، perdinin chlorophyll cyanine 5.5، وتضفي على الخلايا التي سترتبط بها تألقاً بلون أحمر غامق deep red.

المبدأ : تتفاعل هذه الأضداد مع جزيئات CD8α الفأرية وهي مستقبلات سطحية تتواجد على سطح الخلايا التائية. تلعب هذه المستقبلات دوراً في تطور وتفعيل الخلايا التائية الناضجة mature T cell من خلال قدرتها على الارتباط مع معقد التوافق النسيجي الصف الأول MHC I، ومن ثم مع البروتين تيروزين كيناز tyrosine kinase.

4- أضداد للمستضدالفأري CD4:

وتعرف هذه الأضداد باسم L3T4،أو Ly-4. تكون هذه الأضداد موسومة بمادة APC،Allo Phyco Cyanin، التي تضفي على الخلايا التي سترتبط بها تألقاً بلون زهري.

المبدأ : تتفاعل هذه الأضداد مع جزيئات CD4 الفأرية التي هي مستقبلات سطحية تتواجد على سطح الخلايا التائية. ترتبط CD4 مع MHCII على سطح الخلايا المقدمة للمستضدات ومع البروتين تيروزين كيناز tyrosine kinase، وبذلك تلعب دوراً هاماً في تطور ونضج الخلايا التائية وجعل الخلايا التائية الناضجة فعالة وظيفياً بشكل كامل.

5- أضداد للمستضدالفأري CD3e:

تكون هذه الأضداد موسومة بمادة PE، phycoerythrin، التي تضفي على الخلايا المرتبطة بها تألقاً بلون أحمر برتقالي.

المبدأ : تتفاعل هذه الأضداد مع المستضدCD3e وهو تحت وحدة subunit من معقد مستقبلات الخلايا التائية TCR complex. تعبر كل الخلايا التائية الناضجة عن CD3، ويحرض ارتباط الأضداد السابقة مع TCR بدء التفعيل والتمايز الخلوي للخلايا التائية.

6- أضداد للمستضدالفأري CD11c:

تعرف هذه الأضداد باسم أنتيغرين ألفا إكس ITGAX)Integrin α X). هذه الأضداد موسومة بمادة APC،Allo Phyco Cyanin، التي تضفي على الخلايا التي سترتبط بها تألقاً بلون زهري.

المبدأ: تتفاعل هذه الأضداد مع المستضد CD11c الفأرية التي تعبر عنها الخلايا التغصنية.

7- أضداد للمستضدالفأري CD11b:

تعرف هذه الأضداد باسم أنتيغرين ألفا ITGAMIntegrin α M"M". تكون هذه الأضداد موسومة بمادة APC، Allo Phyco Cyanin، التي تضفي على الخلايا التي سترتبط بها تألقاً بلون زهري.

المبدأ: تتفاعل هذه الأضداد مع المستضد CD11b الفأرية التي تعبر عنها البالعات والخلايا القاتلة الطبيعية NK cells والعدلات.

8- أضداد للمستضدين الفأريين CD16 وCD32:

تعرف هذه الأضداد باسم FCGR3، أوIGFR3،أوFCGR2،أو حاجب المستقبل FC

وهذه الأضداد غير موسومة.

المبدأ: تتفاعل هذه الأضداد مع المستضدين CD16 وCD32 الفأرية. يتم التعبير عن هذين المستضدين من قبل الخلايا البائية B cells والبالعات الكبيرة Macrophages والوحيدات Monocytes والخلايا القاتلة بطبيعتها NK cells والعدلات Neutrophils.

وبالتالي تم تحديد نوع الخلايا المناعية من خلال استخدام هذه الأضداد وفقاً لما يلي:

1- الخلايا التائية المساعدة T helper cells: بكشف المستضدين CD4 وCD3.

2-الخلايا التائية السامة cytotoxic T cells: بكشف المستضدين CD8 وCD3.

3- الخلايا البائية B cells: بكشف المستضد CD19.

4- الخلايا القاتلة الطبيعية natural killer cells: بكشف المستضد CD49b.

5- الخلايا التغصنية dendritic cells: بكشف المستضد CD11c.

6- البالعات: بكشف المستضد CD11b.

ب- خطوات العمل

تم استخدام جهاز الجريان الخلوي الموجود في هيئة الطاقة الذرية ومن نوع Facscalibur المنتج من قبل شركة BD Bioscience. وتم استخدام برنامج Cell Quest Pro لتحليل البيانات وجمعها.

1- عزلت عقدة لمفية من كل فأرة من الفئران الثلاثة المخصصة لكل أسبوع من الأسابيع لكل مجموعة من مجموعات الدراسة، ووضعت في أنابيب أبندروف سعة 2 مل تحتوي على1 مل وقاء فوسفاتي PBS و2% من مصل العجل الجنيني كما أشير سابقاً. ستطبق الخطوات التالية على كل أنبوب من أنابيب الأبندروف الحاوية على العقد اللمفية.

2- وضعت العقدة الخاصة بالفئران الثلاثة المأخوذة كل أسبوع من كل مجموعة من مجموعات الدراسة على مرشحة قياس 75 ميكرون، تسمح بمرور الخلايا التي أبعادها أقل من 75 ميكرون وبشكل مفرد كل خلية بمفردها، موجودة فوق أنبوب بلاستيكي 15 مل كتب عليه اسم مجموعة الفئران المدروسة والأسبوع الذي أخذت فيه العينة. تم تثليم العقد بواسطة مشرط وهرسها بواسطة مكبس سيرنغ مطاطي.

3- غسلت العقد بعدها بـ 5 مل PBS وثفلت الأنابيب الحاوية على المعلق الخلوي مدة 10 دقائق بسرعة 1300 دورة / د. ثم تم التخلص من السائل الطافي وأعيد الغسل عملية مرة أخرى بـ 5 مل PBS أخرى.

4- نرمي السائل الطافي ونحصل بالتالي على رسابة الخلايا المناعية بالقعر في كل أنبوب.

5- نضيف إلى الأنبوب السابق 3 مل من الوقاء PBS ونعد الخلايا بالعدادة.

6- بعد العد نعلق 5×10^6خلية في 300 مكل من PBS في أنبوب جديد يضاف إليها 3 مكل من الأضداد الحاجبة لمستقبلات FC غير الموسومة، ثم يحضن الأنبوب الأخير لمدة 5 دقائق على الثلج ثم يثفل مدة 10 دقائق بسرعة 1300 دورة / د ويرمى الطافي ومن ثم يضاف 500 مكل PBS إلى الأنبوب كعملية غسل للتخلص من الأضداد الحاجبة

لمستقبلات FC. يثقل الأنبوب بعد ذلك مدة 10 دقائق بسرعة 1300 دورة / د ويرمى الطافي ثم يضاف إليه 0.5 مل PBS.

7- تمديد الأضداد: يتم تحضير الأضداد الممددة لكل تجربة. تم العمل تحت الخيمة وفي الظلام لكون الأضداد حساسة للضوء،حيث تم الاعتماد على ضوء النهار، وفوق مسحوق الثلج. تم تحضير 7 أنابيب أبندروف سعة 2 مل كتب على كل أنبوب اسم الضد المراد تمديده. وضع في كل أنبوب 90 مكل من PBS. ثم أضيف 10 مكل من محلول الأم لكل ضد في الأنبوب أبندورف المخصص له فنحصل على تركيز 50 مكغ/مل لكل ضد من الأضداد السابقة. يوضع باقي محلول الأضداد الأم في البراد بدرجة حرارة +4 م.

8- تم تحضير سلسلة مؤلفة من 5 أنابيب بلاستيكية سعة 5 مل لعينة كل أسبوع من أسابيع مجموعة من مجموعات الدراسة، يكتب عليها اسم مجموعات الدراسة وعدد الخلايا ورقم الأنبوب من 1-5. ثم تم وضع 100 مكل من المعلق الخلوي المحضر في الخطوة 6 إلى كل أنبوب من الأنابيب الخمسة بحيث يحتوي كل أنبوب تقريباً على 10^6 خلية. ويحفظ باقي المعلق الخلوي المحضر في الخطوة 6 في -80^0م لاستخدامه في عزل الـ RNA من الخلايا المناعية.

9-يضاف إلى الأنبوب البلاستيكي الأول من السلسلة السابقة، المحضرة في الخطوة 7 الحاوية على 100مكل من المعلق الخلوي، 10 مكل من المحاليل الممددة لكل من الأضداد DX5 FITC وCD8α PerCP وCD3e PE وCD4 APC لتحديد الخلايا التائية المساعدة والخلايا التائية السامة والخلايا القاتلة الطبيعية من مجموع الخلايا المناعية اعتماداً على فرق ألوان التألق.

- يضاف إلى الأنبوب البلاستيكي الثاني من السلسلة السابقة 10 مكل من المحلول الممدد لأضداد CD19 APC لتحديد الخلايا البائية من مجموع الخلايا المناعية.
- يضاف إلى الأنبوب البلاستيكي الثالث من السلسلة السابقة 10 مكل من المحلول الممدد لأضداد CD11b APC لتحديد البالعات من مجموع الخلايا المناعية.
- يضاف إلى الأنبوب البلاستيكي الرابع من السلسلة السابقة 10 مكل من المحلول الممدد لأضداد CD11c APC لتحديد الخلايا التغصنية من مجموع الخلايا المناعية.
- لا يضاف إلى الأنبوب البلاستيكي الخامس أي نوع من الأضداد ويبقى حاوياً فقط على المعلق الخلوي حيث يستخدم كشاهد.

10- تحضن الأنابيب السابقة على الثلج لمدة نصف ساعة في الظلام.

11- يتم التخلص من الأضداد غير المرتبطة وذلك بإضافة 2 مل من الوقاء PBS إلى كل أنبوب من الأنابيب الخمسة السابقة، ثم التثفيل في مثفلة بدرجة حرارة 8 مئوية لمدة 5 دقائق بسرعة 3200 دورة. يرمي الطافي ونعيد تعليق الخلايا بمحلول دارئة PBS بحجم نهائي 1مل.

12- يضاف إلى كل أنبوب 0.5 مل من محلول بارافورم ألدهيد 2% لتثبيت الخلايا وتحفظ الأنابيب في البراد بدرجة حرارة +4 لحين القيام بالتحليل بجهاز الجريان الخلوي.

13- في اليوم التالي تثفل الأنابيب قبل التحليل لمدة 5 دقائق بسرعة 3200 دورة ويرمى الطافي وتعلق الخلايا في 250 مكل PBS.

14- يتم نقل كل أنبوب من الأنابيب الخمسة السابقة والحاوية على المعلقات الخلوية والأضداد إلى أنابيب القراءة ووضعها في جهاز الجريان الخلوي.

10-3 عزل الـ RNA من العقد اللمفية النازحة

تم عزل الرنا من الخلايا المناعية التي عزلت من العقد اللمفية النازحة والمحفوظة بدرجة حرارة -80 مئوية باستخدام أعمدة كروماتوغرافيا مكروية تحوي على غشاء من السيليكا رابط للـ RNA وعتيدة عزل الرنا من الخلايا الحيوانية GeneJET RNA Purification من شركة Thermo Scientific. وقد اتِبعت الخطوات العامة للاستخلاص المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة.

حفظت الأنابيب الحاوية على عينة الـ RNA بدرجة حرارة ^{0}-20م.

أ- معايرة تركيز الـ RNA باستخدام مقياس الطيف الضوئي

تمت معايرة تركيز الـ RNA المعزول لتحديد تركيزه ودرجة نقاوته بقياس الكثافة الضوئية على طول الموجتين 260nm و280nm في مجال الطيف فوق البنفسجي لمقياس الطيف الضوئي. استعمل الماء ثنائي التقطير لضبط قيمة الصفر للجهاز، وتمت قراءة قيم الكثافة الضوئية لتحديد تركيز الـ RNA في العينات المختلفة، وذلك بعد تحضير محلول ممدد من كل عينة بإضافة 5 مكل من عينة RNA إلى 95 مكل من الماء ثنائي التقطير. كما تم حساب النسبة A260/A280 لتحديد نقاوة العينات، حيث تكون العينة عالية النقاوة إذا تراوحت النسبة ما بين 1.8–2.

تم حساب تركيز الـ RNA في العينة وفق قانون بيير لامبير التالي:

التركيز (مكغ/مل) = OD_{260} × 20×1000/ 40 حيث أن:

OD_{260}: الكثافة الضوئية بطول الموجة 260 نم.

20 هي عامل التمديد.

40 هي العامل الثابت.

ب- الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز 1%

يتطلب تحضير الهلامة 100 مل من محلول الآغاروز 1% الذي يتكون من 1غرام من الآغاروز الذي يتم حله في 100 مل من دارئة TAE بتركيز 0.5X في وعاء زجاجي سعة 500 مل. يسخن المزيج السابق حتى يصل إلى درجة الغليان في فرن أمواج مكروية (Wattar) ثم يخرج الوعاء الزجاجي من الفرن ويترك جانباً حتى تنخفض درجة الحرارة إلى 50 مئوية. يضاف عندئذ 5 مكل إيتديوم برومايد فيصبح تركيزها 0.5 مكغ/مل ثم يصب محلول الآغاروز في القالب الخاص بعد تنظيفه بالميتانول ويغرس المشط في إحدى النهايتين. يترك القالب حتى يبرد الآغاروز ويتهلم بدرجة حرارة الغرفة. وبعد اكتمال التهلم يسحب المشط بحذر وتوضع الهلامة الناتجة في جهازالرحلان وتغمر بدارئة الرحلان TAE بتركيز 0.5X.

تحضرعينات الـ RNA المراد حقنها في الآبار بمزج 10 مكل في أنبوب ابندورف من العينة مع 2 مكل من دارئة التحميل الحاوية على زرقة البروموفينول bromophenol blueLoading Buffer بتركيز 6X، ثم تخلط جيداً ثم تحقن بواسطة الميكروبيبيت في البئر المناسب.

بعد الانتهاء من الحقن يتم توصيل جهاز الرحلان إلى تياركهربائي حيث يضبط التيارعلى 90 فولت لمدة 45 دقيقة ويكون الرحلان أفقي. ثم تصور الهلامة وتوثق باستخدام جهاز موثق الهلام المزود بآلة تصوير خاصة بالأشعة فوق البنفسجية.

11-3 اصطناع الدنا المتمم complementary DNA (cDNA)

تم اصطناع cDNA من الـRNA، الذي تم عزله من الخلايا المناعية، والمحفوظ بدرجة حرارة -20 مئوية باستخدام عتيدة اصطناع الدنا RevertAid First Strand cDNA Synthesis من شركة Thermo Scientific. وقد اتِبعت الخطوات العامة لاصطناع cDNA المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة.

وقد حفظت العينات بدرجة حرارة -80ºم حتى إجراء الـ Real-Time PCR لاحقاً.

12-3 تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي Real-Time PCR

استخدمتفاعل Real-Time PCR لتضخيم cDNA الذي تم اصطناعه بهدف دراسة التعبير عن السيتوكينات التالية: IFN-γ، وIL-4، وIL-12. أنجزتتفاعلات Real-Time PCR باستخدام جهاز Applied Biosystems وعتيدة Maxima Prob/ROX qPCR Master Mix من شركة Thermo Scientific. تم شراء مجموعة من المشرعات Primers من شركة Alpha DNA الكندية، ويبين الجدول 3 أسماء المشرعات وتسلسلها النيكليوتيدي. تم شراء أربع مجموعات من المشرعات تضم كل مجموعة منها ثلاث مشرعات: Forward، وreverse، و المسبار probe الموسوم في النهايتين 3 و5 حيث توسم في النهاية 5 بمادة متألقة reporter وهي 6- كاربوكسي فلوروسئين"FAM" 6carboxy fluorocein ويوسم في النهاية 3 بمادة كابتة quencher وهي 6 كاربوكسي تتراميتيل رودأمين 6-carboxytetramethylrhodamine "TAMRA".

الجدول 3: أسماء المشرعات المستخدمة في تفاعل Real-Time PCR وتسلسلها النيكليوتيدي.

اسم المشرع	التسلسل النيكليوتيدي(5 إلى 3)
IFN-γ-RV	5-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3
IFN-γ-FW	5-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3
IFN-γ- prope	5-TCACCATCCTTTTGCCAGTTCCTCCAG-3
IL-4-RV	5-GAAGCCCTACAGACGAGCAGCTCA-3
IL-4-FW	5-ACAGGAGAAGGGACGCCAT-3
IL-4- prope	5-TCCTCACAGCAACGAAGAACACCACA-3
IL-12 p40-RV	5-AACTTG AGGGAGAAGTAGGAATGG-3
IL-12p40-FW	5-GGAAGCACGGCAGCAGAATA-3
IL-12p40- prope	5-CATCATCAAACCAGACCCGCCCAA-3
HPRT-RV	5-CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA-3
HPRT-FW	5-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC-3
HPRT-prope	5-TGTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTGG AT-3

حضر حجم نهائي قدره 25µl لكل تفاعل يحوي على المواد المبينة في الجدول 4 لكل تفاعل Real-Time PCR.

الجدول 4: المواد المستخدمة في تفاعل Real-Time PCR

المادة	الكمية مقدرة بالميكرولتر
Maxima® Probe/ROX Qpcr Master Mix	12.5
Forward Primer	0.75
Reverse Primer	0.75
Probe	0.5
الماء الخالي من النيوكلياز	8.5
cDNA	2
الإجمالي	25

وبُرمج الجهاز لينجز 40 دورة، بعد إجراء مسخ أولي بدرجة حرارة 95^{o}م لمدة 10 دقائق. تتألف كل دورة من ثلاث مراحل مدة كل منها 30 ثانية. تم التسخين في المرحلة الأولى إلى الدرجة 95 مئوية ، وفي الثانية إلى الدرجة 60 مئوية ، وفي الثالثة إلى الدرجة 72 مئوية ، ويتم تضخيم التسلسل المراد تضخيمه بالاستفادة من النيوكليوتيدات الحرة الموجودة ضمن التفاعل.

ملاحظة: التركيز النهائي لجميع المشرعات المستخدمة في تفاعل Real-Time PCR هو 0.3 ميكرومولار.

4- الدراسة الإحصائية

تم التعبير عن القيم المختلفة بحساب المتوسط الحسابي X والانحراف المعياري SD. اعتمد اختبار T student لتحديد فيما إذا كان الفارق بين المتوسطات ناجماً عن الحظ والمصادفة أم أنه فارق جوهري ذو دلالة إحصائية. اعتمدت قيمة $P < 0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً.

