قائمة المحتويات List of contents

قائمة الجداول 8

قائمة الأشكال.....10

قائمة الاختصارات.....14

1- الوبائيات Epidemiology 16

2- الخصائص العامة لطفيلي الليشمانية Properties of leishmania.....18

1-2 بنية الطفيلي Structure of Leishmania.....18

1-1-2 شكل الليشمانة Amastigote.....18

2-1-2 شكل المشيقة Promastigote.....19

3- تصنيف الطفيلي Taxonomy of Leishmania 19

4- العامل الناقل The Vector.....21

5- المستودع Reservoir Hosts.....22

6- دورة حياة الطفيلي Life Cycle of Leishmania.....23

7- التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات Clinical manifestation of Lieshmaniasis.....25

1-7 داء الليشمانيات الجلدي Cutaneous leishmaniasis.....25

2-7 داء الليشمانيات الجلدي المخاطي Mucocutaneous lieshmaniasis .. 26

3-7 داء الليشمانيات الحشوي Visceral leishmaniasis 27

8- الاستجابة المناعية تجاه طفيليات الليشمانية Immune response against leishmania.....28

1-8 الاستجابة المناعية خلال تطور الإصابة الجلدية 28

8-1-1 الأحداث المناعية المبكرة في داء الليشمانيات الجلدي 28

8-1-2 دور السبيل البديل لبروتينات المتممة في الاستجابة المناعية ضد داء الليشميات الجلدي 30

8-1-3 الطور الالتهابي في الاستجابة المناعية ضد الإصابة بداء الليشمانيات الجلدي 31

8-1-4 عملية ضبط تقديم المستضد 32

8-2 المظاهر المناعية في داء الليشمانية الجلدي الفأري 36

8-2-1 العلاقة بين نمط السيتوكينات المنتجة مقاومة داء الليشمانيات الجلدي الفأري 37

9- لقاحات الليشمانية Leishmania vaccines.....40

9-1 قواعد تسجيل اللقاح 40

9-2 مواصفات اللقاح المثالي 41

9-3 لقاحات الجيل الأول First generation vaccines.....41

9-3-1 التلقيح بطفيلي الليشمانية leishmanisation 41

9-3-2 اللقاحات المحضرة من الطفيليات المقتولة killed vaccines.....42

9-4 لقاحات الجيل الثاني second generation vaccines.....44

9-4-1 اللقاحات الحية مضعفة الفوعة live attenuated vaccine.....44

9-4-2 التلقيح باستخدام مستضدات مأشوبة لطفيليات الليشمانية.....47

9-5 لقاحات الجيل الثالث.....50

9-5-1 لقاحات DNA.....50

10- لمحة عامة عن جينوم الليشمانية.....52

10-1 الحلقات الصغيرة في دنا منشأ الحركة.....54

10-2 الجين المشفر لتحت الوحدة الريباسية الصغيرة.....56

11- التنسيل الجزيئي Molecular cloning.....57

11-1 عزل الدنا DNA extraction.....58

11-2 هضم الجين الهدف و البلاسميد بأنزيمات الهضم و ربطهما.....59

11-3 الاستحالة Transformation.....61

11-4 تقصي الخلايا الجرثومية التي نجحت فيها عملية الاستحالة.....62

11-5 تضخيم و تنقية البلاسميد المأشوب.....63

الدراسة العملية

1- مبرر البحث.....66

2- هدف البحث.....66

3- موجز خطوات الدراسة العملية.....67

4- المواد و الطرائق Material and methods 68

4-1 طفيليات الليشمانية 68

4-2 استخلاص الدنا من طفيليات الليشمانية.....68

4-3 الدراسة البيولوجية الحاسوبية Bioinformatics 70

4-3-1 البلاسميد المستخدم في الدراسة 71

4-3-2 اختيار المشارع اللازمة لجين الرنا الريباسي 18S والمنطقة المصانة conserved region من الحلقات الصغيرة 74

4-4 التضخيم بواسطة تفاعل PCR.....75

4-4-1 تفاعل PCR لجين 18S.....75

4-4-2 تفاعل PCR للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة..77

4-5 الرحلان الكهربائي.....78

4-5-1 المواد المستخدمة في الرحلان الكهربائي.....78

4-5-2 تحضير محاليل ودارئات الرحلان.....79

4-6 هضم نواتج PCR.....80

4-6-1 هضم ناتج تضخيم المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S 80

4-6-2 هضم ناتج تضخيم المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.....81

4-7 تهيئة الجراثيم E coli TOP 10.....81

4-7-1 تحضير الأوساط اللازمة لنمو الجراثيم..... 82

4-7-2 بروتوكول تهيئة جراثيم *E.coli TOP 10*.....82

4-8 تكثير البلاسميد PCI.....83

4-9 استخلاص البلاسميد من المستعمرات الجرثومية 85

4-10 رحلان البلاسميد PCI.....86

4-11 قياس تركيز البلاسميد PCI.....87

4-12 هضم البلاسميد.....87

4-13 الاستخلاص من هلامة الأغاروز.....87

4-14 استخلاص البلاسميد من الهلام بعد التهضيم بأنزيمات الهضم.....91

4-15 تفاعل ربط الجين بالبلاسميد Ligation.....93

4-16 الاستحالة Transformation.....95

4-17 استخلاص البلاسميد المأشوب من جراثيم *E.coli Top 10*.....96

4-17-1 استخلاص البلاسميد الحاوي على المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S.....96

4-17-2 استخلاص البلاسميد الحاوي على المنطقة المصانة conserved region من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة 98

4-18 هضم البلاسميد الحاوي على المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S.....99

4-19هضم البلاسميد الحاوي على المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.....100

4-20 تفاعل PCR للمنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ضمن البلاسميد PCI 100

4-21 تفاعل PCR للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة ضمن البلاسميد PCI 101

4-22 تحضير حيوانات التجربة.....102

4-22-1 الحقن العضلي 103

4-22-2 اختبار التحدي.....104

4-22-3 متابعة تطور الإصابة.....105

4-22-4 الاعتيان.....105

4-23 مقايسة السيتوكينات.....106

4-23-1 مقايسة الإنترفيرون غاما.....106

4-23-2 مقايسة الإنترلوكين12.....109

4-23-3 مقايسة الإنترلوكين 4.....113

4-24 الدراسة الإحصائية.....117

5- النتائج.....118

5-1 توصيف سلالة الليشمانية المستخدمة في دراستنا.....118

5-2 استخلاص الدنا الكلي.....119

5-3 معايرة DNA 120

5-4 الدراسة البيولوجية الحاسوبية.....120

5-5 نتائج تفاعل PCR للمنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S.....125

5-6 نتائج تفاعل PCR للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة conserved region.....126

5-7 استخلاص البلاسميد PCI من جراثيم E.coli TOP 10 وقياس تركيزه و نقاوته.....127

5-8 هضم البلاسميد PCI و المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S و المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة للدنا المتقدري conserved region بأنزيمات Xho I و Xba I 128

5-9 استخلاص البلاسميد PCI و المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S والمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة من هلامة الأغاروز 129

5-10 تنسيل المنطقة المدروسة من جين 18S.....130

5-11 تنسيل المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.....132

5-12 هضم البلاسميد المأشوب المرمز جين 18S و البلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.....133

5-13 تقييم فعالية تمنيع البلاسميد المأشوب الحاوي على جين 18S عند الفئران.....134

5-14 متابعة التغيرات في حجم الآفة.....135

5-15 دراسة رد الفعل المناعي لدى الفئران Balb c بعد التمنيع بالبلاسميد المأشوب.....138

5-15-1 نتائج مقايسة الإنترفيرون غاما.....139

5-15-2 نتائج مقايسة الإنترلوكين 12.....144

5-15-3 نتائج مقايسة الإنترلوكين 4.....150

6- المناقشة.....157

7- الاستنتاج.....162

8- المقترحات و التوصيات.....162

9- الملخص باللغتين العربية و الإنكليزية.....163

10- المراجع.....166

قائمة الجداول List of tables

الجدول (1) أنواع طفيليات جنس الليشمانية والمتلازمات السريرية الرئيسة التي تسببها.....20

الجدول (2) تصنيف السيتوكينات حسب دورها في الاستجابة المناعية خلال تطور الإصابة الجلدية.....30

الجدول (3) تصنيف بعض الأنزيمات المستخدمة في عملية تنسيل الجين 60

الجدول (4) المواد المطلوبة لتحضير دارئة TE والكمية المناسبة من كل مادة لتحضير 50 مل.....68

الجدول (5) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم المنطقة المنسلة من جين 18S...77

الجدول (6) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم جين المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.....78

الجدول (7) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ضمن البلاسميد PCI.....101

الجدول (8) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.....102

الجدول (9) تحضير السلسلة العيارية لعتيدة الإنترفيرون غاما.....107

الجدول (10) تحضير السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلكين 12.....111

الجدول (11) تحضير السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلوكين 4.....114

الجدول (12) تطور فرق الثخانة بين قدمي كل فأر من فئران المجموعة الشاهدة..135

الجدول (13) تطور الفرق في الثخانة بين قدمي فئران مجموعة البلاسميد.....136

الجدول (14) تطور الفرق في الثخانة بين قدمي فئران مجموعة البلاسميد المأشوب.....137

الجدول (15) قيم المتوسط الحسابي للإنترفيرون غاما و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي.....140

الجدول (16) قيم المتوسط الحسابي للإنترفيرون غاما و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة بعد أسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع من اختبار التحدي.....143

الجدول (17) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 12 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي.....146

الجدول (18) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 12 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة بعد أسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع من اختبار التحدي.....149

الجدول (19) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 4 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي.....152

الجدول (20) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 4 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة بعد أسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع من اختبار التحدي.....155

قائمة الأشكال List of figures

الشكل (1) عدد الإصابات بداء الليشمانيات الجلدي في منطقة الشرط الأوسط.....17

الشكل (2) (أ)شكل المشيقة. (ب)صورة بالمجهر الإلكتروني لشكل الليشمانة.....18

الشكل (3) (أ) شكل المشيقة لطفيلي الليشمانية (ب)الشكل النموذجي للمشيقات و هي متجمعة على شكل Rosette في مستنبت زرعي بعد تلوينها بملون غيمزا).....19

الشكل (4) تطور الأشكال المتحركة للطفيلي ضمن ذبابة الرمل.....22

الشكل (5) دورة حياة طفيليات الليشمانية.....24

الشكل (6) التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات: الجلدية (أ)، الجلدية المخاطية (ب)، والحشوية (ج).....26

الشكل (7) الأحداث المناعية المبكرة في داء الليشمانيات الجلدي.....29

الشكل (8) الاستجابة المناعية الخلوية تجاه طفيليات الليشمانية.....34

الشكل (9) الخلايا التغصنية صلة الوصل ما بين المناعة الخلقية والمناعة التلاؤمية.....36

الشكل (10) دنا منشأ الحركة I في الزجاج و تمثل كيفية تداخل الأقراص في المستوي . II في العضوية كيفية تكدس الأقراص.....53

الشكل (11) عملية التعديل بعد الانتساخ التي تطرأ على الرنا المنتسخ من الحلقات الكبيرة.....54