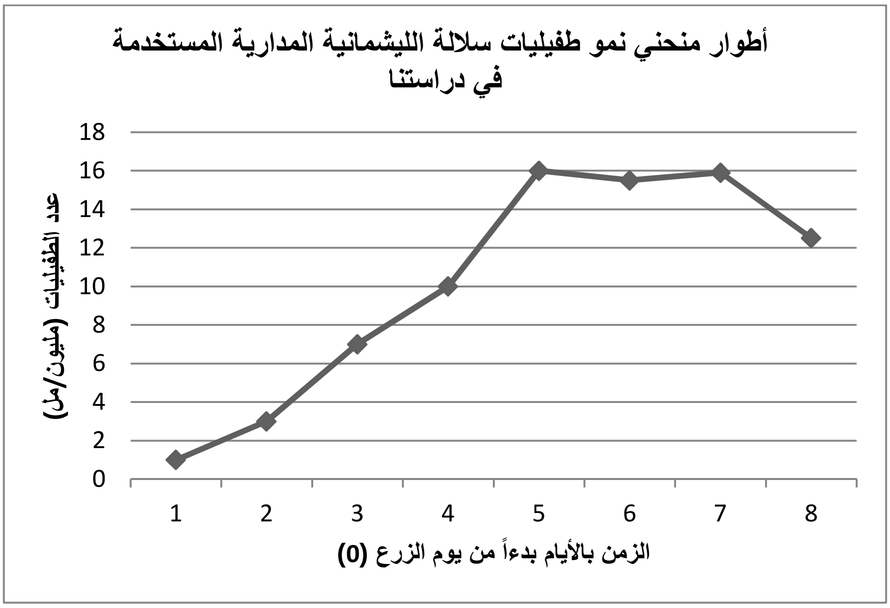
اعتمد معامل ارتباط Pearson لدراسة قوة علاقة الارتباط، حيث تكون العلاقة قوية كلما اقترب قيمة r من الواحد.تكون العلاقة وثيقة جداً إذا كان حيث بلغ معامل الارتباط 0.9<r وتكون وثيقة فقط إذا كان معامل الارتباط 0.8<r وتكون العلاقة جيدة إذا كان معامل الارتباط 0.7<r. تم استخدم برنامج Microsoft Excel لمعالجة البيانات وتحليلها ورسم المنحنيات البيانية.

5- النتائج Results

5-1 توصيف سلالة الطفيليات المستخدمة

يؤدي زرع 10^6 طفيلي/ مل من هذه الطفيليات على وسط RPMI-1640، المدعم بـ 10 % مصل عجل جنيني منزوع المتممة، إلى نموها وفقاً لمنحني النمو المبين بالشكل 10. يتألف منحنى نمو السلالة المختارة من الأطوار الأربعة التالية: طورالكمون في بداية الزرع حيث تحتاج الطفيليات 24 ساعة لتتأقلم مع الوسط حتى تبدأ بالتكاثر، والطور اللوغاريتمي الذي يستمر لمدة 96 ساعة ويتكاثر فيه الطفيلي بالانشطار الطولي ويزداد فيه عدد الطفيليات بشكل أسي، وطور الاستتباب والنضج حيث يتوقف خلاله الطفيلي عن الانقسام ويستمر في هذا الطور لمدة 48 ساعة، وطور الانحلال الذي تبدأ فيه أعداد الطفيليات بالتناقص حيث يتحلل خلالها الطفيلي ويموت.

تم المحافظة على سلالة هذه الطفيليات بنقل 1مل مأخوذة من نهاية الطور اللوغاريتمي إلى وسط جديد، حيث تستطيع الطفيليات التكاثر مباشرة في الأوساط الجديدة دون الحاجة إلى فترة كمون.



الشكل 10: منحني تكاثر المشيقات لسلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستناالمسجل.تم الحصول على هذا المنحني بعد زرع مليون طفيلي في 5 مل وسط RPMI-1640 الكامل والحضن بالدرجة 26 م° وتعداد عدد الطفيليات يومياً.

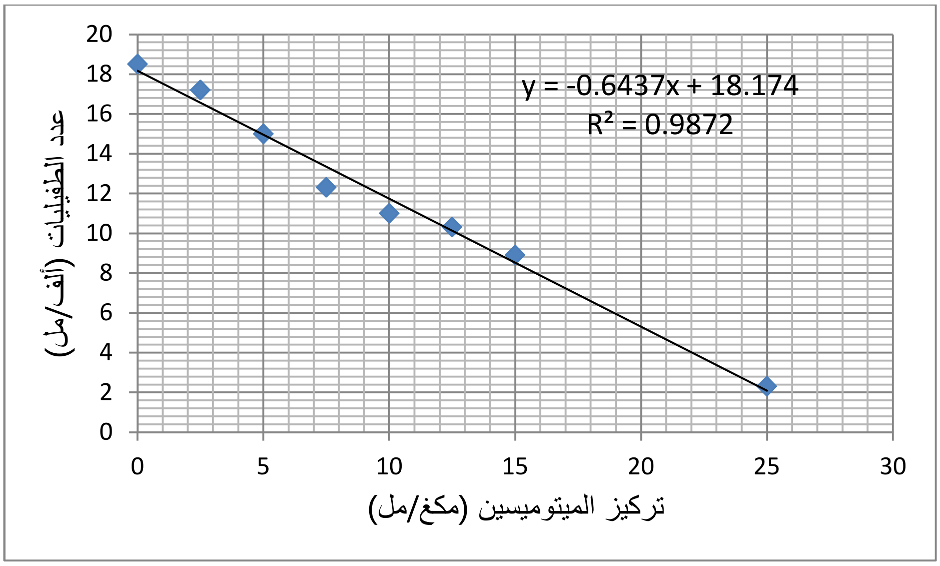
2-5 تحديد تركيز الميتوميسين -c الموقف لتضاعف المشيقات

تمت دراسة تأثير تراكيز متزايدة من الميتوميسين-c المثبطة لتكاثر 10^4 من المشيقات لطفيليات السلالة المستخدمة. ويبين الجدول 5 عدد الطفيليات بعد الحضن بدرجة 26 م لمدة 24 ساعة من المثبطة بتراكيز متزايدة من الميتوميسين.

الجدول 5: تأثير التراكيز المختلفةمن الميتوميسين على أعداد طفيليات الليشمانية المدارية بعد 24 ساعة وحضن بدرجة حرارة 26 م.

تركيز الميتوميسين (مكغ/مل)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	25
عدد الطفيليات (ألف طفيلي/مل)	18.5	17.2	15	12.3	11	10.3	8.9	2.3

سمح رسم المنحني البياني للعلاقة بين التأثير المثبط للتراكيز المستخدمة من الميتوميسين-c وأعداد هذه الطفيليات بعد 24 ساعة من الحضن، الشكل 11، بتأكيد وجود علاقة ارتباط عكسية قوية حيث بلغت r=-0.987. وبيّن الحاسب أن معادلة الخط البياني هي y=-0.643x+18.17، حيث سمحت هذه المعادلة بحساب الجرعة المثبطة لتكاثر 10^4 من الأشكال المتحركة للطفيلي والتي بلغت 12.7 مكغ/مل. وبالتالي فقد استخدمنا هذا التركيز لتثبيط نمو الطفيليات.



الشكل 11: تراكيز الميتوميسين-c وأعداد الطفيليات بعد حضن 10^4 طفيلي في وسط RPMI 1640 الكامل مع تراكيز مختلفة من الميتوميسين لمدة 24 ساعة بدرجة 26 م.

3-5 تقييم فعالية تمنيع اللقاحات المستخدمة عند الفئران

تم اختيار 138 فأرة قسمت إلى ثلاثة مجموعات ضمت كل مجموعة 45 فأرة، مجموعة الفئران الملقحة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، ومجموعة الفئران الملقحة بالطفيليات المقتولة بالحرارة،ومجموعة الفئران الملقحة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين. واستخدمت الفئران الثلاثة الباقية كمجموعة شاهدة.

1-3-5 متابعة التغيرات في حجم الآفة

تم تلقيح الفئران بأنواع مختلفة من الطفيليات، الحية أو المقتولة أو المثبطة بالميتوميسين، وبعد مرور4 أسابيع على الحقن تم قياس الفرق بين ثخانة قدمي كل فأر من فئران مجموعات الدراسة بواسطة المسماك caliper. ثم قمنا بحساب وسطي الفرق السابق المسجل عند 3 فئران من كل مجموعة من المجموعات. وبعد انتهاء الأسابيع الأربعة السابقة تم تقصي فعالية اللقاح بإجراء التحدي من خلال حقن الفئران الملقحة سابقاً بـ10^6طفيلي من الطفيليات الحية وتم تكرار عملية قياس حجم الآفة كل أسبوعين بدءاً من الأسبوع الذي حقنا فيه التحدي ولمدة ثمانية أسابيع.

1- متابعة التغيرات في حجم الآفة بعد أربعة أسابيع على التمنيع:

ظهرت الإصابة الجلدية عند الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة وبلغ متوسط الفرق بين حجم القدمين الممنعة وغير الممنعة للفئران والذي يمثل حجم الآفة 0.29 ملم. بينما لم تظهر الإصابة الجلدية عند الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين.

2- متابعة التغيرات في حجم الآفة بعد إجراء اختبار التحدي:

تم اختبار فعالية تمنيع الفئران الممنعة بالطفيليات السابقة، وذلك بحقنها بطفيليات حية مفوعة. وقد أدى الاختبار السابق لظهور آفات جلدية عند جميع الفئران السابقة وسنستعرض فيما يلي التغيرات التي طرأت على حجم هذه الآفات (الشكل 12).

أ- تطور حجم الآفة لدى مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة:

أدى اختبار التحدي إلى زيادة الفرق بين ثخانتي القدمين إلى 0.41 ملم في W2، و0.91 ملم في W4، ثم إلى 0.92 ملم في W6، و0.93 ملم في W8.

ب- تطور حجم الآفة لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة:

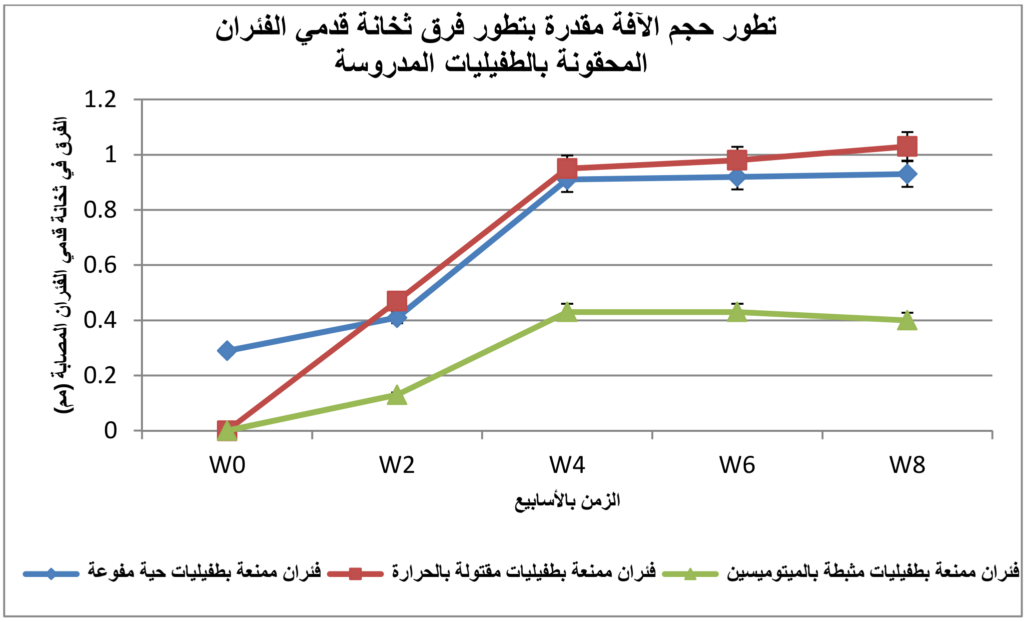
أدى اختبار التحدي إلى زيادة الفرق بين ثخانتي القدمين إلى 0.47 ملم في W2، و0.95 ملم في W4، وارتفع إلى 0.98 ملم في W6، و1.03 ملم في W8.

ت- تطور حجم الآفة لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين:

أدى اختبار التحدي إلى ظهور آفة جلدية لدى الفئران الممنعة بعد أسبوعين حيث بلغ الفرق بين ثخانتي القدمين 0.13 ملم في W2، ثم ارتفع الفرق بين ثخانة القدمين عند هذه الفئران ليبلغ 0.43 ملم في W4 وW6، بينما انخفض قليلاً في W8 ليصبح 0.4ملم.

كان ارتفاع حجم الآفة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ذو دلالة إحصائية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.000097 و0.000005 و0.0038 و0.00012 على التوالي. وكذلك كان ارتفاع حجم الآفة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة ذو دلالة إحصائية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.0010 و0.00069 و0.0035 و0.00037 على التوالي.

بينما كان ارتفاع حجم الآفة بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة لا يعتد به إحصائياً على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.055 و0.1762 و0.315 و0.098 على التوالي.



الشكل 12: تطور حجم الآفة مقدرةً بتطور فرق ثخانة قدمي الفئران لدثلاث مجموعات مختلفة من الفئران قبل اختبار التحدي (أي بعد مرور4 أسابيع على تلقيحها) في أسفل القدم اليمنى بـ 10^4من طفيليات الليشمانية المداريةالحية المفوعةأو 10^4 من الطفيليات المقتولة بالحرارة أو 10^4 من الطفيليات المثبطة بالميتوميسين، وبعد إجراء اختبار التحدي، بحقنها بـ10^6 طفيليات حية مفوعة.

5-3-2 متابعة تغيرات حمل الطفيلي في الإصابات الجلدية والعقد اللمفية النازحة لدى الفئران

تم تحديد حمل الطفيلي في الآفاتالجلدية والعقد اللمفية النازحة المعزولة من فئران مجموعات الدراسة بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو الطفيليات المقتولة بالحرارة أو الطفيليات المثبطة بالميتوميسين، تمثل النتائج وسطي الحمل عند 3 فئران من كل مجموعة. بعد ذلك تم إجراء اختبار التحدي، بحقن الفئران السابقة بـ 10^6 طفيليات حية مفوعة،ومتابعة حساب الوسطي السابق كل أسبوعين بدءاً من الأسبوع الذي تم فيه اختبار التحدي.

أ- متابعة تغيرات حمل الطفيلي بعد أربعة أسابيع على التمنيع:

أدى تمنيع الفئران بحقنها بـ10^4 من الطفيليات المقتولة بالحرارة أو 10^4الطفيليات المثبطة بالميتوميسين، إلى عدم ظهور آفات جلدية وبالتالي عدم وجود أي طفيلي في القدم اليمنى والعقد اللمفية النازحة للفئران الملقحة بعد 4 أسابيع. بينما ترافق ظهور الآفة عند الفئران

الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة مع وجود 10^9 طفيلي في الآفة و10^7 في العقدة اللمفية النازحة.

ب- متابعة تغيرات حمل الطفيلي بعد إجراء اختبار التحدي:

أدى اختبار فعالية تمنيع فئران بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، بحقنها بـ 10^6 من الطفيليات الحية المفوعة، إلى ظهور آفات عند جميع الفئران السابقة الملقحة وسنستعرض فيما يلي التغيرات التي طرأت على عدد الطفيليات في هذه الآفات والعقد اللمفية النازحة:

1- تطور حمل الطفيلي عند مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة:

أدى اختبار التحدي إلى ظهور 10^{10} طفيلي في القدم في الأسبوع W2، ثم ارتفع إلى 10^{11} طفيلي في W4 وW6، ومن ثم انخفض إلى 10^{10} طفيلي في W8. كذلك الأمر أدى اختبار التحدي السابق إلى ظهور 10^8 طفيلي في العقدة في الأسبوع W2، ثم انخفض إلى 10^7 طفيلي في W4 و10^6 طفيلي في W6، ومن ثم انخفض إلى 10^5 طفيلي في W8 (الشكل 13 والشكل 14).

2- تطور حمل الطفيلي عند مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة:

أدى اختبار التحدي إلى ظهور 10^{11} طفيلي في القدم في الأسبوع W2، ثم ارتفع إلى 10^{12} طفيلي في W4 وW6، ومن ثم انخفض إلى 10^{11} طفيلي في W8. كذلك الأمر أدى اختبار التحدي السابق إلى ظهور 10^9 طفيلي في العقدة في الأسبوع W2، ثم انخفض إلى 10^8 طفيلي في W4 و10^7 طفيلي في W6، ومن ثم انخفض إلى 10^6 طفيلي في W8 (الشكل 13 والشكل 14).

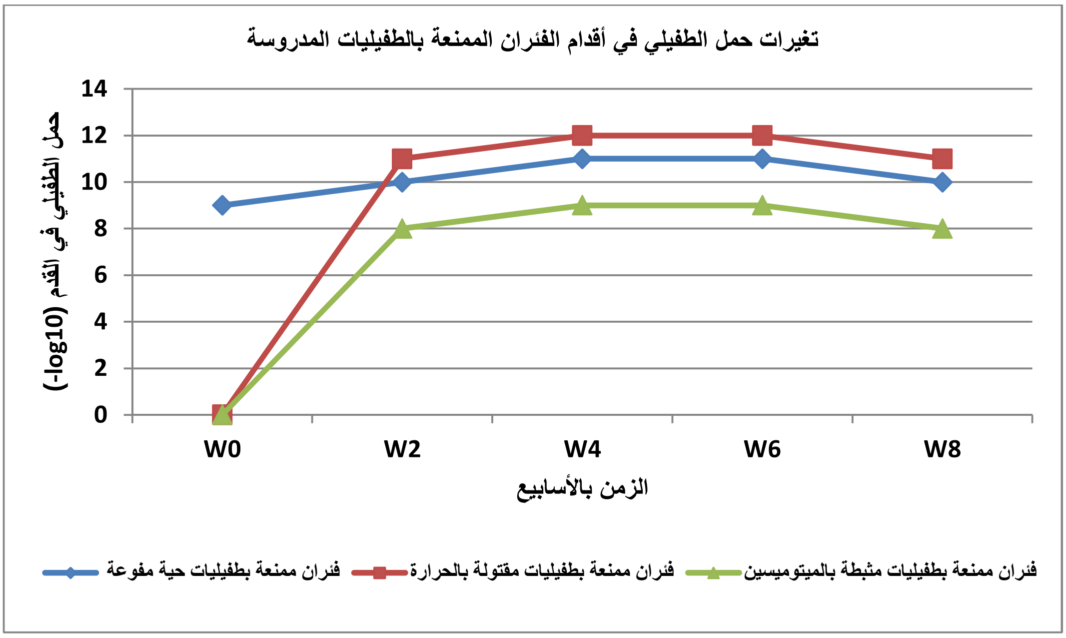
3- تطور حمل الطفيلي عند مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين:

أدى اختبار التحدي إلى ظهور 10^8 طفيلي في القدم في الأسبوع W2، ثم ارتفع إلى 10^9 طفيلي في W4 وW6، ومن ثم انخفض إلى 10^8 طفيلي في W8. كذلك الأمر أدى اختبار التحدي السابق إلى ظهور 10^6 طفيلي في العقدة في الأسبوع W2، ثم انخفض إلى 10^5 طفيلي في W4 و10^4 طفيلي في W6، ومن ثم انخفض إلى 10^3 طفيلي في W8. (الشكل 13 والشكل 14).