الشكل (12) الحلقة الصغيرة في دنا منشأ الحركة عند طفيليات الليشمانية.....55

الشكل (13) تضخيم الدنا بواسطة تفاعل PCR.....59

الشكل (14) هضم الجين الهدف و البلاسميد و ربطهما بتفاعل Ligation.....60

الشكل (15) عملية نقل جزيئة البلاسميد المأشوب إلى المضيف 62

الشكل (16) تقصي الخلايا الجرثومية التي نجحت فيها عملية الاستحالة 63

الشكل (17) تسلسل خطوات تنسيل الجين.....64

الشكل (18) بلاسميد PCI.....72

الشكل (19) المنطقة التي تحوي تتاليات التعرف لأنزيمات القطع ضمن بلاسميد PCI.....73

الشكل (20) شروط التفاعل لأنزيمي الهضم Xba I و Xho I ضمن دارئات الهضم.....74

الشكل (21) طريقة الحقن العضلي لفئران التجربة 104

الشكل (22) منحني تكاثر المشيقات لسلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا.....119

الشكل (23) رحلان الدنا الجينومي لطفيليات الليشمانية.....120

الشكل (24) تسلسل جين 18S لطفيلي الليشمانية المدارية في موقع NCBI و فق رقم الدخول Accesion no GQ332363.1.....121

الشكل (25) تسلسل المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة لطفيلي الليشمانية المدارية وفق رقم الدخول Accesion no Z32843.1 122

الشكل (26) عدم وجود تطابق بين تتالي الحلقة الصغيرة لليشمانية المدارية وتتالي الجينوم البشري 123

الشكل (27) عدم وجود تطابق بين تتالي جين 18S لليشمانية المدارية وتتالي الجينوم البشري 123

الشكل (28) تسلسل المنطقة التي تم اختيارها للتنسيل باستخدام برنامج Vector NIT Express.....124

الشكل (29) توضع المشرعين المباشر و العكسي ضمن تسلسل المنطقة المنسلة من جين 18S.....124

الشكل (30) توضع المشرعين المباشر و العكسي ضمن المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.....125

الشكل (31) رحلان ناتج تضخيم المنطقة المنسلة من جين 18S ذات الطول 197.....126

الشكل (32) رحلان نواتج PCR لكل من المنطقة المنسلة من جين 18S و المنطقة المصانة conserved region.....127

الشكل (33) رحلان البلاسميد PCI غير المهضم.....128

الشكل (34) رحلان نواتج هضم جين 18S وجين المنطقة المصانة والبلاسميد PCI بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية 50bp.....129

الشكل (35) نمو مستعمرات جراثيم الإشريكية الكولونية Top 10 على وسط LB أغار يحتوي على الأمبيسلين.....131

الشكل (36) رحلان ناتج تضخيم كل من جين المنطقة المصانة والمنطقة المنسلة من جين 18S بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية 50bp.....132

الشكل (37) رحلان البلاسميد المأشوب الحاوي على جين 18S و البلاسميد المأشوب الحاوي على جين المنطقة المصانة بالشكلين المهضّم و غير المهضّم بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية 50bp.....134

الشكل (38) تطور حجم الآفة مقدراً بتطور الفرق في الثخانة بين قدمي الفئران لمجموعات الدراسة (PBS، البلاسميد، البلاسميد المأشوب) قبل اختبار التحدي وبعد اختبار التحدي بأسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع.....138

الشكل (39) الخط البياني المرسوم بالاعتماد على تراكيز السلسلة العيارية لعتيدة الإنترفيرون غاما.....139

الشكل (40) تراكيز الإنترفيرون غاما لدى فئران Balb c قبل اختبار التحدي و بعد أسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع من اختبار التحدي.....144

الشكل (41) الخط البياني المرسوم بالاعتماد على تراكيز السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلوكين 12.....145

الشكل (42) تراكيز الإنترلوكين 12 لدى فئران Balb c قبل اختبار التحدي و بعد أسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع من اختبار التحدي.....150

الشكل (43) الخط البياني المرسوم بالاعتماد على تراكيز السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلوكين 4.....151

الشكل (44) تراكيز الإنترلوكين 4 لدى فئران Balb c قبل اختبار التحدي و بعد أسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع من اختبار التحدي.....156

List of abbreviations قائمة الاختصارات

A: *Adenine*.

ALM: Autoclaved leishmania major.

APC: Antigen presenting cell.

BCG: *Bacille Calmette–Guerin.*

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 B

MHC II: Major histocompatibility complex II.

IFN-γ: Interferon-γ.

IgG: Immunoglobulin Gamma.

IL-12: Interleukine 12.

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*.

Mac-1:Macrophage-1 antigen.

mRNA: Messenger ribonucleic acid.

NH36: Nucleoside hydrolase 36.

NO: Nitric Oxide.

PBS: Phosphate buffer saline.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

RNA: Ribonucleic acid.

RV: Reverse.

SD: Standard Deviation.

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.

مقدمة الدراسة النظرية

أدواء الليشمانيات هي مجموعة من الآفات تصيب الجلد والأغشية المخاطية والأحشاء، تسببها طفيليات من شعبة الحيوانات الأوالي Protozoa من جنس الليشمانية Leishmania. تنتقل طفيليات الليشمانية إلى الإنسان بواسطة ذبابات الرمل Sand Flies (1).

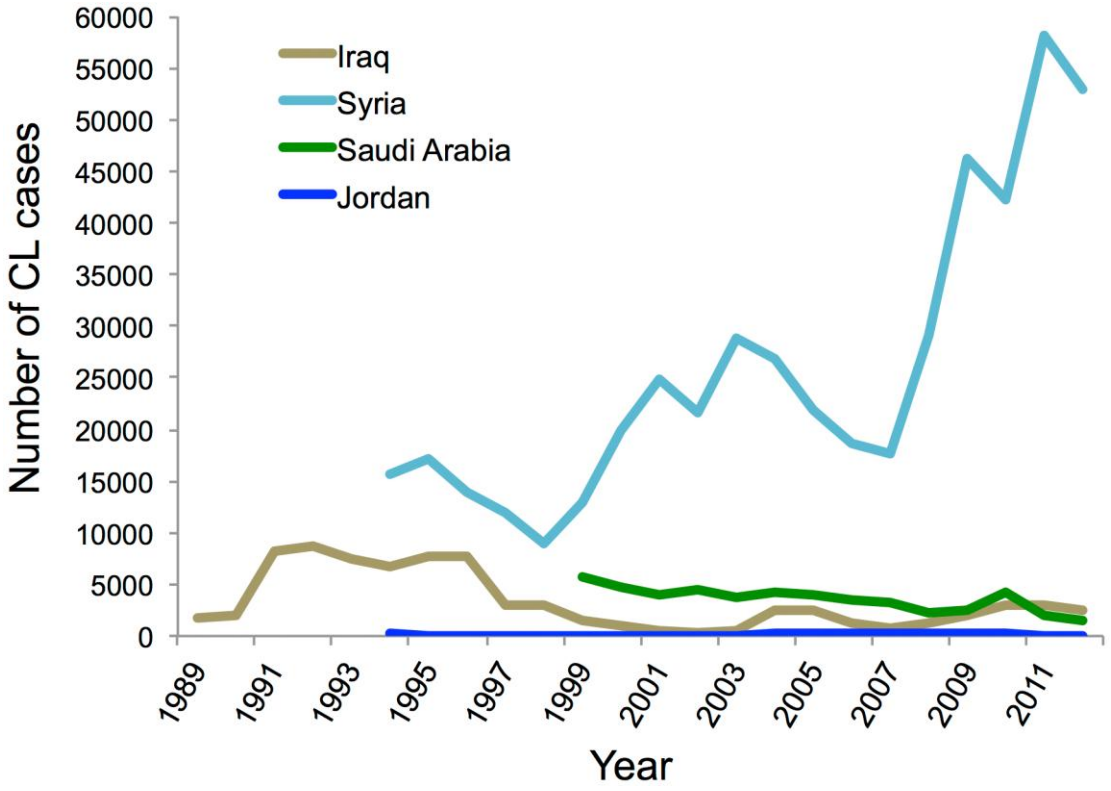
شجعت الوقائع التي بينت أن الأفراد المصابين بداء الليشمانيات الجلدي، والذين شفيت إصاباتهم لا يصابون بالداء مرة أخرى الباحثين على تطوير لقاح ضد هذا الداء. و على الرغم من جهود الباحثين الحثيثة للتوصل لهذا اللقاح، فإنهم لم يتوصلوا بعد إلى تحضير لقاح فعال وآمن لوقاية الإنسان من الإصابة. إلا أن الاهتمام المتزايد في السنوات الأخيرة بالحصول على لقاح ناجع، يعطينا الحافز والأمل بالتوصل لصيغة لقاح ناجعة مرتكزين بذلك على التطورات اليومية بفهم الآليات المناعية ضد الطفيلي.

1- الوبائيات Epidemiology

تنتشر الإصابة بداء الليشمانيات في أكثر من 98 دولة في العالم حيث يوجد سنوياً من 0.7 إلى 1.2 مليون إصابة. تتركز أكثر من 75% من الإصابات بداء الليشمانيات الجلدي في 10 دول هي: سوريا وأفغانستان وإيران والمغرب والسودان وأثيوبيا والبرازيل وكولومبيا وكوستاريكا والبيرو (2). لوحظ زيادة تدريجية في عدد الإصابات بداء الليشمانيات الجلدي في سوريا منذ تسعينات القرن الماضي لتسجل أعلى ارتفاع لها في عام 2011 حيث بلغ عدد الإصابات 58156 إصابة سجلت في محافظات إدلب و حماه و حلب (3).

ووفقاً لتقرير منظمة الصحة العالمية لعام 2010 فإن سوريا واحدة من البلدان الأكثر تأثراً بالإصابة بداء الليشمانيات الجلدي حيث يوجد 25000 حالة سنوياً. كما أظهرت نشرات لوزارة الصحة السورية إحصائيات صادمة حول معدل الإصابة بهذا الداء في سوريا حيث بلغ 53000 حالة في عام 2012 و 41000 حالة في أول ربعين من عام

2013 (2) . مما يستوجب قرع جرس الإنذار إذ أصبحت سوريا في مقدمة دول إقليم شرق المتوسط بتسجيل عدد الإصابات. هذا و يجب الانتباه إلى أن الأعداد المسجلة في المراكز الصحية الخاصة بمكافحة داء الليشمانيات قد لا يعبّر عن الإصابات الحقيقية في الواقع، و ذلك لعدم مراجعة العديد من المصابين لهذه المراكز أو لمراجعتهم أطباء جلديين خاصين (3).



الشكل (1) عدد الإصابات بداء الليشمانيات الجلدي في منطقة الشرط الأوسط و البيانات معتمدة على تقارير منظمة الصحة العالمية في كل بلد من البلدان الموجودة في المخطط. (3)

2- الخصائص العامة لطفيلي الليشمانية

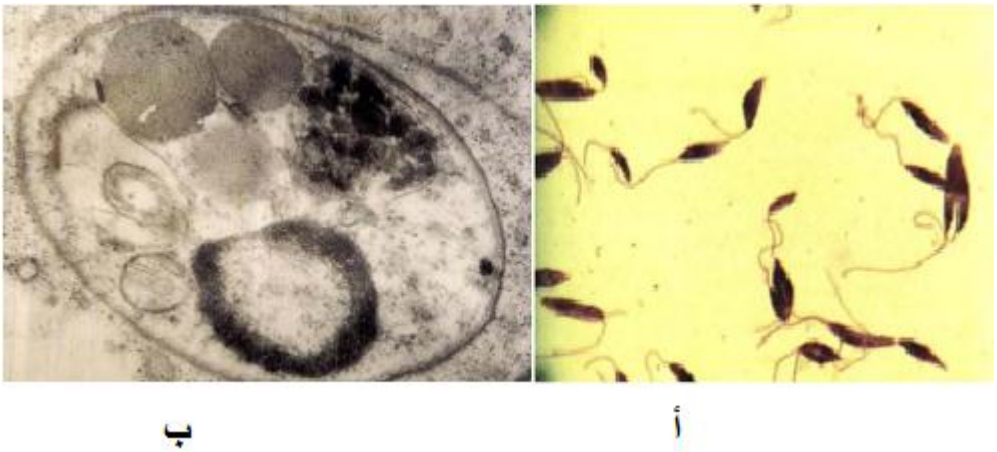
2-1 بنية الطفيلي Structure of Leishmania

إن طفيلي الليشمانية هو وحيد خلية يحتوي على جسيم متقدري وحيد و يملك العديد من الامتدادات داخل الخلية و يحوي على منشأ الحركة kinetoplast، الذي بدوره يحوي على الدنا المتقدري.(4)

تأخذ طفيليات الليشمانية شكلين مختلفين :

2-1-1 شكل الليشمانة Amastigote

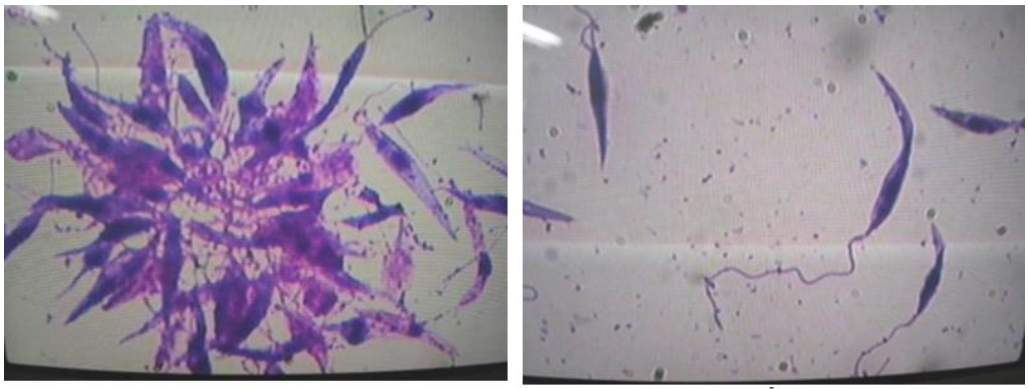
الليشمانات هي أشكال دائرية إلى بيضوية تتواجد كما يوضح الشكل (2- ب) في خلايا الجملة الشبكية البطانية Reticuloendothelial cells عند الإنسان والثدييات الأخرى. تتراوح أبعادها بين 2-5 مكرون، يسمح تلوينها بملون غيمزا برؤية نواة كبيرة تتلون باللون البنفسجي الغامق ويأخذ منشأ الحركة Kinetoplast الذي يتلون باللون البنفسجي شكل النقطة الكبيرة. يربط خيط دقيق منشأ الحركة بالجسيم نظير القاعدي Dot-like basal body الذي ينشأ منه الخيط المحوري Axoneme يمتد باتجاه الناحية الأمامية للطفيلي (3).



الشكل (2): (أ) شكل المشيقة. (ب) صورة بالمجهر الإلكتروني لشكل الليشمانة (3)

2-1-2 شكل المشيقة promastigote

تمتاز المشيقات كما يوضح الشكل (2- أ) بكونها أشكال متطاولة تتواجد في المستنبتات الزرعية وذبابة الرمل تتراوح أبعادها بين 1.5- 3.5 مكرون عرضاً و15-20 مكرون طولاً. تمتلك هذه الأشكال، كما يوضح الشكل 2 سوطُاً حراً وحيدٌاً بطول 15-28 مكرون وتتجمع الأشكال المتحركة الهرمة مع بعضها لتؤلف الشكل الوردي ويسمى Rosette(3).



الشكل (3): (أ) شكل المشيقة لطفيلي الليشمانية (ب)الشكل النموذجي للمشيقات و هي متجمعة على شكل Rosette في مستنبت زرعي بعد تلوينها بملون غيمزا (82).

3- تصنيف الطفيلي Taxonomy of Leishmania

تنتمي الأنواع المختلفة من هذه الطفيليات، كما يبين الجدول 1، إلى جنس الليشمانية Leishmania، فصيلة المثقبيات Trypanosomatida*e*، رتبة ذوات منشأ الحركة Kinetoplastida، صف السوائط الحيوانية Zoomastigophor*a*، تحت شعبة السوائط Mastigophora، شعبة السوائط اللحمية *S*arcomastigophora، تحت مملكة وحيدات الخلية (الأوالي) Protozo*a*، المملكة الحيوانية Kingdom Animalia (3).

الجدول 1: أنواع طفيليات جنس الليشمانية والمتلازمات السريرية الرئيسة التي تسببها (4)

الأنواع الطفيلية SPECIES	الأشكال السريرية لداء الليشمانية
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 الغانية L. guyanensis الليشمانية البيروفية.L. peruviana	**الداء الليشماني الجلدي Cutanous Leishmaniasis** **- في العالم القديم Old World** **- في العالم الجديد New World**
الليشمانية الأثيوبية L. aethiopica الليشمانية الأمازونية L. amazonensis	**الداء الليشماني الجلدي المنتشر Diffuse cutanous Leishmaniasis** **- في العالم القديم Old World** **- في العالم الجديد New World**
	الداء الليشمانية الجلدي الناكس Leishmaniasis recidivance

الليشمانية المدارية L. tropica الليشمانية الطفلية L. infantum	**- داء الليشمانية الجلدي التالي للكالاآزار** **Post KALA-AZAR DERMAL Leishmaniasis -**
الليشمانية الاثيوبية (حالات استثنائية) L. aethioica معقد الليشمانية البرازيلية L. braziliensis Complex	**الداء الليشمانية الجلدي المخاطي Mucocutaneous Leishmaniasis** **- في العالم القديم Old World** **- في العالم الجديد New World**
معقد الليشمانية الدونوفانية L. donovani Complex الليشمانية L. donovani والطفلية L. infantum الليشمانية الشاغاسية L chagasi	**الداء الليشماني الحشوي Visceral Leishmaniasis** **- في العالم القديم Old World** **- في العالم الجديد New World**

4- العامل الناقل The Vector

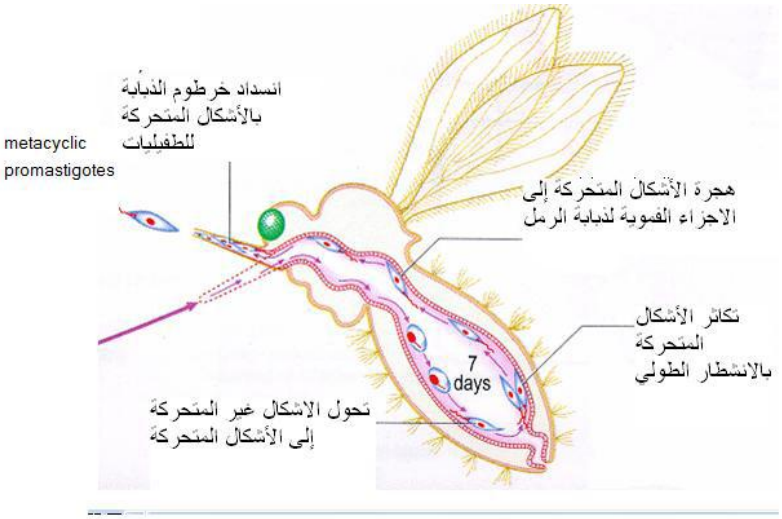
تعد أنثى ذبابة الرمل Sandfly هي الناقل الرئيسي لطفيلي الليشمانية و تعود هذه الحشرات إلى رتبة ثنائيات الأجنحة عائلة البعوضيات فراشية الظهر تحت عائلة الفواصد و إلى جنس الفواصد Phlebotomus و جنس sergentomyia في العالم القديم و جنس Lutzomyia في العالم الجديد (5).

ينتقل نوع الليشمانية المدارية *L.tropica* بواسطة نوع *P. sergenti* (5). بينما ينتقل نوع الليشمانيا الكبرى *L.major* بشكل أساسي بواسطة نوع *phlebotomus papatasi* (5).

يصاب الإنسان بداء الليشمانية نتيجة لدغة أنثى ذبابة الرمل التي لا تنشط في ضوء النهار بل تنشط في المساء حيث تبدأ باللدغ بعد غروب الشمس (6).

تتغذى ذبابة الرمل على دم أثوياء من ذوات الدم البارد والحار مثل الإنسان والقطط والكلاب والقوارض والماشية والخفافيش والطيور و السحالي. تأخذ ذبابة الرمل

طفيليات الليشمانية مع الدم ويتطور عندها الطفيلي، وتصبح بالتالي قادرة على نقل الطفيلي بعد 7-10 أيام (6).



الشكل (4): تطور الأشكال المتحركة للطفيلي ضمن ذبابة الرمل.

5- المستودع Reservoir Hosts

تعد القوارض والكلاب أهم مستودعات أنواع الليشمانية التي تصيب الإنسان. ويمكن التمييز بين نوعين من الحيوانات التي تلعب دور المستودعات: الحيوانات الأهلية وتوجد بالقرب من المنازل المأهولة بالسكان والحيوانات البرية. هذا ويمكننا التمييز من الناحية الوبائية بين ثلاث أنواع من البؤر:

- **بؤر أولية:** تلعب فيها الحيوانات البرية، كالكلبيات والقوارض Rodents، دور المستودع حيث يعتبر فأر الرمل السمين Psammomys obesus المستودع الرئيس لليشمانية الكبرى L. major في الشرق الأوسط. كما تنتشرهذه البؤر في أواسط آسيا وبعض مناطق أمريكا اللاتينية. تنتشرالإصابات في هذه المناطق عند الحيوانات فقط ولا نجد سوى بعض الإصابات الفردية بين السكان (7).

- **بؤر ثانوية:** تلعب فيها الكلاب دور المستودع حيث تُعد الكلاب، إضافة إلى كل من الثعالب والذئاب، الخازن الرئيس لأنواع الليشمانية المسببة لداء الليشمانية الحشوي في منطقة البحر المتوسط.
- **بؤر ثالثية:** يلعب فيها الإنسان دور المستودع الرئيس للطفيلي. أكثر الطفيليات شيوعاً في هذه البؤرهي طفيليات الليشمانية المدارية L. tropica (7).