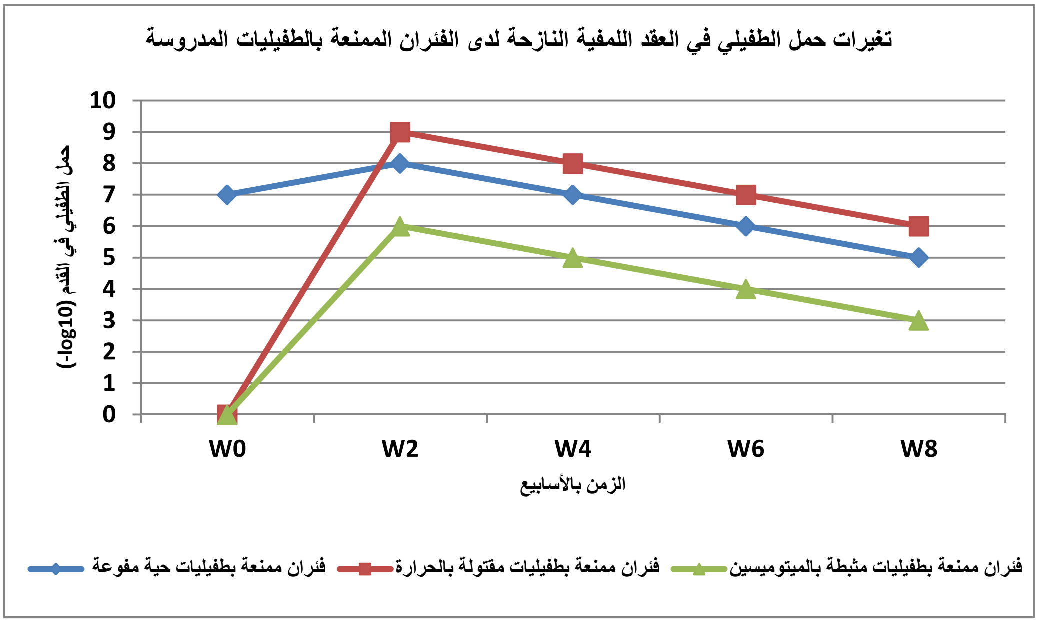
كان ارتفاع حمل الطفيلي في القدم بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ذو دلالة إحصائية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة

P0.019 و0.015 و0.015 و0.037 على التوالي. وكذلك كان ارتفاع حمل الطفيلي في القدم بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة ذو دلالة إحصائية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.0015 و0.0031 و0.0031 و0.0077 على التوالي. بينما كان ارتفاع حمل الطفيلي في القدم بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة لا يعتد به إحصائياً على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.101 و0.226 و0.226 و0.183 على التوالي.

كان الفارق في ارتفاع حمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ذو دلالة إحصائية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.011 و0.013 و0.038 و0.024 على التوالي. وكذلك كان الفارق في ارتفاع حمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة ذو دلالة إحصائية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.013 و0.0031 و0.0022 و0.0048 على التوالي. بينما كان الفارق في ارتفاع حمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة لا يعتد به إحصائياً على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت قيمة P0.155 و0.121 و0.099 و0.101 على التوالي.



الشكل13: تطور حمل الطفيلي في القدم لدى ثلاث مجموعات مختلفة من الفئران الممنعة بـ10^4من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو 10^4 من الطفيليات المقتولة بالحرارة أو10^4 من الطفيليات المثبطة بالميتوميسين، في أسفل القدم اليمنى، بدءاً من الأسبوع 0 ولمدة 8 أسابيع بعد التحدي، بحقنها بـ 10^6 طفيليات حية مفوعة.



الشكل 14:تطور حمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بـ10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو 10^4 من الطفيليات المقتولة بالحرارة أو10^4 من الطفيليات المثبطة بالميتوميسين، في أسفل القدم اليمنى، بدءاً من الأسبوع 0 ولمدة 8 أسابيع بعد التحدي،بحقنها ب10^6 طفيليات حية مفوعة.

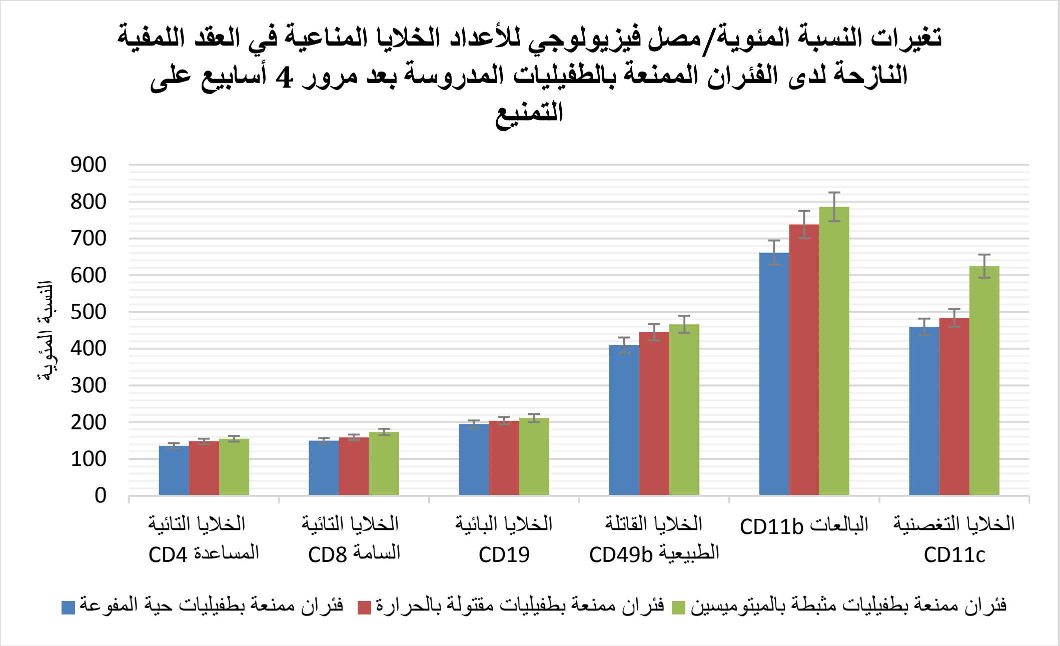
5-3-3 تقييم رد الفعل المناعي في العقد اللمفية النازحة بعد التمنيعوبعد اختبار التحدي

تم تقييم رد الفعل المناعي من خلال تحديد العدد الكلي للخلايا المناعية في العقد المفية النازحة وتحديد النسبة المئوية لأعداد كل من الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ والخلايا التائية السامة $CD8^+$ واللمفاويات البائية B cells والخلايا القاتلة الطبيعية NK cells والبالعات الكبيرة machrophages والخلايا التغصنية dendritic cells، ومن خلال دراسة التعبير الجيني عن الـINF-γ وIL-12 وIL-4.

تم تقدير العدد الكلي للخلايا المناعية في العقد بواسطة flowcytometry وتم قياس هذه التغيرات بحساب النسبة المئوية لمتوسط عدد كل نوع من أنواع الخلايا المناعية المختلفة في العقد المستأصلة من ثلاثة فئران من الفئران الممنعة بأنواع مختلفة من الطفيليات والتي حقنت بالتحدي ومقارنتها مع النسبة المئوية لأعداد هذه الخلايا في العقد اللمفية النازحة للفئران الشاهدة. وتم تقييم تغييرات هذه النسب. واعتبر يوم إجراء التحدي هو بداية تتبعنا للنسب المئوية للخلايا ورمزنا له بالأسبوع 0 أو W0. تمت مقايسة الخلايا بعد مرور أسبوعين على التحدي W2، وأربعة أسابيع W4، وستة أسابيع W6، وثمانية أسابيع W8. كذلك تمت دراسة التعبير الجيني عن السيتوكينات السابقة في هذه العقد أيضاً في W0 وW2 وW8.

أ- متابعة تغيرات الخلايا المناعية في العقد اللمفية النازحة بعد أربعة أسابيع على التمنيع:

يبين الشكل 15النتائج التي تم الحصول عليها.

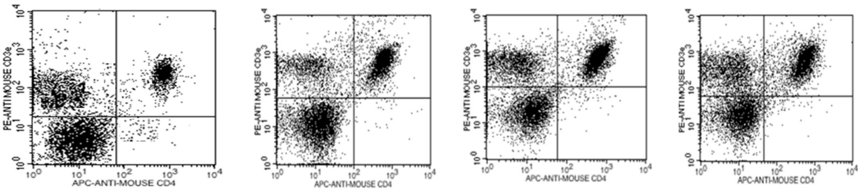


الشكل 15:متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ولأعداد الخلايا التائية السامة $CD8^+$ ولأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية$CD49b^+$ولأعداد الخلايا البائية $CD19^+$ ولأعداد البالعات $CD11b^+$ ولأعداد الخلايا التغصنية $CD11c^+$مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من فئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعةأوالمقتولة بالحرارة أوالمثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.

1- تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$:

تمت مقايسة أعداد الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ بكشف المستضدات CD4 وCD3. أدى تمنيع الفئران بالطفيليات السابقة إلى حدوث ارتفاع في أعدادالخلايا التائية المساعدة بعد مرور أربعة أسابيع. وقد سمح التمنيع بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين بحدوث الارتفاع الأكبر في النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة حيث بلغت 154.93% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. واحتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة المرتبة الثانية حيث بلغت النسبة 147.9% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. سجل الانخفاض الأقل في النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة عند الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعةحيث بلغت النسبة 136% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي، الشكل 16.

وكان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.00107 و0.016 و0.0192 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعةومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.



طفيليات مثبطة بالميتوميسين   طفيليات مقتولة بالحرارة   طفيليات حية مفوعة   الشاهد

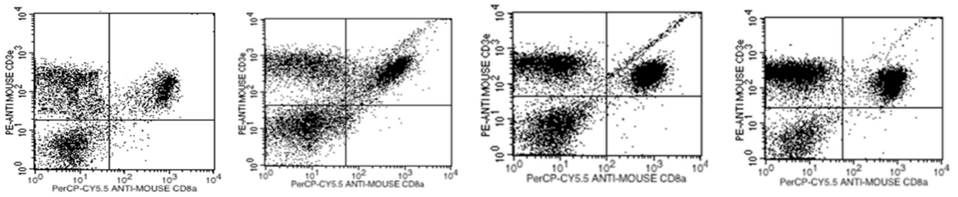
الشكل 16: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD4 و-PE antimouse CD3 وتقنية flowcytometryوذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.

2- تغيرات أعداد الخلايا التائية السامة $CD8^+$:

تمت مقايسة أعداد الخلايا التائية السامة $CD8^+$ بكشف المستضدات CD8 وCD3.

سمح تمنيع الفئران بالطفيليات السابقة إلى حدوث ارتفاع في أعدادالخلايا التائية السامة بعد مرور أربعة أسابيع. وقد سمح التمنيع بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين بحدوث الارتفاع الأكبر في النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة حيث بلغت 173.06% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي.واحتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة المرتبة الثانية حيث بلغت النسبة 158.56% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. سجل الارتفاع الأقل في النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة عند الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة والتي بلغت 149.7% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي، الشكل 17.

كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.00023 و0.0008 و0.00142 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.



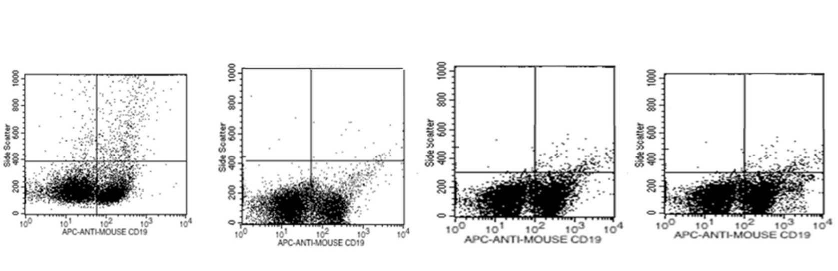
طفيليات مثبطة بالميتوميسين   طفيليات مقتولة بالحرارة   طفيليات حية مفوعة   الشاهد

الشكل 17: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد PerCP-Cy5.5 antimouse CD8a وPE-antimouse CD3 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.

3- تغيرات أعداد اللمفاويات البائية:

سمح تمنيع الفئران بالطفيليات السابقة إلى حدوث ارتفاع في أعداد الخلايا البائية بعد مرور أربعة أسابيع على تمنيعها. وقد سمح تمنيع الفئران بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين بحدوث الارتفاع الأكبر في نسبة الخلايا البائية حيث ارتفعت بنسبة211.42% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. بينما ارتفعت لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 204.25% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. وارتفعت لدى الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة بنسبة 194.9% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي، الشكل 18.

كان ارتفاع نسبة الخلايا البائية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0000023 و0.00031 و0.00027 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.



طفيليات مثبطة بالميتوميسين   طفيليات مقتولة بالحرارة   طفيليات حية مفوعة   الشاهد

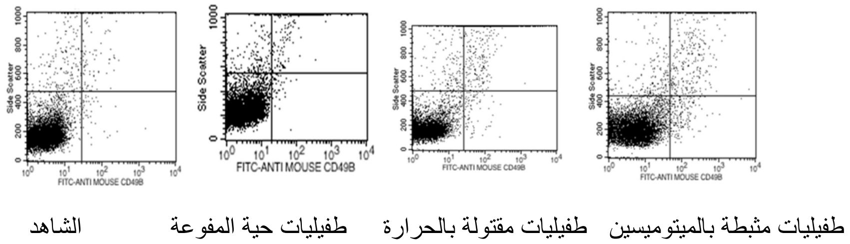
الشكل 18: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD19 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.

4- تغيرات أعداد الخلايا القاتلة الطبيعية:

تمت مقايسة أعداد الخلايا القاتلة الطبيعية بكشف المستضد CD49b.

سمح تمنيع الفئران بالطفيليات السابقة إلى حدوث ارتفاع في النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية بعد مرور أربعة أسابيع على تمنيعها. وبالتالي فقد سمح تمنيع الفئران بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين بحدوث الارتفاع الأكبر حيث بلغت 466.22% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. بينما ارتفعت لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 445% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. بينما احتلت مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة المرتبة الثالثة حيث بلغت النسبة لديها 409.57% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي، الشكل 19.

كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.000007 و0.000001 و0.000046 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.



الشكل 19: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد FITC-antimouse CD49b وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.

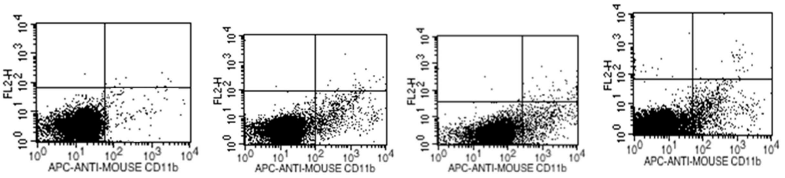
5- تغيرات أعداد البالعات:

تمت مقايسة أعداد البالعات بكشف المستضد CD11b.

سمح تمنيع الفئران بالطفيليات السابقة إلى حدوث ارتفاع في النسبة المئوية لأعداد البالعات بعد مرور أربعة أسابيع على تمنيعها. احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأولى حيث ارتفعت النسبة لديها إلى 786% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي، بينما ارتفعت لدى الفئران الممنعة بالطفيليات

المقتولة بالحرارة إلى 737.73% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي، وارتفعت لدى مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة إلى 661.03% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي.

كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد البالعات ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0000037 و0.000041 و0.000033 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.



طفيليات مثبطة بالميتوميسين طفيليات مقتولة بالحرارة طفيليات حية مفوعة الشاهد

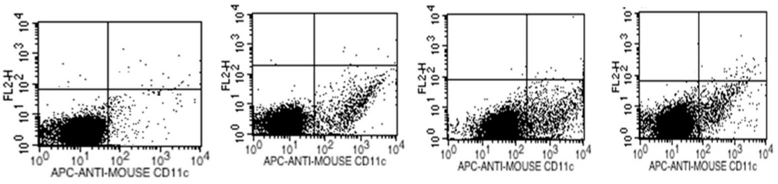
الشكل 20: تغيرات النسبة المئوية لأعداد البالعات في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD11b وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.

6- تغيرات أعداد الخلايا التغصنية:

تمت مقايسة أعداد الخلايا التغصنية بكشف المستضد CD11c.

سمح تمنيع الفئران بالطفيليات السابقة إلى حدوث ارتفاع في النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية بعد مرور أربعة أسابيع على تمنيعها. احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأولى حيث وصلت النسبة عندها إلى 624.94% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. بينما وصلت النسبة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة إلى 483.4% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. واحتلت مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة المرتبة الثالثة حيث وصلت النسبة لديها إلى 459.18% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي.

كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.00000047 و0.0000051 و0.0000088 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.

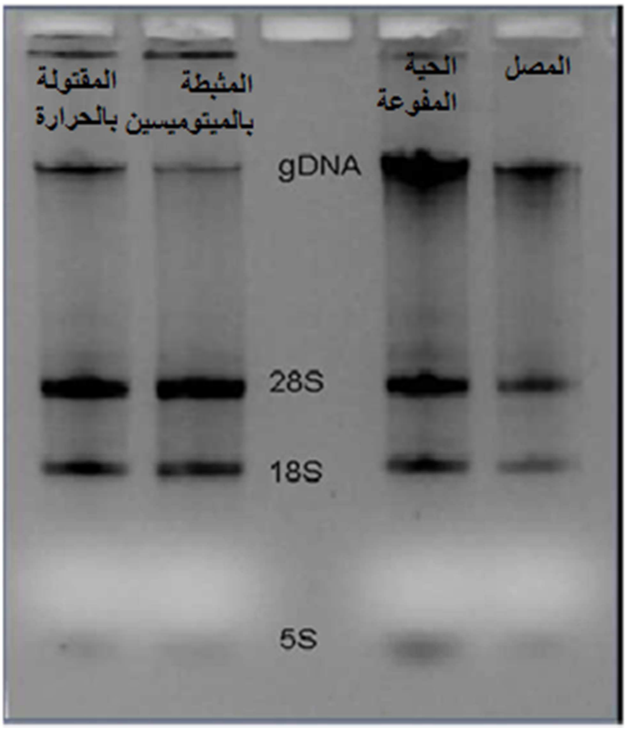


طفيليات مثبطة بالميتوميسين طفيليات مقتولة بالحرارة طفيليات حية مفوعة الشاهد

الشكل 21: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية في العقد اللمفية النازحة الناجم عن حقن القدم اليمنى لفئران Balb\c بـ10^4 من طفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD11c وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور 4 أسابيع على التمنيع.

ب- تغيرات التعبير الجيني عن السيتوكينات في العقد اللمفية النازحة بعد 4 أسابيع على التمنيع:

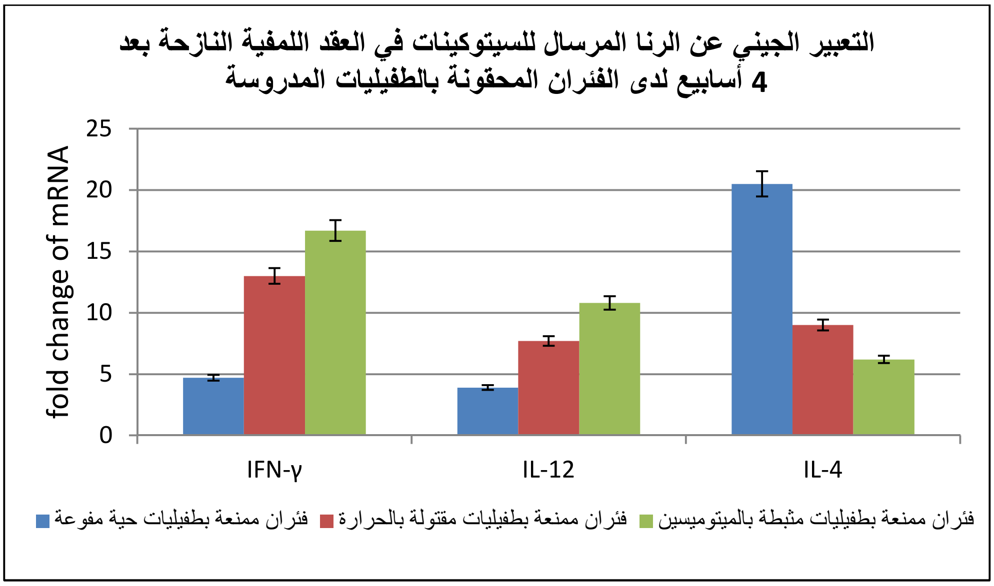
عُزل الـRNA من الخلايا المناعية التي تم حصادها من العقد اللمفية المعزولة من الفئران الملقحة باللقاحات السابقة. وتم التأكد من جودة RNA المعزول بالرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة الآغاروز بتركيز 1% وبتعريض الهلامة لمنبع للأشعة فوق البنفسجية حيث تبين وجود عصابة رئيسية تمثل الدنا الجينومي gDNA وثلاث عصابات تمثل 28S و18S و5S (الشكل 22).