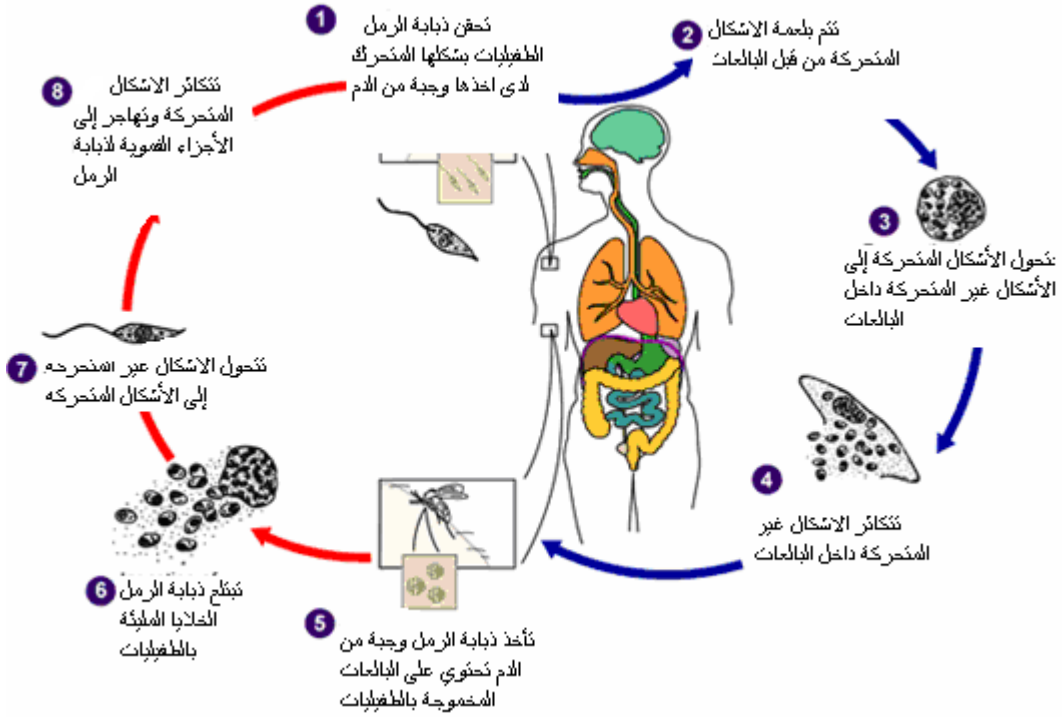
6- دورة حياة الطفيلي Life Cycle of Leishmania

تضم دورة حياة طفيلي الليشمانية شكلين هما شكل الليشمانة Amastigote form يتطفل على المضيف الفقاري و شكل المشيقة Promastigote form يتطفل على المضيف اللافقاري (ذبابة الرمل) .

تبدأ دورة الحياة عندما تلدغ ذبابة الرمل إنساناً مصاباً أو أحد الحيوانات الثديية المصابة بداء الليشمانيات ويوضح الشكل (5) دورة حياة هذه الطفيليات. وبما أن الحشرة الناقلة تتغذى على الدَّم فإنها تبتلع الكريات البيض الوحيدة monocytes أو البالعات Macrophages الحاوية على الطفيليات. تخرج الطفيليات غير المتحركة من الخلايا البالعة في المعي المتوسط لذبابة الرمل، وتتحول خلال عدة ساعات إلى الشكل المتحرك. يلتصق الشكل المتحرك بجدار المعي ويتضاعف بالانشطار الثنائي الطولي، هذا ولا ينقسم السوط إلى سوطين بل ينشأ سوط آخر ينجم عن تطوُّر الخيط المحوري الناتج من منشأ الحركة، حيث ينمو باتجاه الخارج معطياً سوطاً جديداً (8). تهاجر الطفيليات إلى البلعوم الأمامي للفاصدة، بعد 4-5 أيام فتسدُّه ثمَّ تصل في اليوم السابع إلى الخرطوم وتسده أيضاً وبالتالي تمتلك ذبابة الرمل عندئذٍ قدرتها على الإخماج. يترافق تناول الذبابة لوجبة أخرى من الدم، عند قيامها بلدغ إنسان غير مصاب، مع تقيَّؤها في مكان الوخز مما يؤدي إلى انطلاق المشيقات المعدية metacyclic promastigotes إلى الجرح الناجم عن اللدغ ودخولها إلى الأنسجة الأمر الذي يؤدي إلى موت أعداد كبيرة منها نتيجة لاحتواء سوائل أنسجة الجسم على مواد حالّة للخلايا، ونتيجة لبلعمة الأشكال المتحركة الأخرى من قبل الخلايا البالعة في جلد الثوي. تتحوَّل الأشكال المتحركة، داخل البالعات، إلى مشيقات تتكاثر ضمنها حتَّى تصل إلى أعداد كبيرة مما

يؤدي إلى انفجار البالعات تحرر الأشكال غير المتحركة منها وبلعمتها من قبل بالعات أخرى وبالتالي إصابة هذه البالعات وهكذا (8).

تمتاز الأنواع المختلفة للطفيليات بدرجات مختلفة من الإلفة للأعضاء المختلفة من جسم الإنسان. ففي حين تبقى طفيليات بعض الأنواع في الجلد مسببة إصابات جلدية، تهاجر طفيليات أنواع أخرى إلى الأحشاء مسببة إصابات حشوية (8).



الشكل (5) دورة حياة طفيليات الليشمانية(9).

يحدث في داء الليشمانيات الجلدي تكاثر موضعي فقط للطفيليات حيث تقتصر الإصابات بالليشمانية المدارية والمكسيكية على إصابة الخلايا الشبكيِّة البطانية في الجلد. وتشفى الإصابات الجلدية عادة من تلقاء نفسها دون الحاجة لأي علاج. أمَّا في الداء الحشوي والجلدي المخاطي فتنتشر الطفيليات من الجلد، عبرالدم، 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 تشوُّهات خطيرة يمكن أن تؤدي إلى موت المريض (9).

7- التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات clinical manifestation of leishmaniasis

يظهر داء الليشمانيات Leishmaniasis أشكالاً سريرية تختلف وفقاً لنوع الطفيلي و فوعته والاستجابة المناعية للمضيف. هذا ويمكننا التمييز بين عدة أنواع رئيسية لداء الليشمانيات وسنقوم فيما يلي باستعراضها.

7-1 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. تتوضع الآفات على المناطق المكشوفة من الجلد كالوجه و اليدين و الساعدين و الساقين و القدمين. تبدأ الآفة بحطاطة صغيرة حاكة قليلاً، تظهر مكان لدغة ذبابة الرمل، ثم تتوسع ببطء لتشكل قرحة ذات حواف مرتفعة و صلبة و محمرة. يمكن أن تبقى هذه الآفة جافة نسبياً مع قشرة مركزية فتدعى بالشكل الجاف و تنجم عن الإصابة بطفيليات الليشمانية المدارية *L. tropica*، أو يمكن أن تكون الآفة نازة لمواد قيحية و تسمى بالشكل الرطب و تنجم عن الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى L. major (10).

ينجم داء الليشمانيات الجلدي عن الإصابة بعدة أنواع من الليشمانية : الليشمانية المدارية L. tropica، والليشمانية المكسيكية L. mexicana، والليشمانية الكبرىL. Major، والليشمانية الإثيوبية L. aethiopica، والليشمانية البرازيلية L. braziliensis، والليشمانية البانامية L. panamensis، والليشمانية الغويانية L. guyanensis، والليشمانية البيروفيةL. peruviana ، والليشمانية الأمازونية L. amazonensis.

غالباً ما يشفى هذا الداء بشكل عفوي، وتختلف الفترة اللازمة للشفاء باختلاف أنواع الطفيليات وباختلاف الوضع المناعي للمصابين. يعتبر داء الليشمانيات الجلدي المعمم diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) الشكل المزمن لداء الليشمانية الجلدي ويشخص بشكل رئيس عند المرضى الذين يعانون من خلل في الوظائف المناعية

وخاصة في المناعة المتواسطة بالخلايا. ينتشر هذا الداء بشكل خاص في أثيوبيا ،وكينيا ،وفنزويلا .وينجم عن الإصابة بالأنواع التالية: الليشمانية المكسيكية L. mexicana، و الليشمانية الأمازونية L. amazonensis، و الليشمانية الأثيوبية L. aethiopica (10).

يتظاهر داء الليشمانيات الجلدي المعمم بشكل عقيدات ولويحات تنتشر لتشمل مناطق مختلفة من الجسم مسببة تشوهاً كبيراً، يشبه التشوه الناجم عن الجذام الجذامي مما يؤدي إلى الخلط في التشخيص بينهما. تترافق الإصابات السابقة مع وجود أعداد كبيرة من الطفيليات فيها (10).

داء الليشمانيات الجلدي (أ) داء الليشمانيات الجلدي المخاطي (ب) داء الليشمانيات الحشوي (ج)

الشكل (6) التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات: الجلدية (أ)، الجلدية المخاطية (ب)، والحشوية (ج).

2-7 داء الليشمانيات الجلدي المخاطي (MCL) Mucocutaneous leishmaniasis

ينتشر داء الليشمانيات الجلدي المخاطي في أمريكا الجنوبية والوسطى، وينجم عن الإصابة بطفيليات معقد الليشمانية البرازيلية L. brazileinsis . وفي بعض الحالات

النادرة عن الإصابة بطفيليات معقد الليشمانية الأثيوبية. تعكس هذه الإصابة تطوراً مزمناً لآفة جلدية لم تشف بالشكل المطلوب. وبالتالي يمكن أن ينتج داء الليشمانيات الجلدي المخاطي عن معالجة لبعض أنواع الليشمانية معالجة غيرصحيحة أوغيركافية. ويؤدي التريث في معالجة هذا الشكل إلى تشوهات خطيرة، يمكن أن تؤدي إلى الموت (10).

يتصف هذا الداء بتآكل الأنسجة الرخوة و الغضروفية ، الشكل 5- ب، حيث تعد أغشية الأنف والفم الأكثر عرضة للإصابة تليها أغشية الخد ،والحلق ،ولسان المزمار، والحنجرة، والحبال الصوتية، والقصبة الهوائية، والأعضاء التناسلية. ويؤدي التريث في معالجة هذا الشكل إلى تشوهات خطيرة. يمكن أن يؤدي هذا الداء إلى موت المريض (10).

3-7 داء الليشمانيات الحشوي Visceral leishaniasis (VL)

يأتي هذا الداء في المرتبة الثانية في تصنيف الأمراض الطفيلية القاتلة في العالم. ويعد مسؤولاً عن حوالي نصف مليون وفاة في العالم سنوياً. يعرف هذا الداء أيضاً بـالكالازار Kala-azar في شبه القارة الهندية، ويعد الشكل الأخطر لداء الليشمانيات. وغالباً ما يؤدي إلى الموت في حال عدم معالجته. تعتبر كل من أنواع الليشمانية الدونوفانية L. donovani ،والطفلية L. infantum ،والشاغاسية L.chagasi، الطفيليات الرئيسة المسؤولة عن الإصابة بداء الليشمانيات الحشوي. تصيب هذه الطفيليات كما يوضح الشكل 5- ج خلايا الجملة الشبكية البطانية للأحشاء كالكبد و الطحال و نخاع العظم مؤدية 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، و ضخامة شديدة في الطحال وهي ضخامة صلبة غير مؤلمة، وضخامة كبدية، وفقر دم شديد ، ونقص الكريات البيض، وفرط غلوبولين الدم. كما يمكن أن تظهر لدى بعض الأشخاص أعراض اصطلح على تسميتها داء الليشمانيات الجلدي اللاحق لداء كالازار post Kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL)، يظهر بعد الشفاء من داء الليشمانيات الحشوي بعدة سنوات، ويتظاهر بشكل

طفح جلدي وحطاطات يمكن أن تستمر لعدة سنوات وينتشر ليشمل مناطق واسعة من الجسم (10).

8- الاستجابة المناعية تجاه طفيليات الليشمانية

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 (11).

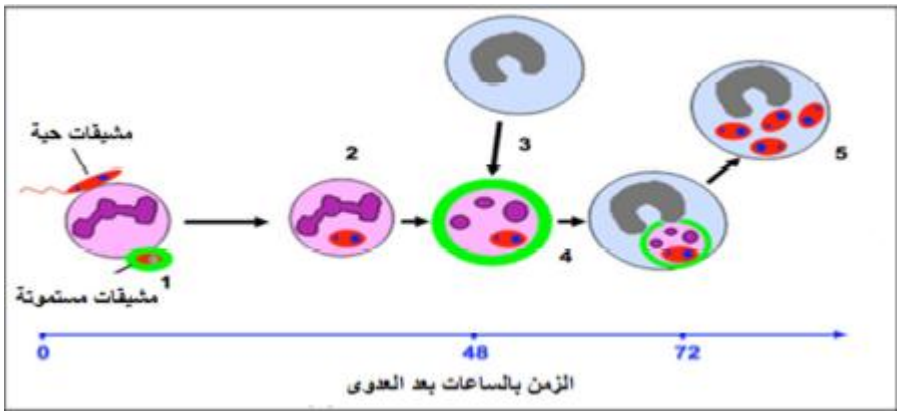
8-1 الاستجابة المناعية خلال تطور الإصابة الجلدية

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 تتواسطها بروتينات المتممة (12). وقد تبين امتلاك لعاب ذبابة الرمل لعدة عوامل فعالة تسمح للمشيقات بمقاومة الظروف الموجودة حيث تزيد من سرعة حضور الخلايا البلعمية phagocytes لموضع اللدغة، و تثبط فعالية المواد التي تفرزها البالعات (13).من هذه العوامل نذكر الببتيد ذو الوزن الجزيئي 6,5 كيلو دالتون يسمى maxadilan الذي يزيد التعبير عن السيتوكينات IL-10,IL-6و TGF-β التي تمنع البالعات من قتل طفيليات الليشمانية، والأدينوزين Adenosine الذي ينظم التعبير هبوطاً عن الجين المسؤول عن التعبير عن NO synthase في البالعات المفعلة و يثبط إنتاج أوكسيد النتريك NO.

8-1-1 الأحداث المناعية المبكرة في داء الليشمانيات الجلدي

تتم 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 و تملك 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 و بالتالي بقاء

العدلات المخموجة حية لمدة يومين. يسمح تحول المشيقات إلى ليشمانات بوقف تأثير عملية الهبة التنفسية respiratory burst مما يضمن بقاءها حية داخل العدلات (14). وبعد ذلك تتعرض العدلات المخموجة للاستماتة و تفرز البروتين macrophage inflammatory protein1b (MIP-1b) الذي يجذب البالعات إلى مكان العدوى لتقوم ببلعمة العلات 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 الشكل (7).



الشكل (7) الأحداث المناعية المبكرة في داء الليشمانيات الجلدي (1) بلعمة العلات المشيقات الحية أو المشيقات المستموتة. (2) تحول المشيقات إلى ليشمانات داخل العدلات. (3) تعرض العدلات المخموجة للاستماتة بعد مرور 48 ساعة على العدوى و انجذاب البالعات إلى مكان العدوى. (4) بلعمة العدلات للبالعات 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 و IL-10 التي تقلل من فعالية البالعات في قتل الطفيلي و تنقص التعبير عن IL-12 و عامل النخر الورمي TNF-a من البالعات مما يتيح الفرصة لليشمانات بالتكاثر داخل البالعات (15).

الجدول (2) تصنيف السيتوكينات حسب دورها في الاستجابة المناعية خلال تطور الإصابة الجلدية

السيتوكينات التي تحرض البالعات على قتل الطفيلي	السيتوكينات التي تمنع البالعات من قتل طفيليات الليشمانية
IFN-γ	IL-4
IL-2	IL-5
TNFα	IL-6
IL-12	IL-9
	IL-10
	IL-13
	TGF-β

2-1-8 دور السبيل البديل لبروتينات المتممة في الاستجابة المناعية ضد داء الليشمانيات الجلدي

أما بالنسبة للمشيقات التي لم تتم بلعمتها من قبل العدلات، فتتم بلعمتها عن طريق السبيل البديل لبروتينات المتممة الذي يبدأ بتثبيت المكون الثالث C3 على سطح الطفلي بالارتباط مع الجزيء البروتيني السكري GP63 و الجزيء السكري الفوسفوري الشحمي LPG ، و ينشطر C3 إلى C3b الذي يرتبط مع مستقبله Complement receptor type 1 (CR1) و إلى C3bi الذي يرتبط بمستقبله النوعي Complement receptor type 3 (CR3) الموجودان على سطح البالعات (16)، يعد هذا المستقبل أحد مكونات المعقد macrophage-1 antigen (Mac-1) الذي يتألف بشكل أساسي من CD11b و CD18 (17). و تشير الدراسات إلى عدم قدرة الأضداد الوحيدة النسيلة المضادة لـ CR3 على التثبيط الكامل لارتباط الطفيليات بالبالعات بشكل كامل و بالتالي 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 ، مستقبل CR1 receptor، ومستقبل lectin-like receptor ، ومستقبل fibronectin receptors (18). 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 هذه اليباليع اليحلولية أن تتحول من مشيقات إلى ليشمانات. يترافق مع هذا التحول تغيرات في شكل الطفيلي، و تغيرات استقلابية تسمح بتكيف الطفيلي مع الوسط الحمضي داخل الفجوة ، وتغيرات في التركيب البيوكيميائي لغشاء الخلية (19).

تسمى هذه المرحلة الأولية من العدوى بالطور الصامت phasesilent ، الذي يدوم حوالي 4-5 أسابيع بعد العدوى، و يتميز بعدم ظهور أية إصابة جلدية (20).

8 -1-3 الطور الالتهابي من الاستجابة المناعية ضد الإصابة بداء الليشمانيات الجلدي

تتكاثر الليشمانات داخل البالعات حتى تصل إلى أعداد كبيرة، مما يؤدي إلى انفجار البالعات و تحرر الليشمانات منها و التي تؤدي بدورها إلى إخماج بالعات أخرى. و بعد انفجار البالعات و تحرر الليشمانات منها، تتدفق أعداد أكثر من البالعات و الخلايا الالتهابية مثل العدلات و الحمضات و الخلايا البدينة إلى مكان العدوى و تزداد تراكيز السيتوكينات قبل الالتهابية proinflammatory cytokines التي تفرزها البالعات المخموجة مثل TNFα. تفعل السيتوكينات السابقة البالعات لقتل الطفيلي و ذلك من خلال تحريضها على إنتاج أكسيد النتريك NO في البالعات و زيادة في فعالية NADPH oxidase و بالتالي إنتاج المزيد من الوسائط الكسجينية الفعالة reactive oxygen species (ROS). تؤدي هذه الوسائط الفعالة (NO,ROS) إلى قتل وتخريب طفيليات الليشمانية التي تم بلعمتها (21)

تمتلك البالعات آليات دفاعية متعددة ضد الأجسام الغريبة داخلها. وكذلك تمتلك طفيليات الليشمانية استراتيجيات دفاعية تمكنها من مقاومة تلك الآليات والعيش في محيط عدائي جداً ضمن اليبلوع – 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 تمنع عملية تحول المشيقات التي تمت بلعمتها إلى الليشمانات

حدوث الهبة التنفسية، وبالتالي تبقى 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 و مقاومة حالات قتل الأحياء الدقيقة microbiocidal داخل اليباليع اليحلولية في البالعات من قبل الطفيلي من جهة أخرى (21).

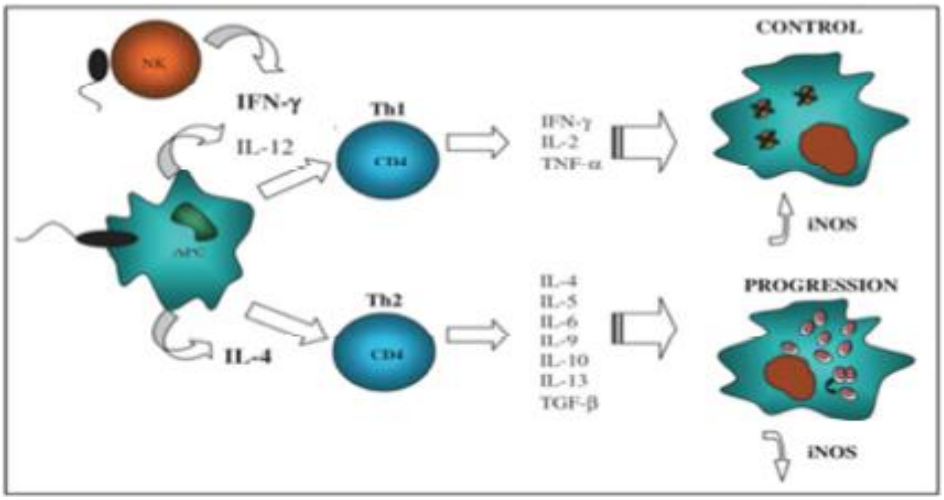
تؤدي الاستجابة المناعية السابقة إلى الإضرار بأنسجة المضيف (Pathologic tissue injury) وبالتالي تعزى التأثيرات المرضية التي تصاحب العدوى بطفيليات الليشمانية إلى الاستجابة المناعية للمضيف وليس إلى الطفيلي بحد ذاته. وتسمى هذه المرحلة من العدوى بالطور الثاني أو الطور الالتهابي phaseinflammatory ، الذي يتميز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

4-1-8 عملية ضبط تقديم المستضد

تؤدي البالعات والخلايا التغصنية، وهي من الخلايا المقدمة للمستضد، دور صلة الوصل ما بين المناعة الخلقية والمناعة التلاؤمية. ولها دور هام 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 (22). تتواكب هذه الهجرة مع نضج الخلايا المقدمة للمستضد ويترافق ذلك مع دخول جزيئات معقد التوافق النسيجي من الصنف الثاني MHC II بالنسبة للبالعات و جزيئات معقد التوافق النسيجي من الصف الأول و الثاني بالنسبة للخلايا التغصنية إلى اليباليع الحاوية على الليشمانات. يرتبط المعقد MHC مع الببتيدات التي تنشطر من الليشمانات نتيجة تأثير الأنزيمات 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 مباشر للخلايا التائية و ذلك نتيجة امتلاك الخلايا التائية لمستقبلات TCR تستطيع أن تتعرف على المعقد ببتيد-MHC و بالتالي الارتباط معها (23). 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 يرتبط مع المستقبل CD28 ، و هو مستقبل غشائي نوعي على سطح اللمفاويات التائية. يعتبر ارتباط مستقبل الخلية التائية TCR مع المعقد ببتيد – MHC و ارتباط الجزيء B7 مع المستقبل CD28 أموراً ضرورية لكي تظهر الخلايا التائية الاستجابة المثلى (24). يمكن أن يؤدي غياب الإشارة B7 المساعدة إلى أن تصبح الخلية التائية عاجزة عن الاستجابة للمستضد (25). يؤدي استقبال الخلية التائية الساذجة للإشارة المزدوجة إلى تفعيلها فتتمايز differentiation وتتكاثر. تتعرض معظم هذه الخلايا التائية المفعلة 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 سيتوكينات 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 النمط Th2 على إفراز مجموعة من السيتوكينات ، وهي IL-4 وIL-5 وIL-10 وIL- 13، التي تثبط تشكيل NO المسؤول عن قتل الطفيليات داخل البالعات و بالتالي تمنع قتل الطفيليات و التخلص منها. كما يحرض IL-12 المنتج من الخلايا التغصنية الخلايا التائية من النمط Th1 على إفراز IFN-γ و TNFα وIL-2، حيث تسهم السيتوكينات السابقة و خاصة الإنترفيرون غاما في تحريض البالعات على قتل الطفيلي عبر تشكيل NO.