الشكل 22: الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة الآغاروز بتركيز 1% لعينات الـ RNA المعزولة يظهروجود gDNA الدنا الجينومي وثلاث عصابات تمثل 28S و18S و5S الخاص بالرنا.

تمت معايرة الـ RNA المعزول من العينات المختلفة، وحددت درجة نقاوته باستخدام مقياس الطيف الضوئي، فتبين أن تركيز الرنا RNA في العينات كانت بحدود 10µg/ml، وتراوحت النسبة A260/A280 بين القيمتين 1.8 و2، مما يشير إلى نقاوة عالية لعينات الرنا RNAالمعزولة وخلوها بشكل شبه كامل من البروتينات. وحفظت العينات عند درجة -20 مئوية.

ثم تم معالجة 2µg من الـRNA المعزول بـ DNase للتخلص من الدنا الجينومي الموجود في العينات. ثم استخدم الـRNA المعالج لتحضير الـ cDNA وفقاً لبروتوكول الشركة المصنعة. تم تضخيم الـ cDNA الناتج بواسطة تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي Real-time PCR وباستخدام مجموعة من المشرعات Primers من أجل تحديد السيتوكينات التالية: الانترفيرون غاما، والانترلوكين 4، والانترلوكين 12. يبين الشكل 23 النتائج التي تم الحصول عليها.



الشكل 23: التعبير الجيني عنالرنا المرسال للسيتوكينات في العقد اللمفية النازحة بعد مرور4 أسابيع على تمنيع الفئران بالطفيليات المدروسة.

أظهرت نتائجنا ارتفاعاً في التعبير عن جين الانترفيرون غاما بعد 4 أسابيع على التمنيع بمقدار 4.3 ضعفاً عند الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة. وارتفعت بمقدار 16.7 ضعفاً عند الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المثبطة بالميتوميسين وبمقدار 13 ضعفاً عند الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المقتولة بالحرارة.

كان ارتفاع التعبير عن جين الانترفيرون غاما ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0000087 و0.00059 و0.0032 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.

بينت نتائجنا أيضاً ارتفاعاً في التعبير عن جين الانترلوكين 12 بمقدار 3.1 ضعفاً لدى الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة وبمقدار 10.8 ضعفاً لدى الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المثبطة بالميتوميسين وبمقدار 7.7 ضعفاً لدى الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المقتولة بالحرارة.

كان ارتفاع التعبير عن جين الانترلوكين 12 ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P 0.0000047 و0.0000027 و0.00019 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة

بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.

كما أظهرت نتائجنا ارتفاعاً في التعبير عن جين الانترلوكين 4 بمقدار 20.5 ضعفاً عند الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة. وبمقدار 6.2 ضعفاً لدى الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المثبطة بالميتوميسين و9 أضعاف لدى الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المقتولة بالحرارة.

كان ارتفاع التعبير عن جين الانترلوكين 4 ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P 0.0000039 و0.00056 و0.0061 على التوالي بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة، وبين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.

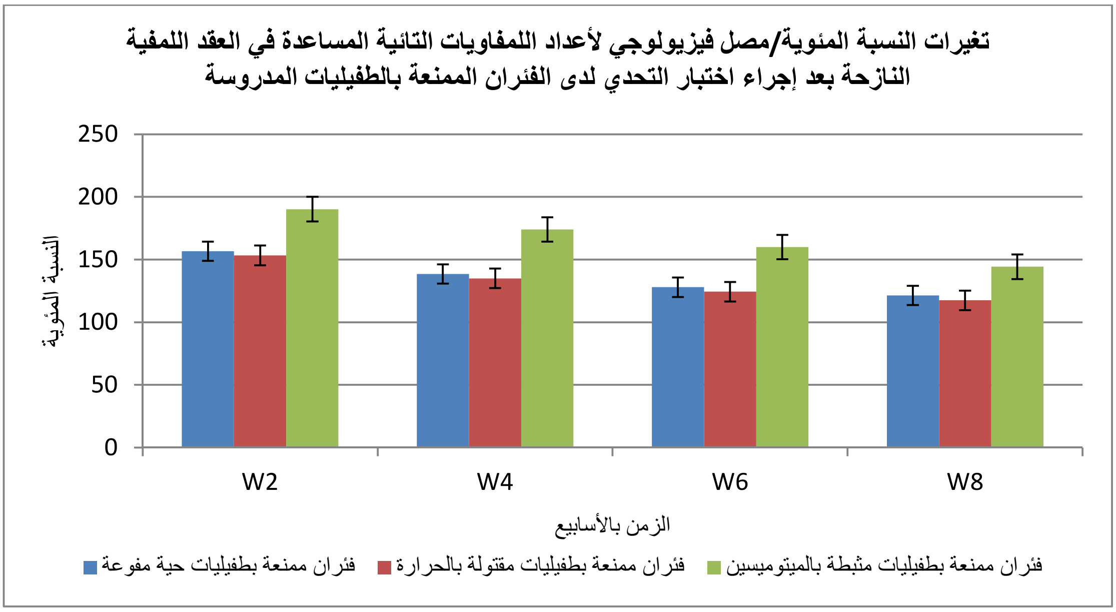
B- تغيرات الخلايا المناعية والسيتوكينات في العقد اللمفية النازحة بعد إجراء اختبار التحدي:

أدى تطبيق اختبار التحدي، بحقن 10^6 طفيليات حية مفوعة، إلى ارتفاع أعداد الخلايا المناعية والتعبير الجيني عن السيتوكينات في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالأنواع المختلفة من الطفيليات. وسنستعرض فيما يلي التغيرات التي طرأت على أعداد الخلايا المناعية و التعبير الجيني عن السيتوكينات:

أ- متابعة تغيرات الخلايا المناعية في العقد اللمفية النازحة بعد إجراء اختبار التحدي:

1- تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$:

يبين الشكل 24 والشكل 25 التغيرات في النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات السابقة بعد إجراء اختبار التحدي.



الشكل 24: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6و8 أسابيع W8 على التحدي.

احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأول في ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت النسبة بعد مرور 2أسبوع على اختبار التحدي 190.23% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 174.02%و159.98% و144.32% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

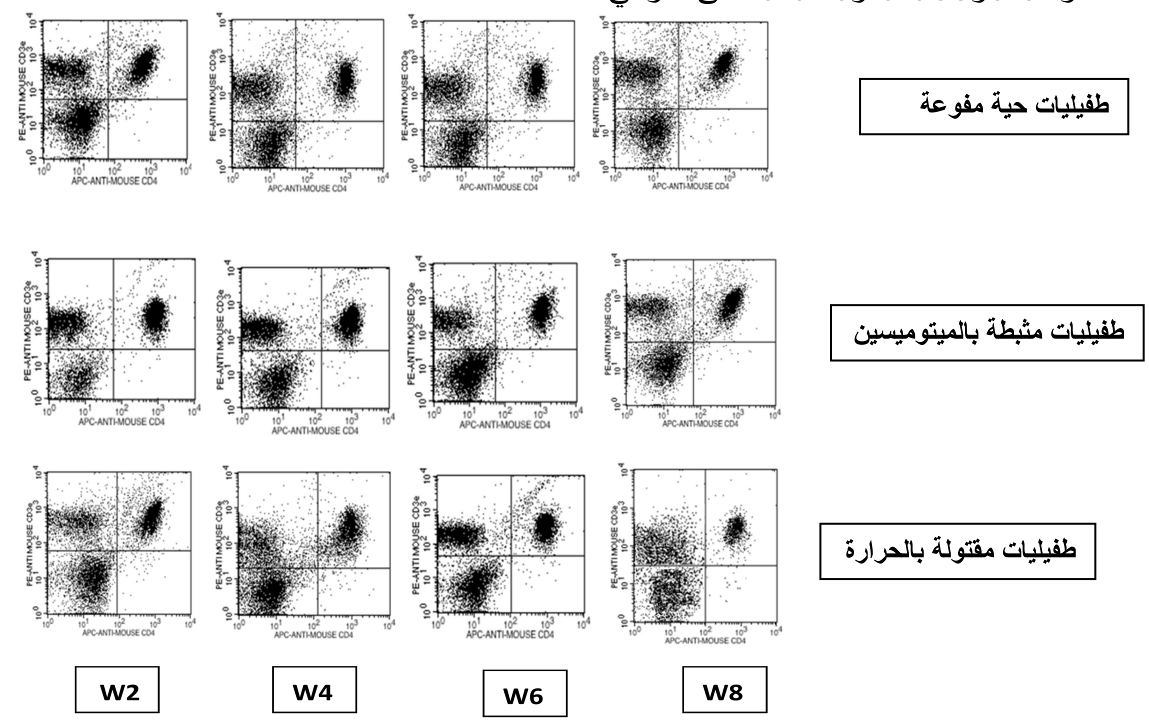
بينما ارتفعت النسبة المئوية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 153.33% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 135.03% و124.43% و117.51% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فارتفعت النسبةالمئوية لتبلغ 156.69% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 138.56% و127.92% و121.12% مقارنة

مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

وكان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0000007 و0.0000026 و0.00000092 و0.00046على التوالي. كذلك كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائيةحيث بلغت قيمة P0.00048 و0.00012 و0.00075 و0.0012على التوالي.

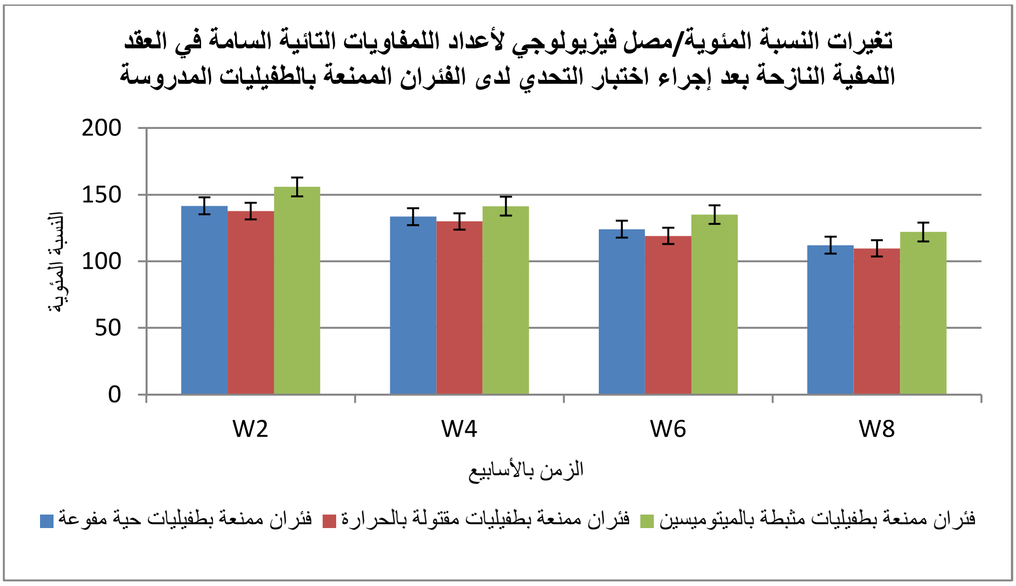
بينما كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية حيث بلغت قيمة P0.113 و0.07و0.065 و0.076 على التوالي.



الشكل 25: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة $CD3^+CD4+$ في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD4 و-PE antimouse CD3 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على اختبار التحدي.

2- تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة $CD8^{+}$:

يبين الشكل 26 والشكل 27 التغيرات في أعداد الخلايا التائية السامة في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة بعد إجراء اختبار التحدي.



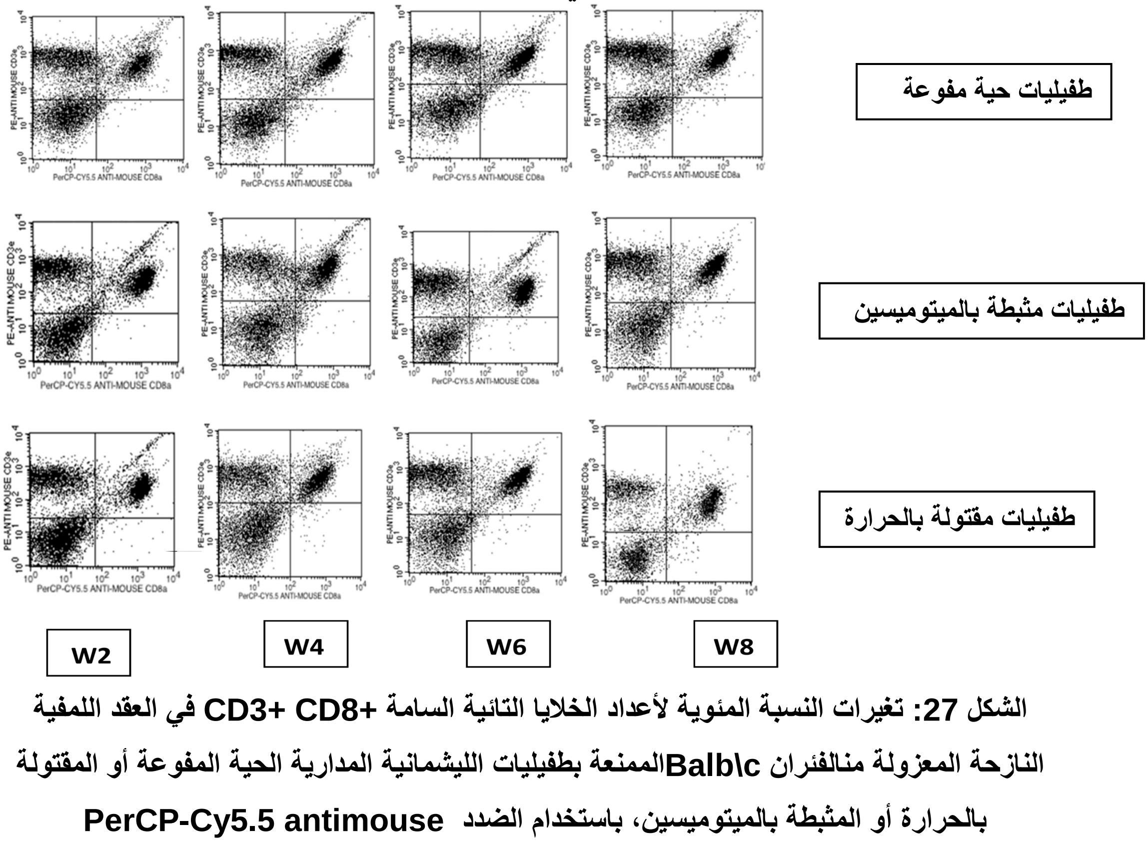
الشكل 26: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على التحدي.

احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأول في ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت النسبة بعد مرور 2 أسبوع على اختبار التحدي 155.86% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 141.33% و134.99% و122.02% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

بينما ارتفعت النسبة المئوية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 137.7% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 129.95% و119% و109.66% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فارتفعت النسبة المئوية لتبلغ 141.56% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 133.53% و124.03% و112.02% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

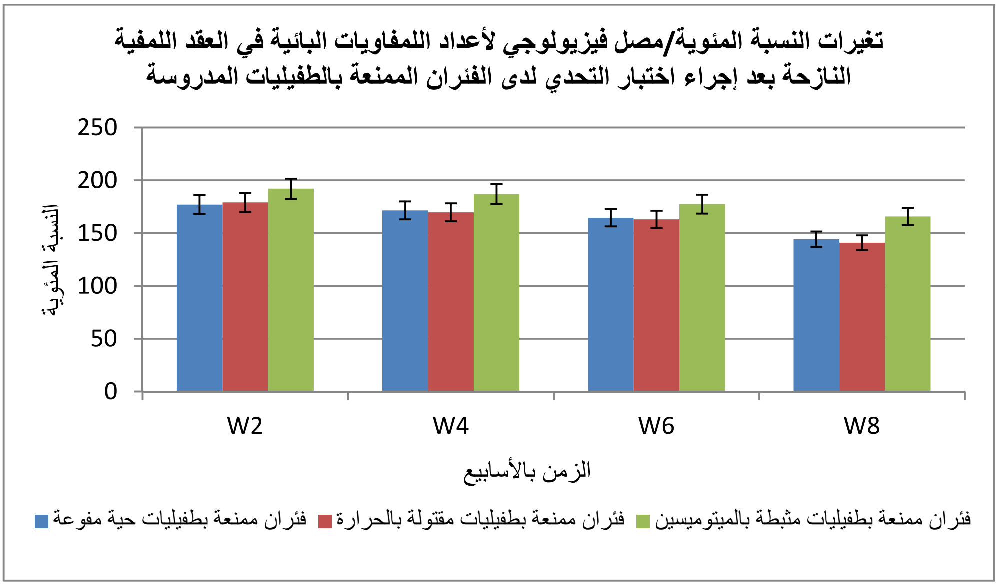
وكان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.00024 و0.024 و0.0085 و0.0027على التوالي.كذلك كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0017 و0.00075 و0.0014 و0.00011على التوالي. بينما كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية حيث بلغت قيمة P0.097 و0.102 و0.074 و0.145 على التوالي.



الشكل 27: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة +CD3+ CD8 في العقد اللمفية النازحة المعزولة منالفئران Balb\cالممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد PerCP-Cy5.5 antimouse CD8aوPE-antimouse CD3 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على اختبار التحدي.

3- تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية $CD19^+$:

يبين الشكل 28 والشكل 29 التغيرات في أعداد الخلايا البائية في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة بعد إجراء اختبار التحدي.



الشكل 28: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائيةمقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على التحدي.