و في الحقيقة يتم أيضاً تحريض إفراز الخلايا التائية لـ IFN-γ و IL-2، نتيجة تأثير IFN-γ المنتج من قبل الخلايا الطبيعية القاتلة NK الذي يسهم أيضاً بزيادة التعبير عن مستقبلات IL-12 على سطح الخلايا التائية الفعالة (26-27)، الشكل (8).



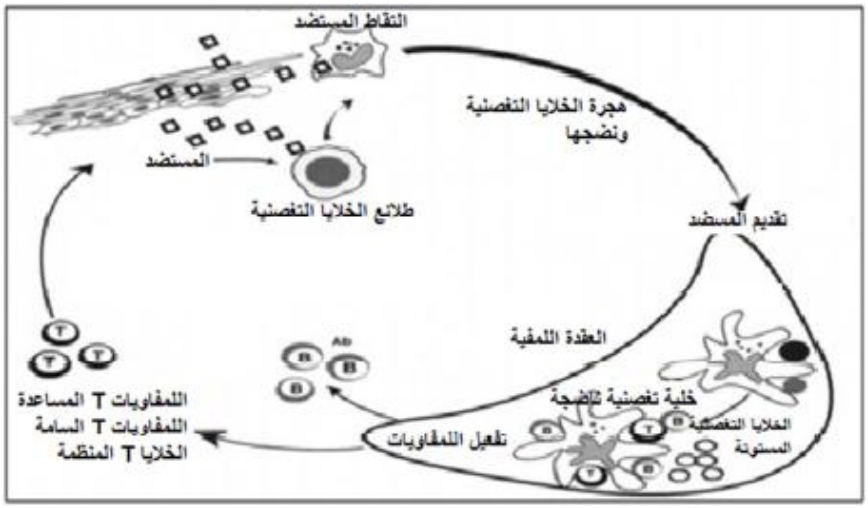
الشكل (8) الاستجابة المناعية الخلوية تجاه طفيليات الليشمانية. حيث ترتبط نمط المقاومة و الحساسية للداء على نمط السيتوكينات المفرزة، يحرض IL-4 المنتج من الخلايا التغصنية الخلايا التائية من النمط Th2 على إفراز IL-4 وIL-5 وIL-10 وIL-13 وTGF-β التي تثبط تشكيل NO المسؤول عن قتل الطفيليات داخل البالعات وبالتالي تمنع قتل الطفيليات. ويحرض IL-12 المنتج من الخلايا التغصنية و الـ IFN-γ و TNFα وIL-2، حيث تسهم السيتوكينات في تحريض البالعات على قتل الطفيلي عبر تشكيل NO (28).

تجول الخلايا 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 و الخلايا التغصنية ، لتهاجر بعدها إلى مكان العدوى وتتمايز إلى الخلايا البلاسمية لتنتج الأضداد. تتعرض الخلايا التغصنية بعد قيامها بتفعيل اللمفاويات (الخلايا CD4+ و الخلايا التائية السامة CD8+ و الخلايا البائية) للاستماتة (29)، الشكل (9).

تتفاقم الإصابة الجلدية في هذه المرحلة من العدوى حيث تظهر مكان العدوى الخلايا التائية + CD و الغلوبولينات المناعية IgG و الخلايا التائية ($CD8^+$, $CD4^+$) (30). تعتبر الغلوبولينات المناعية IgG ضرورية لطهاية الطفيلي و الارتباط مع المستقبل Fc الموجودة على سطح البالعات و الخلايا التغصنية. فقد أدى إخماج الفئران C57BL/6 تعاني من عوز في الخلايا البائية B و تفتقر إلى السلسلة غاما للمستقبل Fc بطفيليات

الليشمانية الكبرى إلى نقص أعداد الخلايا التغصنية المصابة بالطفيلي في مكان العدوى و نقص إنتاج IFN-γ من الخلايا التائية و تحولها من فئران مقاومة إلى فئران حساسة للإصابة مما يؤكد أهمية IgG في قدرة الخلايا التغصنية للطفيلي على بلعمة و تطوير مناعة فعالة ضد طفيلي الليشمانية (31).

تترافق حالات الشفاء من الإصابة الجلدية مع غلبة الخلايا المنتجة لـ IFN-γ بينما تترافق حالات عدم الشفاء مع غلبة الخلايا المنتجة لـ IL- 4 و IL-5. أما بالنسبة للطور المزمن chronic phase من الإصابة، فقد لوحظ استجابة مختلطة تنجم عن التأثير المشترك لكل من خلايا Th 1 و TH2 و تترافق مع زيادة في إنتاج الـ IL-10 و IL-2. تلعب الخلايا التائية المنظمة CD4 CD25 T reg دوراً رئيسياً في هذا الطور حيث تنظم الاستجابة المناعية للخلايا التائية عبر إفراز IL-10 و TNF-β . و قد تبين أن IL-10 يلعب دوراً هاماً في بقاء الطفيلي في حالة كمون، و يعتبر بقاء الطفيلي بشكل كامل في الخلايا التغصنية هاماً جداً لاستمرار بقاء لخلايا التائية الذاكرة. حيث تماثلت الفئران المعوزة لـ IL- 10 بمفرده، أو المعوزة لكل من IL-10 و IL-4 معاً، إلى الشفاء بشكل كامل من الطفيلي و لم يبق لديها أي طفيلي حيّ. كما تم التخلص من كامل الطفيليات عند الفئران C57BL/6 المعالجة، أثناء الطور المزمن، بأضداد مستقبل IL-10 (32-33).



الشكل (9) الخلايا التغصنية صلة الوصل ما بين المناعة الخلقية و المناعة التلاؤمية. تلتقط الخلايا التغصنية غير الناضجة المستضد بعد دخوله إلى العضوية و من ثم تهاجر إلى العقدة اللمفية و تنضج لتقدم المستضد إلى اللمفاويات التائية و البائية الساذجة مما يؤدي إلى تفعيل هذه الخلايا فتتمايز و تتكاثر و من ثم تهاجر إلى مكان العدوى و من ثم تتعرض الخلايا التغصنية للاستماتة بعد قيامها بتفعيل اللمفاويات.

2-8 المظاهر المناعية في داء الليشمانية الجلدي الفأري :

تم استخدام عدة نماذج حيوانية مثل الهامستر والكلاب و القرود لدراسة داء الليشمانيات الحشوية و الجلدية، لكن بسبب صعوبة و كلفة و نقص الكواشف reagents اللازمة لتحديد الاستجابة المناعية أعاقت استخدام هذه النماذج الحيوانية و تم استبدالها بالفئران المخبرية. إنّ توافر الفئران و الكواشف و الفئران المعوزة لإحدى الجزيئات المناعية، و التي تسمح بدراسة دور هذه الجزيئات في تطور المرض، جعلت من الفئران النماذج الحيوانية الأكثر أهمية لدراسة العلاقة بين المضيف و الطفيلي (34).

سمح توافر النماذج الفأرية المختلفة من فئران حساسة و أخرى مقاومة للإصابة بهذا الطفيلي، باكتشاف الدور الهام و المركزي للخلفية الجينية genetic background للمضيف في الإصابة بداء الليشمانيات.

حيث تشفى الفئران المقاومة مثل C57 BL/6 بشكل عفوي بعد تطوُّر آفة جلدية وتصبح عندها مقاومة لإصابة جديدة وبينما تتطور الإصابة عند الفئران الحساسة للإصابة مثل BALB/C وتستفحل الإصابة. سمح تحليل الرنا RNA المرسال المأخوذ من خلايا الطحال أومن الغدد اللمفاوية للفئران المصابة سابقاً بإيضاح الاختلافات الأساسية في نموذج اللمفوكينات المنتجة من قبلها. حيث تعبّر الفئران الحساسة BALB/C، بعد الإصابة بهذا الطفيلي، عن الرنا RNA المرسال الذي يرمِّز لـلإنترلوكين IL-4 وIL-10 بينما تعبر الفئران المقاومة C57 BL/ 6 عن الرنا RNA االمرسال الذي يرمِّز لـلإنترلوكينين IFN-γ وIL-12.

1-2-8 العلاقة بين نمط السيتوكينات المنتجة ومقاومة داء الليشمانيات الجلدي الفأري

أطلقت الدراسات على الفئران الحساسة والمقاومة لطفيليات الليشمانية الإشارة الأولى لاحتمال وجود علاقة بين نمط السيتوكينات المنتجة ومقاومة داء الليشمانيات. حيث سمحت معالجة الفئران الحساسة BALB/C، المحقونة بالليشمانية الكبرى L. major بالانترلوكين IL-12 والأضداد الوحيدة النسيِّلة للإنترلوكين IL-4 بتحفيز تطور الخلايا Th_1 والشفاء. بينما سمحت معالجة الفئران المقاومة وراثيّاً، المحقونة بالليشمانية الكبرى L. major، بالأضداد وحيدة النسيلة لكل من IL-12 وIFN-γ بتحفيز تطوُّر الخلايا Th_2 وبالتالي تحويل هذه الفئران المقاومة إلى حساسة للإصابة بالليشمانية. وبالتالي تتوافق هذه الدراسات مع الفرضيِّة القائلة بأنَّ IL-4 هام لتطوُّر الخلايا Th_2 بينما IL-12 وIFN-γ مطلوبين لتطوُّر الخلايا Th_1 (36). هذا ويعتقد بأنَّ الآليات السابقة (آليات تطوّر إمّا الخلايا Th1 أو Th2) تعود إلى الفروق في السيتوكينات المفرزة باكراً لحظة تماس الخلايا التائية غير المتمرسة مع المستضد وإلى الاختلاف في طبيعة الخلية المقدِّمة للمستضد Antigen presenting cell أوفي طبيعة المستضد بحد ذاته (36).

يعد IL-12 من أهم هذه السيتوكينات المفرزة في المراحل الباكرة من الإصابة حيث يفرز بشكل رئيس من الخلايا المقدمة للمستضد APC كالبالعات الكبيرة والخلايا المتغصنة (37) . بين Robert عام 2006 أن معالجة الفئران BALB/C، الحساسة

للإصابة بالليشمانية، بالإنترلوكين IL-12 تحولها إلى فئران مقاومة (38). كما بينت دراسة أخرى أن هذا الإنترلوكين ضروري لتوجيه الاستجابة المناعية في المراحل الأولى للإصابة إلى مناعة من النمط Th1 (39). أكدت الدراسات التي أجريت على الفئران C57BL/6 المعدلة جينياً، فئران تفتقر إلى جين الإنترلوكين IL-12، دور الإنترلوكين-12 في مقاومة الإصابة حيث أبدت هذه الفئران حساسية تجاه الإصابة بالليشمانية الكبرى *L. major* . كما تبين أن للإنترلوكين IL-18 دوراً مكملاً لـلإنترلوكين IL-12، حيث يعزز تقديم IL-18 للفئران BALB/C، المعالجة بتراكيز منخفضة من IL-12، المقاومة للإصابة بداء الليشمانيات لديها (39).