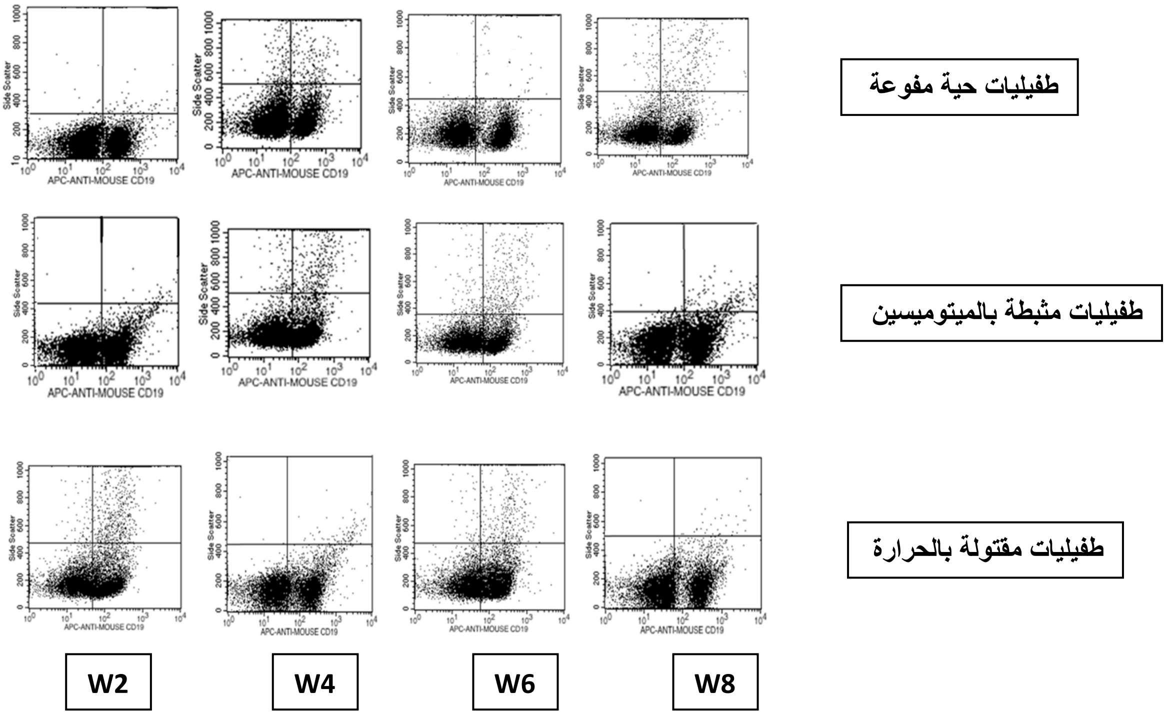
احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأول في ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت النسبة بعد مرور 2 أسبوع على اختبار التحدي 191.95% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 186.87%و171.41% و165.71% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

بينما ارتفعت النسبة المئوية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 179.03% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 169.59% و162.99% و140.93% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فارتفعت النسبة المئوية لتبلغ 177.07% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثمانخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 171.45% و164.5% و144.14% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

وكان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.049 و0.00012 و0.001 و0.000004 على التوالي. كذلك كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0087 و0.000065 و0.0014 و0.00089 على التوالي.

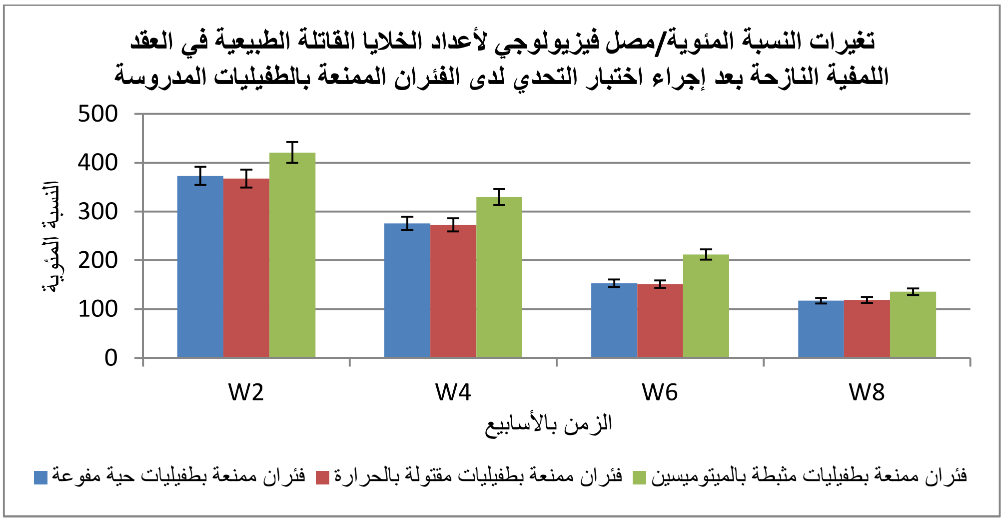
بينما كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية حيث بلغت قيمة P0.371 و0.109 و0.174 و0.062 على التوالي.



الشكل 29: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا البائية +CD19 في العقد اللمفية النازحة المعزولة منالفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD19 وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على اختبار التحدي.

4- تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية $CD49b^{+}$:

يبين الشكل 30 والشكل 31 التغيرات في أعداد الخلايا القاتلة الطبيعية في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة بعد إجراء اختبار التحدي.



الشكل 30: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعيةمقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6و8 أسابيع W8 على التحدي.

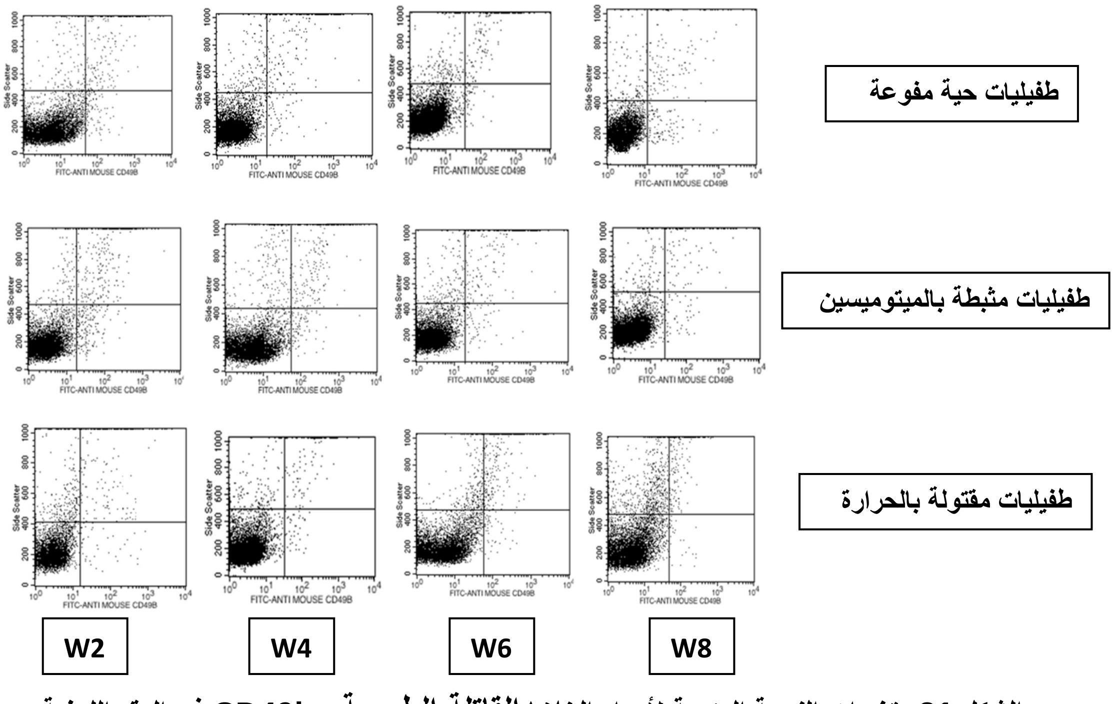
احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأول في ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت النسبة بعد مرور 2 أسبوع على اختبار التحدي 421.17% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 329.63%و211.92% و135.73% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

بينما ارتفعت النسبة المئوية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 367.41% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 272.77% و151.32% و118.96% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فارتفعت النسبة المئوية لتبلغ 373.15% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 275.71% و153.05% و117.28% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيئولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

وكان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.00035 و0.0112 و0.000064 و0.022 على التوالي. كذلك كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.000057 و0.0097 و0.000023 و0.0315 على التوالي.

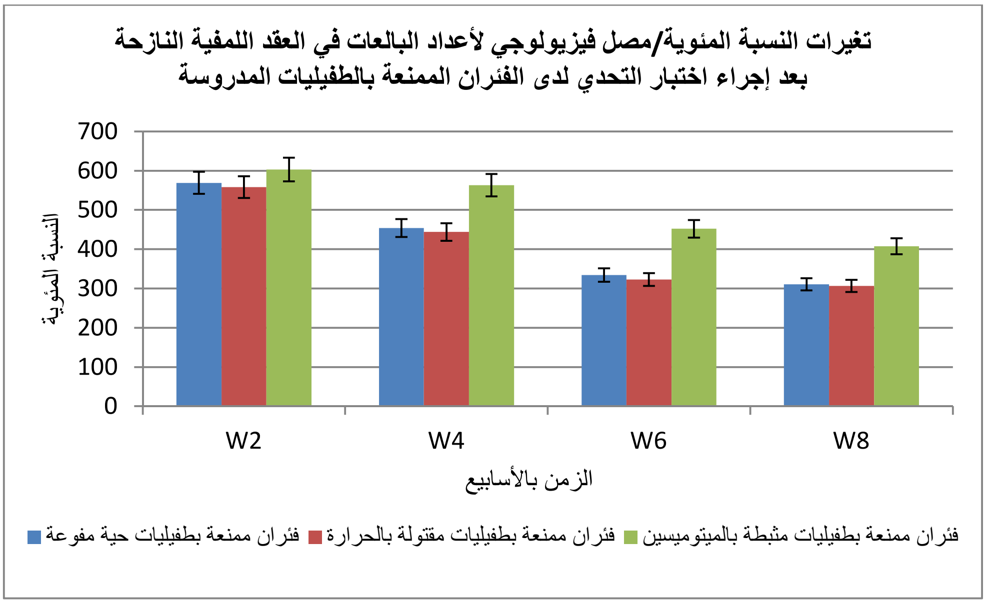
بينما كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية حيث بلغت قيمة P0.098 و0.122 و0.135 و0.708 على التوالي.



الشكل 31: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا القاتلة الطبيعية +CD49b في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد FITC-antimouse CD49b وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على اختبار التحدي.

5- تغيرات النسبة المئوية لأعداد البالعات $CD11b^+$:

يبين الشكل 32 والشكل 33 التغيرات في أعداد البالعات في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة بعد إجراء اختبار التحدي.



الشكل 32: متوسط النسبة المئوية لأعداد البالعات مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6و8 أسابيع W8 على التحدي.

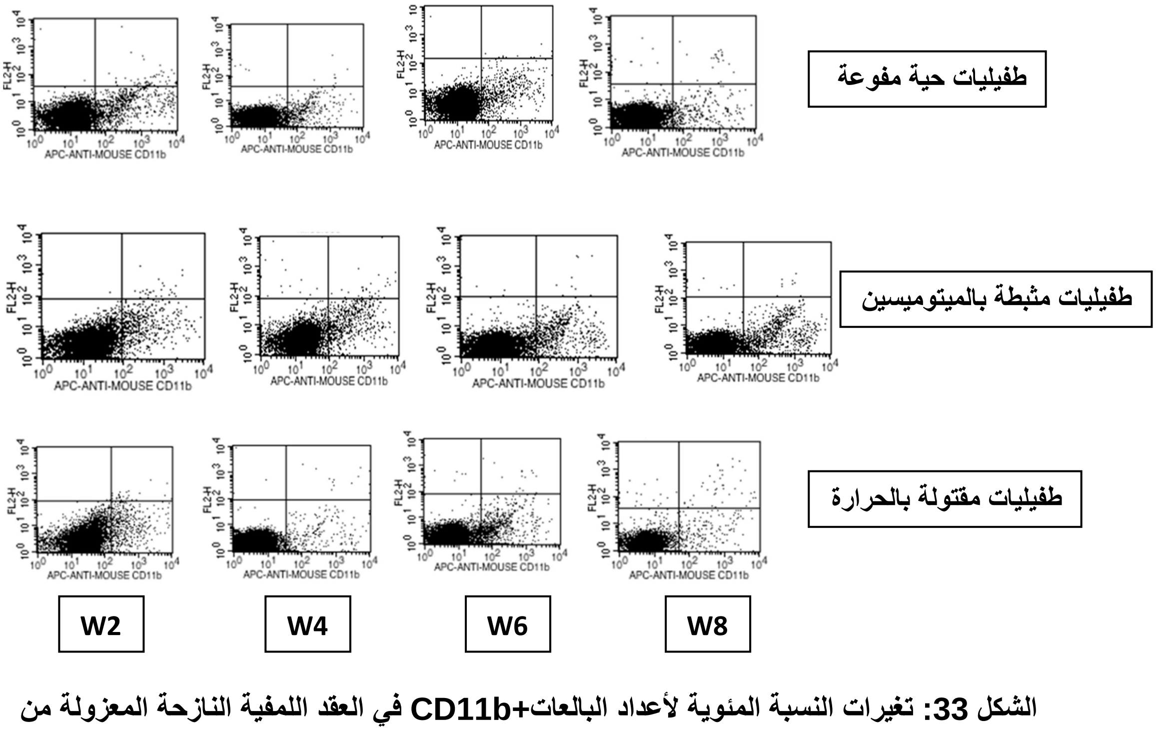
احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأول في ارتفاع النسبة المئوية لأعداد البالعات على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت النسبة بعد مرور 2 أسبوع على اختبار التحدي 603.31% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 563.03% و451.92% و407.72% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

بينما ارتفعت النسبة المئوية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 558.36% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 443.84% و322.63% و306.71% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فارتفعت النسبة المئوية لتبلغ 569.15% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 454.25% و334.22% و310.82% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

وكان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد البالعات بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0012 و0.00072 و0.00059 و0.00024 على التوالي. كذلك كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد البالعات بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائيةحيث بلغت قيمة P0.0093 و0.0032 و0.00031 و0.000005 على التوالي. .

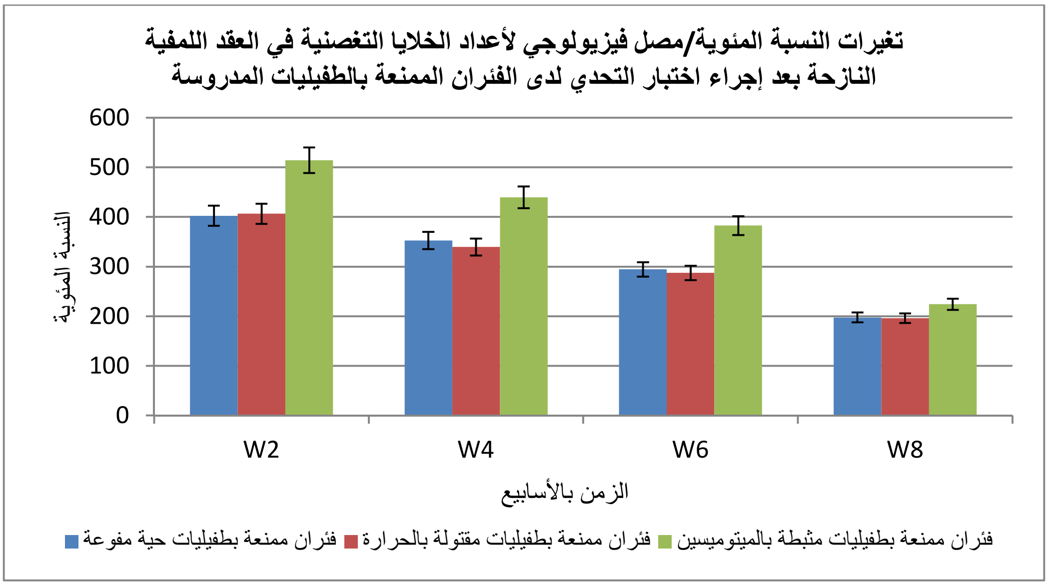
بينما كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد البالعات لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية حيث بلغت قيمة P0.144 و0.163 و0.267 و0.164 على التوالي.



الشكل 33: تغيرات النسبة المئوية لأعداد البالعات+CD11b في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD11b وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على اختبار التحدي.

6- تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية $CD11c^+$:

يبين الشكل 34 والشكل 35 التغيرات في أعداد الخلايا التغصنية في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة بعد إجراء اختبار التحدي.



الشكل 34: متوسط النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية مقارنة مع الفئران الشاهدة الممنعة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على التحدي.

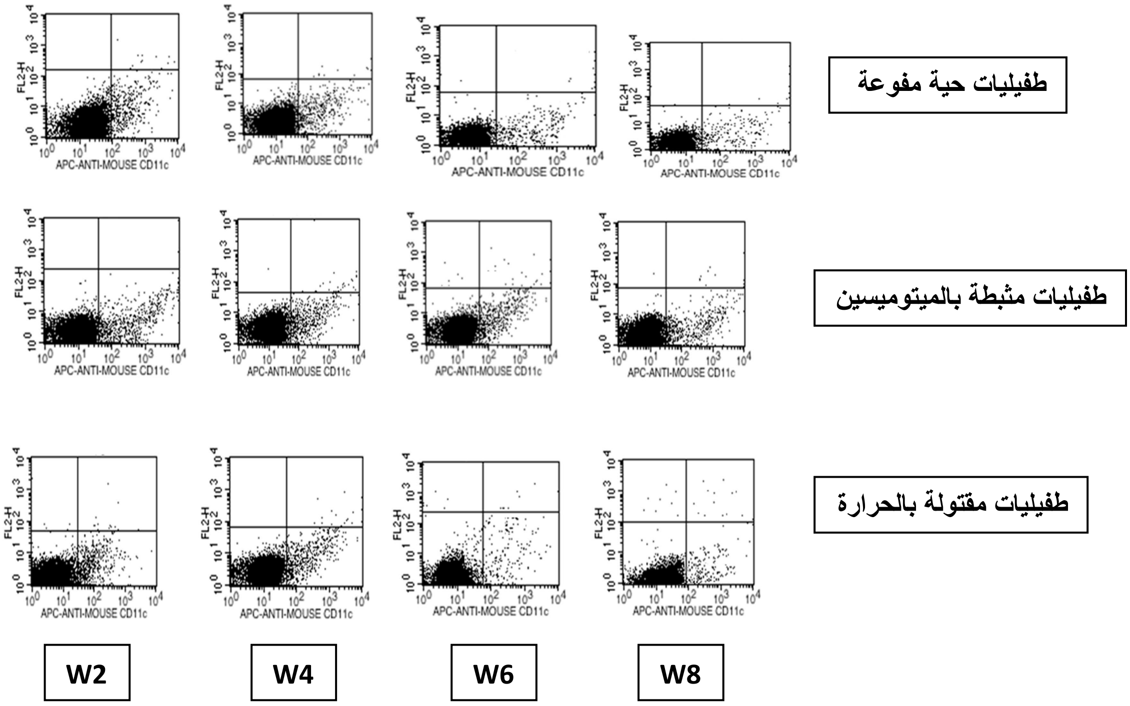
احتلت مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين المرتبة الأول في ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي حيث بلغت النسبة بعد مرور 2 أسبوع على اختبار التحدي 514.06% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 439.57% و382.69% و223.96% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

بينما ارتفعت النسبة المئوية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بنسبة 406.5% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 339.33% و287.23% و195.98% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فارتفعت النسبة المئوية لتبلغ 402.4% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. ثم انخفضت النسبة السابقة بعد ذلك إلى 352.53% و294.29% و197.33% مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي بعد مرور 4 أسابيع و6 أسابيع و8 أسابيع على التوالي.

وكان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0007 و0.00105 و0.0021 و0.0072 على التوالي. كذلك كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.00018 و0.0052 و0.0027 و0.0077 على التوالي.