وبالتالي يعتقد أن المناعة الفعالة ضد طفيليات الليشمانية تعتمد على إنتاج IL-12 الذي يحرض إنتاج الإنترفيرون غاما IFNγ من الخلايا NK والخلايا T والذي يؤدي بدوه دوراً جوهرياً في مقاومة الخمج. لقد بينت التجارب في الأوساط الصنعية *In vitro* التأثير التآزري لكل من IFNγ وTNF-α،على تحريض البالعات لإنتاج جذور نترية حرة ذات تأثير قاتل للطفيلي (40). كما بينت التجارب دور IFN-γ المضاد للطفيلي في الحي *In vivo* أيضاً، حيث يتوسط IFNγ إنتاج NO وNO2 في البالعات مما يعزز عملية القتل داخل البالعات المخموجة للتخلص من الطفيلي. ولوحظ تفاقم الإصابة عند إخماج فئران معدلة جينياً، تفتقر إلى جين IFN-γ أو جين مستقبل IFN-γ، مما يؤكد النتائج السابقة حول دور IFN-γ (41). وتم التأكيد على دور IL-12 في الدراسات التي بينت أن تعديل IL-12 باستخدام أضداد الإنترلوكين IL-12، يؤدي إلى تفاقم الإصابة بكل من الليشمانية الكبرى *L. major* والليشمانيا الدونوفانية *L. donovani* (39).

هذا ويجب الإشارة للدور السلبي للإنترلوكين IL-4 حيث يتدخل لمنع التَّأثيرات الجيدة لـ IFN-γ، يعمل IFN-γ على تنشيط البالعات، ويعمل على تعزيز إنتاج الأضداد من قبل الخلايا اللمفاويِّة B (42). يشكل IL-4 عنصراً أساسياً في تطور استجابة مناعية من نمط Th2، حيث تحدث جميع الآليات المناعية القادرة على تحويل الاستجابة من النمط Th2 إلى Th1 كنتيجة لتثبيط إنتاج IL-4 في الأسبوع الأول من الإصابة بالخمج (48,49,50). ويؤكد ما سبق تثبيط الاستجابة المناعية من النمط Th2 الذي

حصلنا عليه عند معالجة فئران حساسة للإصابة بالليشمانية بأضداد الإنترلوكين IL-4، في بداية الإخماج بـالليشمانية الكبرى *L. major*، مما سمح بتطور استجابة من النمط Th1 وبالتالي تحول هذه الفئران لتصبح مقاومة للخمج . وهذا ما يشير بوضوح إلى كون IL-4 يوجه الاستجابة المناعية إلى استجابة من النمط Th2 وهو تأثير معاكس لتأثير الإنترلوكين IL-12 الذي يمكن أن يؤدي إلى تطور استجابة من النمط Th1 أثناء الأخماج بـالليشمانية الكبرى L. major (39). هذا ويبدو أن IL-4 يؤدي الى تراجع في التعبير عن IL-12 وIFNγ وعن مستقبل الانترلوكين-12، كما يثبط إنتاج NO ضمن البالعات (36). ويؤكد ما سبق شفاء الفئران BALB/C المخموجة بالليشمانية L. major، التي تعاني من عوز IL-4، لدى معالجتها بأضداد الإنترلوكين IL-4 (36).
وبالرغم من وفرة الأدلة على كون الإنترلوكين IL-4 يطور استجابة من النمط TH2، يؤدي إخماج فئران BALB/C المعوزة لـ IL-4، بإحدى سلالات الليشمانية الكبرى L. major الممرضة، إلى تفاقم الإصابة. وكما لوحظ أن الفئران المعوزة لكل من IL-4 وIL-13 معاً تبدي مقاومة أفضل من الفئران المعوزة لأحدهما فقط (37).

يلعب الإنترلوكين IL-13 دوراً بديلاً عن IL-4 في تحريض تمايز مناعة من النمط TH2 (37) فقد أدى إحداث طفرة تؤدي إلى زيادة التعبير عن IL-13 عند الفئران C57BL/6 المقاومة للخمج، المخموجة بإحدى سلالات الليشمانية الكبرى L. major، إلى تثبيط التعبيرعن IL-12 وعن IFNγ مما أدى إلى تحول هذه الفئران من فئران مقاومة إلى فئران سريعة التأثر بهذا الطفيلي حتى في حال غياب التعبير عن IL-4 (39).

بينت الدراسات امتلاك خلايا CD8T دوراً واضحاً في المناعة الأولية مما يسمح للفئرانC57BL/6 بمقاومة الإصابة عند إخماجها بطفيليات الليشمانية الكبرى L.major.
هذا وتفرز البالعات مجموعة من السيتوكينات مثل IL-6 ، وIL-10، وTGF-β. تقلل السيتوكينات السابقة من فعالية البالعات في قتل الليشمانية، وتنقص التعبير عن IL-12 من قبل الخلية المقدمة للمستضد، مما يؤدي بالنتيجة إلى تفاقم الاصابة (38). لكن يبدو أنه في جميع الحالات لا يمكن للفئران التخلص من الطفيلي بشكل كامل وذلك حتى في

الفئران المقاومة، حيث يبقى الطفيلي موجوداً بشكل كامن بالرغم من عدم ظهور الإصابة (38).

9- لقاحات الليشمانية:

9-1 تعريف اللقاح

هو مستحضر حيوي يحسن من مناعة الجسم تجاه مرض معيّن.يحتوي غالباً على المتعضية إمّا حية أو معطلة أو أجزاء منقاة منها. وهو غير قادر على التسبب بالمرض إلا أنه يحتفظ بالقدرة على تحفيز جهاز المناعة في الجسم للتعرف على العامل الممرض و القضاء عليه، و تذكره عي حال الإصابة به مرة أخرى (85).

9-2 القواعد المتبعة في تسجيل اللقاح

يتطلب اعتماد اللقاح حسب توصيات منظمة الصحة العالمية حتى يصبح معتمداً أن يمر بالمراحل التالية:

- **تجارب الطور الأول:** تهدف إلى تقييم الاستمناعية immunogenicity وسلامة safety اللقاح بالمقارنة بين مجموعة ملقحة ومجموعة شاهدة.
- **تجارب الطور الثاني:** التي تسمح بالتحقق من قدرة اللقاح على تأمين الحماية ضد إصابة مفتعلة.
- **تجارب الطور الثالث:** تسمح بتحديد فعالية اللقاح ضد إصابة طبيعية .

تطبق تجارب هذه الأطوار على حيوانات التجربة وهي الفأر ومن ثم القرد بالنسبة لليشمانية الجلدية، والفأر، ومن ثم الكلب بالنسبة لليشمانية الحشوية. وبعد ذلك تطبق بأطوارها الثلاثة على البشر حيث تجرى على عدد محدد من الأشخاص قد يصل إلى ألف شخص، فإذا تجاوز اللقاح هذه المراحل الثلاثة بنجاح يمكن له أن يسجل ويصنع ويستخدم في تجارب الطور الرابع.

- **تجارب الطور الرابع:** تطبق على عدد أكبر من الأشخاص يتراوح ما بين(10000-100000) شخص. هذا ويستخدم مصطلح vaccine efficacy VE للتعبير عن فعالية اللقاح المدروس (43)

3-9 مواصفات اللقاح المثالي

يجب أن يتمتع اللقاح بالمواصفات التالية:

- أن يكون آمن.
- أن يتوفر بأقل كلفة ممكنة.
- أن يكون خال من المنتجات الحيوانية التي تستخدم عادة في التصنيع.
- أن يؤدي التلقيح بعدد قليل من الجرعات إلى تشكيل مناعة طويلة الأمد عند معظم أنواع الليشمانية.
- ألا يؤدي إلى تطوير مناعة ذاتية أو فرط حساسية.
- أن يكون سهل التصنيع و التخزين و الإيتاء.
- أن يؤدي إلى تطوير مناعة خلوية و خلطية. (44)

4-9 لقاحات الجيل الأول first generation vaccines :

1-4-9 التلقيح بطفيلي الليشمانية leishmanization:

شكلت اللقاحات الحية لعدة سنوات الطريقة الوحيدة للسيطرة على الإصابة بداء الليشمانيات الجلدي و لا تزال تستخدم إلى الآن عند البشر في المناطق الموطونة بهذا الداء كما في أوزبكستان و أفغانستان و العراق و إيران خاصة خلال الحرب العراقية الإيرانية، إلا أنه تم التوقف عن استخدامها في العراق و إيران الآن بسبب مخاطرها المحتملة. يتم في هذه الطريقة حقن المشيقات الحية المفوعة في المناطق المغطاة من الجسم. تتمثل ميزات اللقاحات الحية بمايلي:

1- تحتاج لجرعة واحدة من أجل توليد مناعة طويلة الأمد.
2- تحرّض الاستجابة المناعية الخلقية و المكتسبة.
3- تحرّض الخلايا التائية من النمطين $CD4^+$ و $CD8^+$.
4- تحرض كل من الاستجابتين المناعيتين الخلطية و الخلوية.

أما مساوئ هذه اللقاحات فهي تطور حطاطات و إصابات جلدية لا يمكن التحكم بها لدى بعض الأشخاص، مما يمنع إمكانية استخدام هذا النمط عند الأشخاص المصابين بعوز مناعي. كما لوحظ انخفاض في فعالية هذا اللقاح نتيجة انخفاض فوعة الطفيلي الناجم عن تكرار زرعه. (45).

2-4-9 اللقاحات المحضّرة من الطفيليات المقتولة Killed parasite vaccine

شكلت الطفيليات المقتولة منذ ثلاثينات القرن الماضي أسلوباً فعالاً للحصول على لقاحات علاجية ووقائية. تظهر نتائج التلقيح على الكلاب أنه و برغم العديد من المخاطر المتولدة عن هذه اللقاحات، إلا أنّها تعد من أفضل استراتيجيات التلقيح. من ميزات هذه اللقاحات:

1- تحريض استجابة مناعية متواسطة بالخلايا التائية من النمطين $CD4^+$ و $CD8^+$ حيث تتطلب هذه الاستجابة معالجة و تقديم كلا النوعين من المستضدات الداخلية و الخارجية للطفيلي عن طريق جزيئات MHC I و MHC II .
2- ثبات تركيبها الحيوي و استضاديتها antigenicity.
3- ذات كلفة منخفضة و أمان أعلى بالمقارنة مع اللقاحات الحية.

أما مساوئ هذه اللقاحات:

1- لا تستطيع تحريض استجابة مناعية بالفعالية ذاتها التي تحرضها اللقاحات الحية و بالتالي تحتاج إلى جرعات داعمة لتحريض استجابة مناعية معتد بها.
2- تزيد من خطورة حدوث التفاعلات التحسسية بسبب الكميات الكبيرة المحقونة من المستضد، (45).

نستعرض فيما يلي أهم تجارب التلقيح بطفيليات الليشمانية المقتولة:

في عام 1983 تم حقن لقاح من الليشمانية الغوانية L. guyanensis المقتولة بمادة الميرتيولات دون استخدام أي مادة مساعدة عند المتبرعين الأصحاء وقد أعطى اللقاح فعالية تقدر ب 53% بعد 45 يوم من اللقاح، أما في الأكوادور فقد سمح استخدام مزيج

من طفيليات الليشمانية الأمازونية L. amazonensis والبرازيلية L. brazelensis والغوانية L. guyanensis المقتولة بالفينول مع لقاح BCG كمادة مساعدة بوقاية بلغت تقريبا 73% من الأشخاص المصابين (46) .