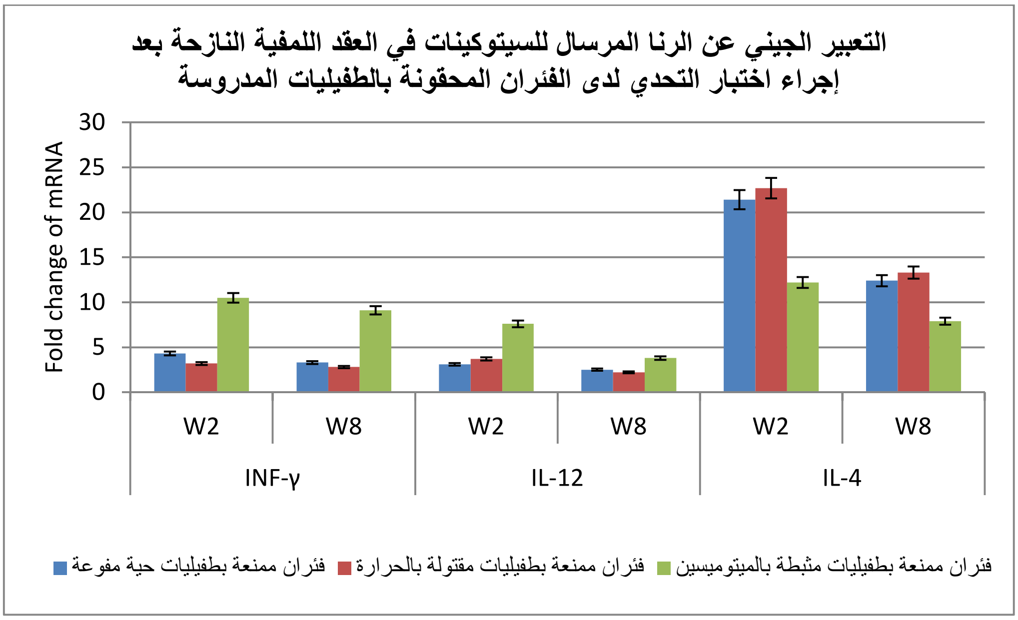
بينما كان ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة على مدى الأسابيع الثمانية حيث بلغت قيمة P0.101 و0.126 و0.067 و0.808 على التوالي.



الشكل 35: تغيرات النسبة المئوية لأعداد الخلايا التغصنية+CD11c في العقد اللمفية النازحة المعزولة من الفئران Balb\c الممنعة بطفيليات الليشمانية المداريةالحية المفوعة أو المقتولة بالحرارة أو المثبطة بالميتوميسين، باستخدام الضدد APC-antimouse CD11c وتقنية flowcytometry وذلك بعد مرور أسبوعين W2 و4 أسابيع W4 و6 أسابيع W6 و8 أسابيع W8 على اختبار التحدي.

ب- تغيرات التعبير الجيني عن السيتوكينات في العقد اللمفية النازحة بعد إجراء اختبار التحدي:

أدى تطبيق اختبار التحدي إلى حدوث تغيير في التعبير عن السيتوكينات في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بأنواع مختلفة من الطفيليات، ويلخص الشكل 30 التغيرات التي قمنا بتسجيلها في هذه التجربة.



الشكل 36: التعبير الجيني عن الرنا المرسال للسيتوكينات في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بأنواع مختلفة من الطفيليات بعد مرور أسبوعين W2 وثمانية أسابيع W8 على التحدي.

1- تغيرات التعبير الجيني عن الـ IFN-γعند الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة:

أدى تطبيق اختبار التحدي لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة إلى انخفاض في التعبير الجيني عن جين IFN-γ. فقد انخفضت لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين من 16.7 ضعفاً فأصبحت بمقدار 10.5 و9.1 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة فقد انخفضت التعبير الجيني عن جين IFN-γ من 13 ضعفاً فأصبحت بمقدار 3.2 و2.8 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيععلى اختبار التحديعلى التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فقد انخفض التعبير الجيني من 4.7 ضعفاً فأصبحت بمقدار 4.3 و3.3 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي.

وكان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IFN-γ بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.001 و0.000004 على التوالي. كذلك كان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IFN-γ بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة

الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0014 و0.00089 على التوالي.

بينما كان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IFN-γ لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي حيث بلغت قيمة P0.174 و0.062 على التوالي.

2- تغيرات التعبير الجيني عن الـ IL-12 عند الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة:

أدى تطبيق اختبار التحدي لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة إلى انخفاض في التعبير الجيني عن جين IL-12. فقد انخفضت لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين من 10.8 ضعفاً فأصبحت بمقدار 7.6 و3.8 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيععلى اختبار التحديعلى التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة فقد انخفضت التعبير الجيني عن جين IL-12 من 7.7 ضعفاً فأصبحت بمقدار 3.7 و2.2 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فقد انخفضت التعبير الجيني من 3.9 ضعفاً فأصبحت بمقدار 3.1 و2.5 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي.

وكان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-12 بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.001 و0.000004 على التوالي. كذلك كان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-12 بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي ذو دلالة إحصائيةحيث بلغت قيمة P0.0014 و0.00089 على التوالي.

بينما كان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-12 لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة

بالطفيليات المقتولة بالحرارة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.371 و0.062على التوالي.

3- تغيرات التعبير الجيني عن الـ IL-4 عند الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة:

أدى تطبيق اختبار التحدي لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المدروسة إلى ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-4. فقد ارتفعت لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين من 6.2 ضعفاً فأصبحت بمقدار 12.2 ومن ثم انخفضت إلى 7.9 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة فقد ارتفعت التعبير الجيني عن جين IL-4 من 9 أضعاف فأصبحت بمقدار 22.7 ومن ثم انخفضت إلى 13.3 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي.

أما مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة فقد ارتفعت التعبير الجيني عن جين IL-4 من 20.5 أضعاف فأصبحت بمقدار 21.4 ومن ثم انخفضت إلى 12.4 ضعفاً بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي.

وكان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-4 بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.049 و0.000004 على التوالي. كذلك كان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-4 بين مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P0.0014 و0.00089 على التوالي.

بينما كان ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-4 لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بعد مرور أسبوعين و8 أسابيع على اختبار التحدي على التوالي حيث بلغت قيمة P0.371 و0.062 على التوالي.

6- المناقشة Discussion

تلعب المناعة المتواسطة بالخلايا اللمفية T دوراً هاماً في السيطرة على تكاثر الطفيلي كون طفيليات الليشمانية هي طفيليات داخل خلوية مجبرة. تشمل الخلايا المناعية التي تساهم في التحكم بطفيليات الليشمانية كل من البالعات الكبيرة macrophages، والخلاياالتغصنية dendritic cells (DCs)، والخلايا القاتلة الطبيعية natural killer (NK)، والخلايا التائية السامة +CD8 والخلايا التائية المساعدة +CD4، بالإضافة إلى ما سبق، تساهم بعض السيتوكينات في الرد الفعل المناعي السابق مثل IFN-γ وIL-12، وجزيئات أوكسيد النتريك NO. وتشكل مجتمعة مفتاحا لاستجابة المناعية الفعالة تجاه طفيليات الليشمانية[120].

تقسم الخلايا التائية المساعدة إلى تحت مجموعتين وذلك بناء على السيتوكينات المنتجة من خلايا Th1وخلايا Th2. يؤدي الـIL-12 المنتج من الخلايا التغصنية إلى تفعيل الخلايا نمط Th1 لتفرز كل من الـIFN-γ وIL-2 وTNF-α، التي تزيد من قدرة البالعات على قتل الطفيلي الموجود داخلها وذلك من خلال إنتاج مواد كيميائية سامة للطفيلي مثل أوكسيد النتريك No ومستقلبات الأوكسجين السامة وكذلك تفعل الخلايا البائية لإفراز أضداد من نمط IgG2a. أما بالنسبة للخلايا التائية من نمط Th2 فيتم تحريضها من قبل IL-4 المنتج من الخلايا التغصنية مما يؤدي إلى إنتاج سيتوكينات عديدة من أهمها IL-4، التي تثبط تشكيل NO داخل البالعات وبالتالي تثبط قدرة البالعات على قتل الطفيليات والتخلص منها، ويؤدي تحريضها إلى تفعيل الخلايا البائية لإفراز أضداد من نمط IgM وIgE وIgG4 وIgG1. وبالتالي ترتبط الاستجابة المناعية الفعالة تجاه طفيليات الليشمانية على تفعيل خلايا من النمط Th1 مما يؤدي إلى مناعة وقائية، ويؤدي تفعيل خلايا من النمط Th2 إلى ظهور الإصابة والتظاهرات المرضية. وبالتالي يتطلب فعالية اللقاح وجوب تحديد نمط الاستجابة المناعية Th1 أو Th2[121].

بينت داليا العموري وزملاؤها عام 2010[137]أن طفيليات لليشماينة المثبطة بالميتوميسين، مع IL-12 كعامل مساعد، تؤدي إلى إنتاج الانترفيرون غاما في الدم المحيطي. وبالتالي ونظراً لأهمية ما سبق من حيث السماح باستخدام الليشماينة المثبطة بالميتوميسين كلقاح فقد قمنا في هذه الدراسة بهدف الوصول إلى فهم أعمق لرد الفعل المناعي تجاه طفيليات الليشمانية المثبطة بالميتوميسين من خلال دراسة التغيرات على الخلايا المناعية والتعبير الجيني عن الرنا المرسال للسيتوكينات (IL-12 وIL-4 وIFN-γ) الناجمة على مستوى العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الملقحة بهذه الطفيليات.

لقد أظهرت دراستنا أن الميتوميسين يثبط انقسام الطفيليات المدروسة بتركيز يتوافق مع تركيز الميتوميسين المستخدم في تثبيط تكاثر طفيليات الليشمانية في دراسة العموري وزملاؤها[137]. لم تشر الدراسات إلى أي بحث استخدم الطفيليات المثبطة الانقسام بالميتوميسين في التلقيح مما يكسب نتائج هذا البحث أهمية إضافية.

أدى حقن الفئران BALB/C بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة إلى ظهور إصابة جلدية بعد 4 أسابيع من الحقن وترافق ذلك مع ظهور الطفيليات في مكان الإصابة وفي العقد اللمفية النازحة. وتوافقت نتائجنا مع نتائج دراستي Hamid Mahmoudzadeh-Niknam في إيران عام 2004[122] و2007[123] ودراسة Mohammed Kadir في العراق عام 2006[124] الذين بينوا أن حقن الفئران BALB/C بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة إلى ظهور إصابات جلدية بعد فترة تراوحت 3 أسابيع وظهور الطفيليات في مكان الإصابة والعقد اللمفية النازحة.

هذا وبين التنميط المناعي للخلايا المناعية المعزولة من العقد اللمفية النازحة بتقنية الجريان الخلوي ارتفاع النسبة المئوية وبفارق يعتد به إحصائياً لأعداد الخلايا التائية المساعدة والخلايا التائية السامة والخلايا البائية والقاتلة الطبيعية والخلايا التغصنية والبالعات مقارنة بالفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي. مما يشيرإلى حدوث استجابة مناعية لعبت فيها طفيليات الليشمانية دور المحفز المناعي.

تعتبر الخلايا التغصنية والبالعات من خلايا المناعة الخلقية innate immunityومن الخلايا المقدمة للمستضد. تهاجر هذه الخلايا بعد قيامها بالتقاط الطفيلي من مكان الإصابة لتقدم المستضدات إلى الخلايا التائية في العقد اللمفية النازحة مما يؤدي إلى تفعيل الخلايا التائية وتكاثرها للقيام بالاستجابة المناعية المناسبة. ويفسر ما سبق ارتفاع أعداد الخلايا التغصنية والبالعات في العقد اللمفية النازحة بعد حقن الفئران بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة، وقد توافقت هذه النتيجة مع نتيجة Eric Muraille وزملاؤه عام 2003[39].

ويفسر ما سبق أيضاً ارتفاع النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ والخلايا التائية السامة $CD3^+CD8^+$ والخلايا البائية $CD19^+$ في العقد اللمفية النازحة مما يشيرإلى حدوث استجابة مناعية خلوية وخلطية في العقد اللمفية النازحة.

تعتبر الخلايا القاتلة الطبيعية من خلايا المناعة الخلقية والتي تستجيب بشكل مبكر بعد الخمج. تنتقل من الدم المحيطي إلى العقد اللمفية لتفرز الـ IFN-γ بعدما يتم تفعيلها بواسطة IL-12 المفرز من الخلايا التغصنية أو بواسطة IL-2 المفرز من الخلايا التائية الفعالة في

العقد اللمفية[125]. وقد توافقت هذه النتيجة مع نتيجة Franck Bihl وزملاؤه عام 2010[126] ودراسة Marc Bajénoff عام 2006[127] في زيادة أعداد الخلايا القاتلة الطبيعية في العقد اللمفية النازحة بعد حقن الفئران BALB/C بطفيليات الليشمانية الكبرى.
قمنا بدراسة التعبير الجيني عن الرنا المرسال لكل من IFN-γ المسؤول عن شفاء الإصابة الجلدية، وIL-4 المتهم الأول بتطور هذه الإصابات، وIL-12المسؤول الأساسي عن تمايز الخلايا التائية الساذجة وتحولها إلى خلايا تائية فعالة من النمط Th1 وبالتالي تزويد الفئران بالمقاومة للإصابة. بينت نتائجنا حدوث ارتفاع بشكل يعتد به التعبير الجيني عن جين IL-4 مقارنة مع المجموعة الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وكذلك ارتفاع في التعبير الجيني عن جين IL-12 وIFN-γ مقارنة مع المجموعة الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي في العقد اللمفية النازحة. ويشير ذلك إلى وجود استجابة مناعية خلوية مختلطة يغلب عليها استجابة من النمط Th2 بسبب القيم المرتفعة من التعبير الجيني عن جين IL-4 وتتوافق هذه النتيجة مع اختيار نوع الفئران BALB/C وهي فئران حساسة للإصابة بداء الليشمانية حقنت بالطفيليات المفوعة بدون أي مادة مساعدة محرضة لرد الفعل المناعي وبالتالي يعتبر ظهور استجابة مناعية من النمط Th2 أمراً طبيعياً في هذه الحالة.
لم يؤد حقن الفئران بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين أو بالطفيليات المقتولة بالحرارة إلى ظهور أية إصابة جلدية وحمل للطفيلي في مكان الإصابة والعقد اللمفية النازحة بعد 4 أسابيع. وبينت نتائج التنميط المناعي للخلايا المناعية المعزولة من العقد اللمفية النازحة زيادة النسبة المئوية وبفارق يعتد به إحصائياً لأعداد الخلايا التائية المساعدة والخلايا التائية السامة والخلايا البائية والقاتلة الطبيعية والخلايا التغصنية والبالعات بالمقارنة مع كل من المجموعة الشاهدة والمجموعة الملقحة بطفيليات الليشمانية المداريةالحية المفوعة مما يدل على حدوث استجابة مناعية خلوية وخلطية. وأظهرت دراستنا ارتفاع التعبير الجيني عن جين IL-12 وIFN-γ في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وبالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً بالمقارنة مع كل من المجموعة الشاهدة والمجموعة الملقحة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة. ويفسر ارتفاع التعبير الجيني عن جين IFN-γ في مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة أكثر من مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات حية مفوعة إلى زيادة أعداد الخلايا التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ والخلايا التائية السامة $CD3^+CD8^+$ والخلايا القاتلة الطبيعية CD49b،

والتي تعتبر مصادر للـ IFN-γ، أكثر من مجموعة الفئران الممنعةبطفيليات الليشمانية المداريةحية مفوعة وبفارق يعتد به إحصائياً.

ويعود ارتفاع التعبير الجيني عن جين IL-12 مقارنة مع مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية حية مفوعة وبفارق يعتد به إحصائياً إلى زيادة أعداد الخلايا التغصنية CD11c والبالعات CD11b التي تشكل مصادر للـ IL-12. لكن بما أن طفيليات الليشمانية تثبط إنتاج IL-12 من البالعات[128] يفترض أن تكون الخلايا التغصنية هي مصدر IL-12. وتتوافق هذه النتيجة مع دراسة Faihaa Hkima وزملاؤها[129]التي بينت قدرة طفيليات الليشمانية الكبرى على تفعيل الخلايا التغصنية في الزجاج حيث ترافق هذا التفعيل مع إنتاج IL-12.

كما سجل ارتفاع بسيط في التعبير الجيني عن جين IL-4 في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وبالطفيليات المقتولة بالحرارة بالمقارنة مع مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات الحية المفوعة وبفارق يعتد به إحصائياً.

يشيرارتفاع التعبير الجيني عن جين IFN-γ، والقيم المنخفضة من التعبير الجيني عن جين IL-4، إلى وجود استجابة مناعية خلوية مختلطة يغلب عليها استجابة من النمط Th1 لأن نسبة IFN-γ على IL-4 يساوي 2.7 بالنسبة لمجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ويساوي 1.8 بالنسبة لمجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وهذا ما يفسر عدم ظهور الإصابات الجلدية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة.

لقد توافقت نتائجنا مع دراسة Mohammed Kadir وزملاؤه في العراق عام 2006 التي بينت عدم ظهور إصابة جلدية وطفيليات في مكان الحقن عند حقن الفئران BALB/C بطفيليات الليشمانية المدارية المقتولة بالحرارة الرطبة[124]. كما أظهرت دراسة Elizabith وزملاؤه في عام 2002[130] ودراسة Joushaa وزملاؤه في عام 2009[131] تحريض طفيليات الليشمانية الكبرى المقتولة بالحرارة الرطبة استجابة مناعية من نمط Th1.

في الحقيقة لم يشر الأدب الطبي إلى أي دراسات استخدمت طفيليات مثبطة الانقسام بالميتوميسين.

لكن يبقى السؤال هل تترافق ردود الفعل المناعية السابقة مع تشكل مناعة تقي الفئران من الإصابة مرة أخرى بالطفيلي، وهذا ما قادنا إلى تقييم فعالية اللقاحات السابقة حيث تم إجراء اختبار التحدي، بحقن 10^6 طفيليات حية مفوعة، للفئران الملقحة بالطفيليات السابقة.

أ- مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو بالطفيليات المقتولة بالحرارة:

ظهرت الإصابة الجلدية وحمل الطفيليات في مكان الحقن بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو بطفيليات الليشمانية المداريةالحية المفوعة وبفارق لا يعتد به إحصائياً. ثم بدأ حجم الإصابة الجلدية بالتزايد بعد 4 و6 و8 أسابيع بعد إجراء اختبار التحدي والذي ترافق مع زيادة حمل الطفيلي في مكان الإصابة لدى المجموعتين السابقتين وبفارق لا يعتد به إحصائياً. مما يدل على عدم السيطرة على تكاثر الطفيليات الحية المفوعة الممنعة في اختبار التحدي في مكان الإصابة. أما بالنسبة لنتائج دراسة حمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة ظهرت الطفيليات لدى المجموعتين السابقتين وبفارق لا يعتد به إحصائياً ثم بدأ حمل الطفيليات بالتراجع على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي وبفارق لا يعتد به إحصائياً بين مجموعة الفئران الملقحة بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو مجموعة الفئران الملقحة بالطفيليات الحية المفوعة. مما يدل على السيطرة على تكاثر الطفيليات الحية المفوعة في العقد اللمفية النازحة.

بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي ازدادت النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ في العقد اللمفية النازحة مقارنة الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وبفارق يعتد به إحصائياً وأكثر مما هو عليه بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة وبفارق لا يعتد به إحصائياً. وقد يفسر ذلك بأن اللمفاويات التائية المساعدة قد تعرفت مسبقاً على مستضدات طفيلي الليشمانية وعند إجراء اختبار التحدي تعرفت بسرعة على مستضدات الطفيلي فتكاثرت مما أدى إلى ازدياد أعدادها في العقد اللمفية النازحة. أما بقية الخلايا المناعية ازدادت النسبة المئوية لأعدادها في العقد اللمفية النازحة مقارنة مع الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وبفارق يعتد به إحصائياً ولكن أقل مما هو عليه بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو بطفيليات الليشمانية المداريةالحية المفوعة وبفارق يعتد به إحصائياً.

وترافق مع زيادة النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ ونقصان النسبة المئوية لأعداد بقية الخلايا المناعية نقص في التعبير الجيني عن جين IL-12 و$IFN-\gamma$ مقارنة مع قيمها بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة وبفارق يعتد به إحصائياً، وزيادة التعبير الجيني عن جين IL-4 مقارنة مع قيمها بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة وبفارق يعتد به إحصائياً مما يشير إلى وجود استجابة مناعية خلوية مختلطة يغلب عليها استجابة من النمط Th2 لأن نسبة $IFN-\gamma$ على IL-4 يساوي 0.14 بالنسبة لمجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة و0.21 بالنسبة لمجموعة الفئرانالممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة وهذا ما يفسر ظهور الإصابة الجلدية والطفيليات في مكان الإصابة والعقد اللمفية النازحة لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة. ويمكن تفسير ظهور الإصابة الجلدية لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة بأن المناعة لم تتعرف على كامل مستضدات طفيليات الليشمانية وقد يعود ذلك إلى تغير في بنية البروتينات أثناء تعرضها للحرارة وبالتالي لم تستطع الطفيليات المقتولة بالحرارة من تأمين مناعة واقية ضد طفيليات الليشمانية الحية المفوعة.

وبعد 4 و6 و8 أسابيع من إجراء اختبار التحدي بدأت النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ واللمفاويات التائية السامة $CD3^+CD8^+$ بالتناقص وقد يفسر ذلك بتعرض هذه الخلايا أو هجرة الخلايا التائية الفاعلة من العقد اللمفية النازحة إلى مكان الإصابة[46]. لكن بقيت النسبة المئوية في الأسبوع 8 بعد إجراء اختبار التحدي أعلى من الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وبفارق يعتد به إحصائياً مما يدل على استمرار الاستجابة المناعية الخلوية. كذلك تناقصت النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات البائية $CD19^+$ وقد يفسر ذلك بتعرض جزء من هذه الخلايا للاستموات أو تحول جزء منها إلى خلايا بلاسمية منتجة للأضداد $CD27^+$ $CD138^+$. لكن بقيت النسبة المئوية في الأسبوع 8 بعد إجراء اختبار التحدي أعلى من الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وبفارق يعتد به إحصائياً مما يدل على استمرار الاستجابة المناعية الخلطية. وكذلك تناقصت النسبة المئوية لأعداد البالعات والخلايا التغصنية والخلايا القاتلة الطبيعية وقد يفسر ذلك بتعرض هذه الخلايا للاستموات. لكن بقيت النسبة المئوية في الأسبوع 8 بعد إجراء اختبار التحدي

أعلى من الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وبفارق يعتد به إحصائياً وقد يفسر استمرار الرد الفعل المناعي الخلقي بقاء عدد الطفيليات الحية المفوعة في مكان الإصابة مرتفعاً على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي وبالتالي استمرار الخلايا التغصنية والبالعات بنقل الطفيلي إلى العقد اللمفية النازحة وتفعيل الخلايا القاتلة الطبيعية وتلعب هذه الخلايا أيضاً دوراً في ضمان استمرار وجود الخلايا التائية الذاكرة في العقد اللمفية النازحة[92].

ومع تناقص النسبة المئوية لأعداد الخلايا المناعية في العقد اللمفية النازحة في الأسبوع الثامن بعد إجراء اختبار التحدي مقارنة مع نسبها في الأسبوع الثاني بعد إجراء اختبار التحدي وبفارق يعتد به إحصائياً تناقص التعبير الجيني عن جين IL-12 وIFN-γ مقارنة مع قيمها في الأسبوع الثاني بعد إجراء اختبار التحدي وبفارق يعتد به إحصائياً ولكن قيمها أعلى من مجموعة الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وبفارق يعتد به إحصائياً، وتناقص في التعبير الجيني عن. ويدل ذلك على استمرار الاستجابة المناعية من النمط Th2 في الأسبوع الثامن بعد إجراء اختبار التحدي وهذا ما يفسر بقاء استمرار الإصابة الجلدية وبقاء حمل الطفيليات في مكان الإصابة مرتفعاً.

ب- تحدي مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين:

ظهرت الإصابة الجلدية والطفيليات في مكان الحقن والعقد اللمفية النازحة، لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين، بعد أسبوعين من إجراء اختبارالتحدي وترافق ذلك مع ارتفاع عدد الطفيليات في مكان الإصابة والعقد. ثم بدأ حجم الآفات الجلدية بالتزايد بعد مرور 4 و6 و8 أسابيع من اختبار التحدي وترافق ذلك مع استمرار الارتفاع لعدد الطفيليات في مكان الإصابة لكنه يبقى في جميع الأسابيع أقل وبفارق يعتد به إحصائياً من عدد الطفيليات مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المداريةالحية المفوعة أو الفئران الممنعةبالطفيليات المقتولة بالحرارة. وبالتالي لم يسمح التلقيح بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين بالسيطرة على تكاثر الطفيليات الحية المفوعة الممنعة في اختبار التحدي في مكان الإصابة. علماً أن تقييم حمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة لدى الفئران السابقة أظهرت انخفاضاً تدريجياً وبفارق يعتد به إحصائياً في عدد الطفيليات الحية المفوعة على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي لدى مجموعة الفئران الملقحة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين مقارنة مع الفئران الملقحة بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو الفئران

الملقحة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة. يشير ما سبق إلى أن التلقيح بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين ترافق مع السيطرة جزئياً على تكاثر الطفيليات الحية المفوعة في العقد اللمفية النازحة، ويمكن أن يعود ذلك لقدرة الخلايا التائية الناظمة T reg cellsفي الأدمة على تثبيط قدرة الخلايا التائية الفاعلة لإزالة الطفيليات من مكان الإصابة[132] أو باعتبار الخلايا التغصنية والبالعات مضيف للطفيلي في العضوية فترافق مع انخفاض أعدادها انخفاض في حمل الطفيلي أيضاً في العقد اللمفية النازحة[133].

بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي ازدادت النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ في العقد اللمفية النازحة مقارنة الفئران الشاهدة المحقونة بالمصل الفيزيولوجي وبفارق يعتد به إحصائياً وأكثر مما هو عليه بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وبفارق يعتد به إحصائياً. كما وجدنا زيادة النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ في العقد اللمفية النازحة مقارنة مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً. أما بقية الخلايا المناعية ازدادت النسبة المئوية لأعدادها في العقد اللمفية النازحة مقارنة معمجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً ولكن أقل مما هو عليه بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وبفارق يعتد به إحصائياً.

ترافق ارتفاع النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ ونقصان النسبة المئوية لأعداد الخلايا التائية السامة والخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا التغصنية، مع انخفاض في التعبير الجيني عن جين IL-12 و$IFN\text{-}\gamma$ مقارنة مع قيمها بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وبفارق يعتد به إحصائياً ولكن قيمها أعلى من مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أومجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً، وزيادة التعبير الجيني عن جين IL-4 مقارنة مع قيمها بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وبفارق يعتد به إحصائياً ولكن قيمها أقل من مجموعة الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي أو مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً مما يشير إلى وجود استجابة مناعية خلوية مختلطة يغلب عليها استجابة من النمط Th2

لأن نسبة IFN-γ على IL-4 يساوي 1.16 وهذا ما يفسر ظهور الإصابة الجلدية والطفيليات في مكان الإصابة والعقد اللمفية النازحة لدى مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين.

وبعد 4 و6 و8 أسابيع من إجراء اختبار التحدي بدأت النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات التائية المساعدة $CD3^+CD4^+$ واللمفاويات التائية السامة $CD3^+CD8^+$ بالتناقص وقد يفسر ذلك بتعرض هذه الخلايا للاستموات أو هجرة الخلايا التائية الفاعلة من العقد اللمفية النازحة إلى مكان الإصابة[46]. لكن بقيت النسبة المئوية في الأسبوع 8 بعد إجراء اختبار التحدي أعلى من الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي أو مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً مما يدل على استمرار الاستجابة المناعية الخلوية. كذلك تناقصت النسبة المئوية لأعداد اللمفاويات البائية $CD19^+$ وقد يفسر ذلك بتعرض جزء من هذه الخلايا للاستموات أو تحول جزء منها إلى خلايا بلاسمية منتجة للأضداد $CD27^+$ $CD138^+$. لكن بقيت النسبة المئوية في الأسبوع 8 بعد إجراء اختبار التحدي أعلى من الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي أو مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً مما يدل على استمرار الاستجابة المناعية الخلطية. وكذلك تناقصت النسبة المئوية لأعداد البالعات والخلايا التغصنية والخلايا القاتلة الطبيعية وقد يفسر ذلك بتعرض هذه الخلايا للاستموات. لكن بقيت النسبة المئوية في الأسبوع 8 بعد إجراء اختبار التحدي أعلى من الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي أو مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً وقد يفسر استمرار الرد الفعل المناعي الخلقي بقاء عدد الطفيليات الحية المفوعة في مكان الإصابة مرتفعاً على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي وبالتالي استمرار الخلايا التغصنية والبالعات بنقل الطفيلي إلى العقد اللمفية النازحة وتفعيل الخلايا القاتلة الطبيعية وتلعب هذه الخلايا أيضاً دوراً في ضمان استمرار وجود الخلايا التائية الذاكرة في العقد اللمفية النازحة[92].

ومع تناقص النسبة المئوية لأعداد الخلايا المناعية في العقد اللمفية النازحة في الأسبوع الثامن بعد إجراء اختبار التحدي مقارنة مع نسبها في الأسبوع الثاني بعد إجراء اختبار التحدي وبفارق يعتد به إحصائياً تناقص التعبير الجيني عن جين IL-12 وIFN-γ مقارنة

مع قيمها في الأسبوع الثاني بعد إجراء اختبار التحدي وبفارق يعتد به إحصائياً ولكن قيمها أعلى من مجموعة الفئران المحقونة بالمصل الفيزيولوجي أو مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً، وتناقص في التعبير الجيني عن جين IL-4 مقارنة مع قيمها في الأسبوع الثاني بعد إجراء اختبار التحدي وبفارق يعتد به إحصائياً ولكن قيمها أقل من مجموعة الفئران الممنعة بطفيليات الليشمانية المدارية الحية المفوعة أو مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة وبفارق يعتد به إحصائياً. ويدل ذلك على استمرار الاستجابة المناعية من النمط Th2 في الأسبوع الثامن بعد إجراء اختبار التحدي وهذا ما يفسر بقاء استمرار الإصابة الجلدية وبقاء حمل الطفيليات في مكان الإصابة مرتفعاً.

7- الاستنتاجات Conclusions

1-حرضت طفيليات الليشمانية المدارية المثبطة الانقسام بدون استخدام أية مواد مساعدة مناعة جزئية عند الفئران الحساسة BALB/C، ترافقت مع تناقص في حجم وأعداد الطفيليات في الآفة الجلدية، مما يعطي مؤشرات إيجابية مشجعة لاستمرار العمل عليها للوصول إلى لقاح مأمون وفعال.

2-عدم قدرة طفيلياتالليشمانية المدارية المقتولة بالحرارة بدون استخدام أية مواد مساعدة على حماية الفئران BALB/C من الإصابة بداء الليشمانية الجلدية.

8- المقترحات والتوصيات Suggestions and Recommendations

1- محاولة تحديد مصدر INF-γ وذلك لتحديد ما إذا كانت الخلايا التائية المساعدة أو الخلايا التائية السامة أو الخلايا القاتلة الطبيعية هي المصدر.

2- تعميق دراسة الاستجابة المناعية الخلوية، وذلك بتعيين قيم السيتوكينات (IL-4 و IL-12 وINF-γ) في المزارع الخلوية للخلايا T، بعد تحريضها بمستضدات الليشمانية المستخدمة في التلقيح.

3- مقايسة كل من السيتوكينات (IL-4 وIL-12 وINF-γ) في المصل.

4- تحديد نمط تحت صف الـ IgG في المصل.

5- متابعة الدراسة على طفيليات الليشمانية المدارية المثبطة بالميتوميسين بمشاركة أحد العوامل المساعدة.

6- استخدام أنواع أخرى من طفيليات الليشمانية المثبطة بالميتوميسين لاستقصاء إمكانية الحصول على نتائج مشابهة.

9- الملخص باللغتين العربية والانكليزية:

الملخص باللغة العربية

تعد سورية من المناطق الموبوءة بداء الليشمانيات الجلدية. ونظراً لعدم وجود دواء نوعي فعال وآمن، تكتسب الوقاية أهمية كبيرة للحد من انتشار هذا الداء. لهذا هدفت دراستنا إلى تحري قدرة طفيليات الليشمانية المثبطة الانقسام بالميتوميسين-c على توليد استجابة مناعية تم تحديدها من خلال دراسة حجم الأذيات الجلدية وحمل الطفيلي في مكان الإصابة والعقد اللمفية النازحة وتنميط التجمعات الخلوية بتقنية flowcytometry ودراسة التعبير الجيني عن السيتوكينات في العقد اللمفية النازحة باستعمال Real-time PCR لدى الفئران الممنعة بـ10^4 من الطفيليات المثبطة الانقسام بالميتوميسين أو 10^4 من الطفيليات المقتولة بالحرارة أو 10^4 من الطفيليات الحية المفوعة. بعد 4 أسابيع من تمنيع الفئران تم إجراء اختبار التحدي، بحقن 10^6 طفيليات حية مفوعة، وتم إجراء الاختبارات السابقة بعد مرور 2 و4 و6 و8 أسابيع على إجراء اختبار التحدي. أظهرت نتائجنا بعد 4 أسابيع من التمنيع ظهور الإصابة الجلدية والطفيليات في مكان الإصابة والعقد اللمفية النازحة لدى المجموعة الممنعة بالطفيليات الحية المفوعة بينما لم تظهر الإصابة الجلدية والطفيليات في مكان الإصابة والعقد اللمفية النازحة لدى المجموعة الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين أو الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة. وأظهرت نتائجنا زيادة أعداد الخلايا التائية المساعدة والخلايا التائية السامة والخلايا البائية والقاتلة الطبيعية والخلايا التغصنية والبالعات وزيادة التعبير الجيني عن جين IL-12 وIFN-γ لدى المجموعة الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وبفارق يعتد به إحصائياً مقارنة مع مجموعة الفئران الممنعة بالطفيليات الحية المفوعة أو الممنعة بالطفيليات المقتولة بالحرارة مما يدل على تحريض الطفيليات المثبطة بالميتوميسين استجابة مناعية خلوية يغلب عليها النمطTh1. أما بعد إجراء اختبار التحدي ظهرت الإصابة والطفيليات في مكان الإصابة لدى كل مجموعات الدراسة وبدأت حجم الآفات وعدد الطفيليات بالزيادة على مدى الأسابيع الثمانية وكانت أقل لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين. كذلك ظهرت الطفيليات في العقد اللمفية النازحة وبدأ عدد الطفيليات بالتناقص على مدى الأسابيع الثمانية التالية لاختبار التحدي وكانت أقل لدى الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين. وارتفعت أعداد الخلايا التائية المساعدة والذي بدأ بالتناقص بعد اختبار التحدي وترافق ذلك مع زيادة التعبير الجيني عن جين IL-4 عند الفئران الممنعة بالطفيليات المثبطة بالميتوميسين وكان الأقل مقارنة مع المجموعات

السابقة. وانخفضت أعداد الخلايا التائية السامة والخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا التغصنية والذي بدأ بالتناقص بعد اختبار التحدي وترافق ذلك مع انخفاض التعبير الجيني عن جين IL-12 وIFN-γ ولكن أقل من التعبير الجيني عن جين IL-4 مما يدل على تحريض الطفيليات المثبطة بالميتوميسين استجابة مناعية خلوية يغلب عليها النمط Th2.

العنوان المختصر: رد الفعل المناعي تجاه الليشمانيا المثبطة بالميتوميسين. **الكلمات المفتاح**: داء الليشمانيات الجلدي ، طفيليات الليشمانية المثبطة الانقسام بالميتوميسين، الأذية الجلدية، حمل الطفيلي، التعبير الجيني، والعقد اللمفية النازحة.

الملخص باللغة الانكليزية

The Syria is considered to be endemic regions in cutaneous leishmaniasis. While there are not effective and safe drugs, the prevention is very important to stop dispersing the disease. Our study aimed to determine the capacity of mitomycin-c treated live leishmania promastigotes to produce the immunity and studying skin lesions volume and parasite load in the lesions and draining lymph nodes and immunophenotyping by flowcytometry and gene expression of mRNA for cytokines at the level of draining lymph nodes by Real-time PCR in BALB/C mice which were immunized with 10^4 mitomycin-c treated live leishmania promastigotes, or 10^4 heat- killed leishmania, or 10^4 wild type leishmania promastigotes. 4 weeks after the immunizing, mice were injected with challenge, 10^6 *L. tropica* metacyclic promastigotes, and were followed up at two weeks intervals for 8 weeks after challenge. 4 weeks after the immunizing our results revealed that mice immunized with wild type leishmania promastigotes showed lesions and parasite load in the site of injection and draining lymph nodes while those immunized with mitomycin-c treated live leishmania promastigotes or heat- killed leishmania do not show any skin lesions or parasite load in the site of injection and draining lymph nodes. our results revealed that increase numbers of helper T cells, cytotoxic T cells, B cells, natural killer cells, macrophages, and dentritic cells and increase gene expression of mRNA for IFN-γ and IL-12 in mice which were immunized with mitomycin-c treated live leishmania promastigotes comparable with mice which immunized with heat- killed leishmania or wild type leishmania promastigotes which indicated that mitomycin-c treated live leishmania promastigotes induce Th1 response. after challenge, lesions and parasite load in the site of injection showed in all groups and lesions size and parasite load began to increase at 8 weeks after challenge and were less in mice which were immunized with mitomycin-c treated live leishmania promastigotes. Beside of this, parasites showed in draining lymph nodes and parasite load began to

decrease at 8 weeks after challenge and were less in mice which were immunized with mitomycin-c treated live leishmania promastigotes. Numbers of helper T cells increased and began to decrease after challenge which associated with increase of gene expression of mRNA for IL-4 in mice which were immunized with mitomycin-c treated live leishmania promastigotes and was less comparable with mice which immunized with heat- killed leishmania or wild type leishmania promastigotes. Numbers of cytotoxic T cells, B cells, natural killer cells, macrophages, and dentritic cells decreased and began to decrease after challenge which associated with decrease of gene expression of mRNA for IFN-γ and IL-12 in mice which were immunized with mitomycin-c treated live leishmania promastigotes and was less comparable with gene expression of mRNA for IL-4 which indicated that mitomycin-c treated live leishmania promastigotes induce Th2 response.

Running title: The immune response against leishmania inhibited by mitomycin. **Keywords**: cutaneous leishmaniasis , mitomycin-c treated live leishmania promastigotes , skin lesion, parasite load, gene expression and draining lymph nodes.

References المراجع -10

1. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:581–96.

2. Oumeish Y. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin. Dermatol.* 1999;17(3):249–254.

3. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera: Psychodidae). *Bull. the. Br. Museum*. 1982;45(2):121–209.

4. Mascari1 TM, Hanafi A, Jackson RE, Ouahabi S, Ameur B. Ecological and Control Techniques for Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Associated with Rodent Reservoirs of Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7(9):1–7.

5. Neouiminer NI. Leishmaniasis in the Eastern. Mediterranean Region. *Reg. Off. East. Mediterr.* 1996;2(1):94–102.

6. Ferro C, Marín D, Góngora R, Carrasquilla MC, Trujillo JE, Rueda NK, Marín J, Valderrama-Ardila C, Alexander N, Pérez M, Munstermann LE. Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(6):1154–1178.

7. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*. 2013;58:227–50.

8. Mojtahedi Z, Clos J K-SE. Leishmania major: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp Parasitol.* 2008;119(3):422–9.

9. Jecna L, Dostalova A, Wilson R, et al. The role of surface glycoconjugates in Leishmania midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. *Parasitology*. 2013;140(8):1026–32.

10. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gelin the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. *Parasitology*. 2002;124:495–507.

11. Tracy G, Simon L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. Current Opinion in Investigational. *Drug*. 2002;3(4):1472–1478.

12. Bari A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *J. Pakistan Assoc. Dermatologists*. 2006;(16):156–162.

13. Kato H, Gomez E, Cáceres AG, Uezato H, Mimori T, Hashiguchi Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010;7(3):814–26.

14. Bern CM, Maguire JH, Jorge A. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(10):1–8.

15. Douba M, Mowakeh A, Wali A. Current status of cutaneous leishmaniasis in Aleppo, Syrian Arab Republic. *Bull. World Health Organ.* 1997;75(3):253–9.

16. Elsheik K, Eltaweel A. Epidemiology of Cutaneous leishmaniasis cases in Syria 2011. *syrian Epidemiol. Bull.* 2011.

17. Arfan B. Fissure leishmaniasis: A new variant of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Online J.* 2009;15(10).

18. Philippe M, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med. Infect. Dis.* 2007;5(3):150–8.19. Abdellatif MZ, El-mabrouk K, Ewis AA. An Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in. *Korean J Parasitol*. 2013;51(1):75–84.

20. Calvopiña M, Martinez L, Hashiguchi Y. Cutaneous leishmaniasis “chiclero’s ulcer” in subtropical Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013;89(2):195–6.

21. Grande C, Grosso M, Sul G, et al. American cutaneous leishmaniasis : clinical , epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching. *An Bras Dermatol.* 2011;86(1):55–63.

22. González U, Pinart M, Macaya A, Alvar J. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A Systematic Review Update. *PLoS One*. 2013;8(4):1–14.

23. Harrison C. Combating visceral leishmaniasis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013;12(828):1–18.

24. Laura-Isobel MC, Zhang W, Matlashewski G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathog.* 2013;9(1):1–20.

25. Boroujeni AM, Aminjavaheri M, Moshtaghian B, Momen A AZ. Reevaluating leishmanin skin test as a marker for immunity against cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Dermatology*. 2013;52(7):828–830.

26. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 2007;37(10):1097–106.

27. Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.* 2000;22(7):319–31.

28. Ritter U, Frischknecht F, Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? *Trends Parasitol.* 2009;25(11):505–10.

29. Laskay T, Zandbergen Gv, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 2008;213:183–91.

30. Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012;2(May):72.

31. Mosser DM, Springer TA, Diamond MS. Leishmania promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 1992;116(2):511–20.

32. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* 1999;112 Pt 18:2993–3002.

33. Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J. Exp. Biol.* 2009;47(6):412–23.

34. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of Leishmania major infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.* 2000;165(2):969–77.

35. Kima PE. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol.* 2008;37(10):1087–1096.

36. Guy RA, Belosevic M. Comparison of Receptors Required for Entry of Leishmania major Amastigotes into Macrophages IgG2a IgG2b. *Infect. Immun.* 1993;61(4):1553–1558.

37. Kima PE, Constant SL, Hannum L, et al. Internalization of Leishmania mexicana complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 2000;191(6):1063–8.

38. Alexander J, Russell DG. The interaction of Leishmania species with macrophages. *Adv Parasitol*. 1992;31:175–254.

39. Muraille E, Trez CD, Pajak B, et al. Amastigote Load and Cell Surface Phenotype of Infected Cells from Lesions and Lymph Nodes of Susceptible and Resistant Mice Infected with Leishmania major. *Infect Immun*. 2003;71(5):2704–2715.

40. Stebut BE, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of Leishmania major Amastigotes Results in Skin – derived Dendritic Cells : Implications for the Initiation of Anti- Leishmania Immunity. *J. Exp. Med.* 1998;188(8):1547–1552.

41. Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* 1998;(28):121–134.

42. Murphy ML, Engwerda CR, Gorak MA. B7-2 blockade enhances T cell responses to Leishmania donovani. *J. Immunol.* 1997;(159):4460–4466.

43. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1260–1265.

44. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. *J Exp Med*. 1993;178(2):567–577.

45. Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2007;29(12):671–768.

46. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, et al. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:23–45.

47. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:767–811.

48. Barral-Netto M, Badaró R, Barral A, Carvalho EM. Immunology of cutaneous leishmaniasis:the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 2007;17(2):115–22.

49. Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, et al. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fcgamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J. Exp. Med.* 2006;203(1):177–88.

50. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+ CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*. 2002;420:502–7.

51. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001;194:1497–506.

52. Patricia M, Preston D, Dumonde C. Experimental cutaneous leishmaniasis. Protective immunity in subclinical and self-healing infection in the mouse. *Clin. exp. Immunol.* 1976;23:126–138.

53. Mitchell GF, Handman E, McKenzie IF. Cutaneous leishmaniasis in mice: disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with Leishmania tropica. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1980;(58):521–532.

54. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett.* 2005;99(1):17–23.

55. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Med Microbiol.* 2007;51(2):229–42.

56. Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2006;17(75):115–30.

57. Park AY, Hondowicz B, Kopf M, Scott P. The role of IL-12 in maintaining resistance to Leishmania major. *J Immunol*. 2002;168(11):5771–5777.

58. Trez CD, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E. iNOS-Producing Inflammatory Dendritic Cells Constitute the Major Infected Cell Type during the Chronic Leishmania major Infection Phase of C57BL/6 Resistant Mice. *PLoS Pathog.* 2006;5(6):1–13.

59. Swihart K, Messmer N, Hug K, Behin R, Huang S, Giudice G, Auguet M, Louis J A. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with leishmania major but mount a polarized T. helper cell 1- type CD4+ T cell response. *Exp. Med.* 1995;181:961–971.

60. Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma- deficient mice infected with leishmania major. *J. Exp. Med.* 1994;179(4):1367–1371.

61. Sadick MD, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS LR. Cure of murine leishmaniasis with anti- interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma- independent mechanism. *J. Exp. Med.* 1990;171(1):115–127.

62. Mattner F, Padova KD, Alber G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against Leishmania major. *Infect Immun.* 1997;65(11):4378–4383.

63. De Oliveira C, Brodskyn CI. The immunobiologyof Leishmania braziliensis infection. *Front. Immunol.* 2012;3:1–9.

64. Mendes AO, Nunes EJ, Carvalho R, Nogueira RS, Bertho AL, Da-Cruz AM. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is upregulated by Leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp.Immunol.* 2009;(157):377–384.

65. Santos JL, Dias AA, Bonjardim CA, Reis LF, Teixeira SM, Horta MF. Differentia lsensitivity of C57BL/6(M-1) and BALB/c(M-2) macrophages to the stimul of IFN-gamma/LPS for the production of NO:correlation with iNOS mRNA and protein expression. 2006;26:682–688.

66. Clarisa B, Sousa P. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. 2008;26:1709—1724.

67. Dunning N. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *bio horizons*. 2009;2(1):73–83.

68. Azizi H, Taslimi Y, Najafabadi HS, Papadopoulou B, Rafati S. Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans Leishmania tarentolae. *Parasitology*. 2009;136(7):723–735.

69. Mutiso JM , Macharia JC, Gicheru MM. Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. *J. Bipmed. Res.* 2013;27(2):85–102.

70. Musa AM, Mahgoub FA, Elgawi SH, Modabber F, Elkadaru AE, et al. Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:58–63.

71. Kenney RT, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Davis KE. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 1999;163:4481–4488.

72. Mohebalia M, Khamesipourb A, Zareia Z, Hashemi-Fesharkic R. Double blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved Leishmania major vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2004;22(29-30):4097–4100.

73. De Luca PM, Mayrink W, Alvesb CR, Coutinhoa SG, Oliveiraa M. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and non-autoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary Leishmaniasis. *Vaccine*. 1999;17(9-10):1185–1179.

74. Silvestre R, Anabela C, Ali O. Live attenuated Leishmania vaccines: a potential strategic alternative. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2008;56(2):123–126.

75. RIVIER D, SHAH R, BOVAY P, MAUEL J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent Leishmania major challenge. *Parasite Immunol.* 1993;15(2):75–84.

76. Daneshvar H, Coombs GH, Hagan P, Phillips RS. Leishmania mexicana and Leishmania major: Attenuation of Wild-Type Parasites and Vaccination with the Attenuated Lines. *JID*. 2003;187:1662–1668.

77. Titus RG, Gueiros-Filho FJ, de FreitasL A, Beverley SM. Development of a safe live Leishmania vaccine line by gene replacement. *Microbiology*. 1995;92(22):10267–10271.

78. Amaral VF, Oliveira-Neto MP, Silva AJ, Pereira MS, Cupolillo E, Porrozzi R, Coutinho SG, Pirmez C, Beverley SM, Grimaldi GJ. Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed Leishmania (Leishmania) major vaccines in a rhesus monkey (Macaca mulatta) model of the human disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):1041–8.

79. Späth GF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient Leishmania major. *Science.* 2003;301(5637):1241–3.

80. Alexander J, Coombs H, Jeremy C. Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol.* 1998;161(12):6794–801.

81. Silvestre R, Santarem N, Vergnes B, Sereno D, Ouaissi A. SIR2-Deficient Leishmania infantum Induces a Defined IFN-γ/IL-10 Pattern That Correlates with Protection. *J. Immunol.* 2007;179(5):3161–3170.

82. Papadopoulou B, Breton M, Kündig C, Dumas C, Fillion I, Singh AK, Olivier M, Ouellette M. Reduced infectivity of a Leishmania donovani biopterin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun.* 2002;70(1):62–8.

83. Davoudi N, Warburton C, Murray A, mahboudi F, Master WR. Development of a recombinant Leishmania major strain sensitive to ganciclovir and 5-fluoro cytosine for use a live challenge in clinical trials. *Vaccine*. 2005;23(9):1170—7.

84. Selvapandiyan A, Gannavaram S, Lakhal-Naouar I, Duncan R, Salotra P, Nakhasi HL,. Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. *J. Trop. Med.* 2012;2012(2012):1–12.

85. Xu D, Chatfield SN, Dougan G, Liew FY. Protection against Leishmania major infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated Salmonella typhimurium (AroA- AroD-). *Immunology*. 1995;85(1):1–7.

86. Connell ND, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;15(24):11473—7.

87. Streit JA, Donelson JE, Wilson ME. BCG expressing LCR1 of Leishmania chagasi induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol.* 2000;94(1):33—41.

88. Ram´ırez JR,Robledo S, Sep´ulveda JC, Moll H, Soldati D, et al. Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine*. 2001;20(4):455—61.

89. McMahon-Pratt D, Rodriguez JR, Zhang Y, Manson K, Bergman C,Rivas L, Rodriguez JF, Lohman KL, Ruddle NH. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against Leishmania infection. *Infect Immun.* 1993;61(8):3351–3359.

90. Gonzalo RM, Rodriguez JR, Rodriguez D, Heljasvaara R, Lucas P, et al. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the Leishmania infantum P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2002;20(7-8):1226—31.

91. Ramiro MJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA vaccine and vaccinia recombinant vectors expresssing LACK. *Vaccine*. 2003;20(21):2474—84.

92. Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br. Med. Bull.* 2005;75-76:115–30.

93. Michael J. The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasit. Vectors*. 2011;4(48):1–13.

94. Rosa R, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. Immunization with Leishmania infantum released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response. *Vaccine*. 2007;25(23):4525–4532.

95. YAO C, DONELSON JE, WILSON ME. The major surfaceprotease (MSP or GP63) of Leishmania sp. biosynthesis regulation of expression and function. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003;132:1–16.

96. Jaafari MR, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Kheiri MT, et al. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of Leishmania (rgp63) encapsulated in cationic liposome. *Vaccine*. 2007;25:6107–6017.

97. Champsi J, McMahon-Pratt D. Membrane glycoprotein M-2 protects against leishmania amazonensis infection. *Infect Immun.* 1988;56(12):3272–3279.

98. McMahon-Pratt D, Zhang Y, Manson K, Bergman C, Rivas L, Rodriguez JF, Lohman KL, Ruddle NH. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against leishmania infevtion. *Infect Immun.* 1993;61(8):3351–3359.

99. Coelho EA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Coelho E. A., T.C.A., Carvalho F. A., Chaves K. F., Teixeira K. N., Rodrigues R. C., Charest H., Matlashewski G., Gazzinelli R. T. and Fernandes A. P. , Immune responses induced by the leishmania donovani A2 antigen, but not by the LACK antigen, are prote. *Infect Immun.* 2003;71(7):3988–3994.

100. Handman E, Baldwin TM, Curtis JM, Sacheerlinck JP. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from leishmania major is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun.* 1995;63(11):4261–4267.

101. Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Curr. Med. Chem.* 2012;19(10):1443–1474.

102. Stäger S, Smith F, Kaye PM. Leishmania donovani Induces Protection Stage-Regulated Surface Protein from Immunization with a Recombinant Against Visceral Leishmaniasis. *J Immunol.* 2000;165:7064–7071.

103. Coler RN, Steven G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2005;21(5):244–249.

104. Masina S, Demotz SO, Fasel NJ. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred Vervet Monkeys, using a recombinant Histone-1 antigen. *J Infect Dis.* 2003;188:1250–1257.

105. Molano I, Miron C, Redondo E, Requena JM, Soto M, Nieto CG, Alonso C. A Leishmania infantum multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with L. infantum. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2003;92(2):1–13.

106. Evans K J, Kedzierski L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *J. Trop. Med.* 2012;2012:1–12.

107. Badiee A, Mahmoud R, Khamesipour A. Leishmania major: Immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. *Exp. Parasitol.* 2007;115(2):127–134.

108. Nico D, Borja-Cabrera GP, Travassos LR, Palatnik M, Soares IS, Rodrigues MM, Palatnik-de-Sousa CB. Adaptive immunity against Leishmania nucleoside hydrolase maps its c-terminal domain as the target of the CD4+ T cell-driven protective response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010;4(11):1–30.

109. DNA Vaccines again protozoan parasites: Advances and challenges. *J Biomed Biotechnol.* 2007;10:1155–1166.

110. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet. Vaccines Ther.* 2004;2(17):1–8.

111. Rafati S, Taheri T, Vafa M, Fasel N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of Leishmania major. *Vaccine*. 2001;19(25):3369—75.

112. Iborra S, Carrion J, Nieto A, Fernandez E, Alonso C, Requena JM. The Leishmania infantum Acidic Ribosomal Protein P0 Administered as a DNA Vaccine Confers Protective Immunity to Leishmania major Infection in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 2003;71(11):6562–6572.

113. Soto M, Pineda MA, Gonzalez VM, Entringer PF, Oliveira CI, Nascimento IP, Souza P, Corvo L, Alonso C, Bonay P, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, Iborra S. Searching Genes Encoding Leishmania Antigens for Diagnosis and Protection. *Sch. Res. Exch.* 2009;2009:1–10.

114. Das A, Ali N. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *Front. Immunol.* 2012;2012:1–14.

115. Ghosh A, Labrecque S, Matlashewsk G. Protection against Leishmania donovani infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine*. 2001;19(24):3169—78.

116. Basu R, Basu JM, Naskar K, Roy S, Bhaumik S, Naskar K, Syamal R. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and resistant strains of Leishmania donovanithat correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evid. *J Immunol.* 2005;174(11):7160—71.

117. Iva R, Volf P. Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission. *Folia Parasitol. (Praha).* 2006;53:161–171.

118. Oliveira F, Kamhawi S, Valenzuela JG. Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-Leishmania Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *plos NTDs*. 2008;2(4).

119. Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(22):7845–7850.

120. Solbach W LT. The host response to Leishmania infection. *Adv Immunol.* 2000;74:275–317.

121. Morris L, Aebischer T, Handman E KA. Resistance of BALB/c mice to leishmania major infection is associated with a decrease in the precursor frequency of antigen-specific CD4+ cells secreting interleukin-4. *Int Immunol.* 1993;5(7):761–7.

122. Mahmoudzadeh-niknam H. Induction of partial protection against Leishmania major in BALB / c mice by Leishmania tropica ". *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 2004;31(4):201–208.

123. Mahmoudzadeh-Niknam H, Kiaei SS, Iravani D. Viscerotropic growth pattern of Leishmania tropica in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis. *Korean J. Parasitol.* 2007;45(4):247–53.

124. Kadir MA, Al-obaidi HS, Al-hula GA, Al-samarai AM. A trial Of Immunisation Against Cutaneous Leishmaniasis. *J Fac Med Baghdad*. 2006;48(3):277–279.

125. Newman KC, Riley EM. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7(4):279–91.

126. Bihl F, Pecheur J, Bréart B, et al. Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon Leishmania major infection. *J. Immunol.* 2010;185(4):2174–81.

127. Bajénoff M, Breart B, Huang AYC, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J. Exp. Med.* 2006;203(3):619–31.

128. Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, And Sacks DL. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* 1996;183:515–526.

129. Hkima F, Rachinel N, Klimczak M, Doyen N, and Louis J. TLR9-Dependent Activation of Dendritic Cells by DNA from Resolution of Lesions 1. *J. Immunol.* 2009;182:1386–1396.

130. Rhee EG, Mendez S, Shah JA, et al. Vaccination with Heat-killed Leishmania Antigen or Recombinant Leishmanial Protein and CpG Oligodeoxynucleotides Induces Long-Term Memory CD4 ꙅ and CD8 ꙅ T Cell Responses and Protection Against Leishmania major Infection. *J. Exp. Med.* 2002;195(12):1565–1573.

131. Mutiso JM, Macharia JC, Kariuki TM, Gicheru MM. Montanide ISA 720 is more effective than BCG as an adjuvant for Leishmania killed vaccine in BALB/c mice. *Int. J. Integ. Biol.* 2009;7(2):107–116.

132. Tapia FJ, Díaz NL, Rodríguez OI, Sánchez MA. Tegumentary Leishmaniasis: Immunology and Molecular Biology. *Gaz. méd. Bahia*. 2009;79(3):84–90.

133. Muraille E, Trez C De, Pajak B, et al. Amastigote Load and Cell Surface Phenotype of Infected Cells from Lesions and Lymph Nodes of Susceptible and Resistant Mice Infected with Leishmania major. 2003;71(5):2704–2715.

134. بكداش محمد ، قباقيبي محمد، وسكرية شادي. دراسة بيئية وبائية لانتشار الفواصد- ذباب الرمل الناقل لطفيليات الليشمانية في محافظة حماه – سورية. مجلة التشخيص المخبري. 2013: المجلد 6 العدد 9.

135. أبا زيد نزار. دراسة وصفية لنظام ترصد داء الليشمانية في سورية. رسالة دراسات عليا. كلية الطب. جامعة دمشق. 2000.

136. السلوم نتالي، العقلة سعاد، قويدر محمود، ومعروف محمد. دراسة الاستجابة المناعية ضد بعض المستضدات الرئيسة لليشمانية. مجلة التشخيص المخبري. 2011: المجلد 6 العدد 2.

137. العموري داليا، العقلة سعاد، قويدر محمود، ومعروف محمد. محاولة التمنيع باستخدام الليشمانية المثبطة بالميتوميسين بـ mitomycin-c. مجلة التشخيص المخبري. 2011: المجلد 6 العدد 2.

Appendix الملحق-11