في إيران تم استخدام مزيج من طفيليات الليشمانية الكبرى L.major المقتولة بالحرارة ولقاح BCG كمادة مساعدة إلى تحول 83% من الأشخاص الذين لديهم تفاعل الليشمانين الجلدي leishmania skin test (LST) سلبي إلى أشخاص إيجابيي التفاعل، هذا وقد أدى استخدام هذا اللقاح في السودان ضد خمج الليشمانية الحشوية إلى انقلاب التفاعل عند 43% فقط من الأشخاص الملحقين، هذا ولم يؤد تطبيق ثلاث جرعات من هذا اللقاح بدون مادة مساعدة في إيران إلى تحقيق نسبة أعلى من السابق مما يشير إلى ضرورة استعمال المواد المساعدة (46).

و بهدف زيادة الفعالية المولدة للمناعة لمزيج طفيليات الليشمانية الكبرى المقتولة بالحرارة الرطبة (autoclaved L.major) AML ولقاح BCG تم استخدام مادة هيدروكسيد الألمنيوم حيث تدمص AML على هذه الهلامة ثم تمزج قبل الحقن مباشرة مع لقاح BCG حيث يصبح اللقاح مؤلف منBCG +AML alum وقد أدى استخدامه إلى تحريض مناعة خلوية من النمط TH1 (48)

استخدم أيضا IL-12 كمادة مساعدة مع طفيليات الليشمانية الكبرى المقتولة بالحرارة وسمح بتحريض استجاعة مناعية من النمط TH1 عند القرود ،لكن لم يسمح بتأمين الحماية عند القرود عند الإصابة مجدداً (62) وأظهرت دراسة أجريت في الهند أن بمزيج طفيليات الليشمانية الدونوفانية المقتولة بالحرارة الرطبة autoclaved Leishmania donovani (ALD) ولقاح BCG يقدم حماية كبيرة للهامستر ضد خمج الليشمانية الحشوية (49).

سمح تطبيق جرعة وحيدة من لقاح AML+BCG على متبرعين أصحاء في إيران بالحصول على استجابة مناعية من النمط TH1، لكن هذه الاستجابة كانت منخفضة مقارنة مع استجابة الأشخاص المصابين بداء الليشمانية الجلدي، وبالتالي يجب اختبار

جرعات مخلفة من اللقاح السابق أو اختبار مواد مساعدة أخرى للوصول إلى الاستجابة المناعية الكافية (64).

كما حرض تمنيع الكلاب بمزيج من الأشكال المتحركة لطفيليات الليشمانية البرازيلية L. braziliensis المقتولة بالحرارة والسابونين كمادة مساعدة استجابة مناعية قوية ضد خمج الليشمانية الحشوية (50).

5-9 لقاحات الجيل الثاني second generation vaccines

1-5-9 اللقاحات الحية مضعفة الفوعة Live attenuated leishmania vaccines

تشتق هذه اللقاحات من النمط البري للطفيلي wiled type المنمّى في شروط طبيعية و الخاضع لبعض التعديلات لإضعاف فوعة الطفيلي إما عن طريق الزرع المتكرر في المستنبتات أو العوامل الكيميائية أو الحرارة أو الإشعاع. تكون هذه الطفيليات غير مفوّعة و غير ممرضة إلا أنها تحتفظ بقدرتها على النمو و التكاثر و تحفيز الجهاز المناعي. تحرّض هذه اللقاحات استجابة مناعية متواسطة بالخلايا عن طريق معالجة و تقديم المستضدات بواسطة جزيئات MHC I و MHC II و الذي يعد أمراً جوهرياً لتحريض العوامل الممرضة داخل الخلوية. تتجلى ميزات هذه اللقاحات بما يلي:

1- توليد استجابة مناعية قوية خلوية و خلطية كالتي تتولد نتيجة الإصابة الطبيعية بالطفيلي.
2- تؤمن استجابة مناعية مدى الحياة.
3- آمنة الاستعمال

مساوئ هذه اللقاحات:

1- تحتاج إلى جرعة داعمة للحفاظ على المناعة ضمن الأفراد.
2- لا يمكن لكل المرضى تلقي اللقاحات الحية المضعفة كالمرضى المصابين بفيروس HIV و ذلك بسبب تضرر جهازهم المناعي.
3- خطورة الانقلاب إلى الحالة المفوّعة عند حقنها للإنسان. (45).

سمح إضعاف فوعة طفيليات الليشمانية الكبرى بواسطة أشعة غاما و حقنها في الفئران Balb/c أو الفئران CBA بتأمين حماية لهذه الفئران ضد الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى. هذا و لم يؤد حقن *I. major* و *I.mexicana* المضعفة الفوعة نتيجة لتكرار زرعها في الوسط الزرعي الحاوي على تركيز عالي من الجنتاميسين يبلغ 20مكغ/مل إلى ظهور إصابة لدى الفئران Balb/c حتى بعد حقنها بطفيليات الليشمانية ذات الفوعة (51).

سمحت تطور التقانات المورثية بتعديل بعض مورثات طفيليات الليشمانية و تحويل هذه الطفيليات إلى ذراري مضعفة جينياً لها القدرة على توليد الاستجابة المناعية الناجمة عن الإصابة بطفيليات حية مفوعة دون أن تسبب التظاهرات السريرية المرافقة للداء. هذا وقد سمح معرفة التسلسل المجيني لطفيليات الليشمانية بإمكانية إزالة أو حجب أو استبدال مورثات معينة، والحصول على طفيليات معدلة مورثياً تعرف باسم knock-out parasites (52).

تعتبر ذراري *I. major* التي لا تملك الجين المرمزة لأنزيم Dihydro Folate Reductase Thymidylate Synthase DFRS أول الطفيليات المعدلة مورثياً فقد أكدت دراسة في أمريكا عام 1995على قدرة هذه الطفيليات المعدلة على تحريض استجابة مناعية من النمط Th1 عند الفئران BALB/C. وأكسبت الفئران حماية من الإصابة عند إعادة الإخماج. لكن تبيّن عدم قدرة هذه الطفيليات في حماية القرود عند إعادة الإخماج (35).

يؤدي حذف الجين المرمزة للفوسفو غليكان السطحي لدى *I. major* إلى الحصول على ذراري (lPg2) تستطيع البقاء أكثر من سنتين من دون أن يترافق وجود الطفيليات لدى الفئران مع ظهور أية إصابات حتى في حال نقص مناعة هذه الفئران بالإضافة إلى تقديم الحماية لهذه الفئران ضد *L. major* ذات الفوعة الطبيعية. *و قد أجريت هذه الدراسة في البرازيل عام* 2003 على فئران BALB/C (54).

تمكن الباحثون في المملكة المتحدة عام 1998 من تحضير *L.mexicana* مطفرة (ΔCP) من خلال حذف المورثات المرمزو لإنزيمات cysteine proteinase (cp)

حيث تلعب هذه الإنزيمات دوراً هاماً في أُمراضية من خلال توجيه الاستجابة المناعية نحو النمط Th 2. وقد تم تحديد ثلاث مورثات مسؤولة عن ترميز هذه المجموعة من الإنزيمات و هي جين CPa و جين CPb و جين CPc. وبالتالي تم الحصول على مجموعة من الأنماط المطفرة لطفيليات الليشمانية المكسيكية *L.mexicana* تختلف حسب الجين المستهدفة: طفيليات ΔCP حذفت لديها جين CPa، وطفيليات ΔCPb حذفت لديها جين CPb، وطفيليات ΔCPa/ΔCPb حذفت لديها جين CPa مع جين CPb. و قد أكدت هذه الدراسة أن إمراضية الطفيليات ΔCPa مماثلة إلى حد 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 و تحول 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 و إمراضية الطفيلي و تعديل الاستجابة المناعية و بالتالي إمكانية الحصول على لقاح ضد هذه الطفيليات (55).

في أمريكا عام 2009 استخدمت طفيليات الليشمانية الدونوفانية التي أحدثت فيها طفرة ضمن جينة LdcEN-1L.donovaniccentrin null التي تشفر لبروتين ال centrin. تسبب هذه الطفرة تثبيط النمو بشكل إنتقائي بمرحلة الطور السوطي من تطور الطفيلي. بروتين الcentrinهو عبارة عن بروتين يرتبط بالكالسيوم cytoskeletal وله دور في تضاعف السنتروزوم عند حقيقيات النوى الأرقى. في حين استطاعت الفئران الممنعة بهذه الطفيليات المضعفة التصفية والتخلص من كامل طفيليات التحدي المفوعة خلال 10 أسابيع بعد التحدي، ويتمثل ذلك بانخفاض انتشار الطفيلي في الطحال وانعدام وجوده في الكبد ، وقد تمت ملاحظة حمل كبير وعالي للطفيلي عند الفئران الممنعة مسبقا بالطفيليات المقتولة بالحرارة أو عند الفئران غير الممنعة مطلقاً.

في أستراليا عام 2008 سمح التمنيع بطفيليات الليشمانية الكبرى *L. Major* التي حذفت منها جين phosphomannomutase(PMN) بحماية الفئران الحساسة تجاه الخمج

نتيجة لارتفاع مقدار استجابة الخلايا التائية Th1 وكبت كل من IL-10 و IL-13 التي يتم إنتاجها بشكل مبكر عند بداية الخمج (45).

في ايران عام 2009 سمح حقن الفئران الحساسة BALB/C بطفيليات *L.tarentolae* التي تعبرعن جين الفوعة A2 (حيث أنّ A2 بروتين سطحي مميز للشكل اللشماني لمعقد *l.donovani*)المضعفة والمأشوبة بحماية هذه الفئران ضد التحدي بالليشمانية الطفلية *L.infantum*، وقد ترافقت هذه المناعة المتشكلة مع ارتفاع مستويات IFNγ قبل التحدي وخلاله (45).

في إسبانيا عام 2011 سمح الحقن الوريدي أو تحت الجلد للفئران BALB/C بسلالة الليشمانية الطفلية *L.infantum* والتي حذفت منها جينة HSP70 type 2 كلقاح ضد خمج الليشمانية الكبرى *L. major*، إلى إنتاج مستويات مرتفعة من أكسيد النتريك وتطور استجابات مناعية مميزة ضد خمج الليشمانية الكبرى *L. major*(45).

2-4-9 التلقيح باستخدام مستضدات مأشوبة لطفيليات الليشمانية recombinant antigens :

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

من ميزات هذه اللقاحات:

1- آمنة
2- لا تتداخل مع المناعة الخلقية أو مع لقاحات أخرى
3- تحرض استجابة مناعية قوية

إلا أن لها مجموعة من السلبيات وهي:

1- تحتاج إلى مواد مساعدة لتعزيز قدرتها الاستمناعية و تحويل نمط الاستجابة المناعية إلى Th1 لأن البروتين لوحده كلقاح يحرض استجابة مناعية فقط من النمط Th2 .
2- مكلفة
3- إمكانية تلوثها بالمواد الجرثومية.
4- نحتاج إلى حقن كميات كبيرة من المستضد لتأمين الاستجابة المناعية المطلوبة (45).

أدى تمنيع القرود بالمستضد gp63 المأشوب، مع BCG *Bacille Calmette–Guerin* كعامل مساعد إلى توليد مناعة جزئية لديها.

كما أدى تمنيع الفئران BALB/c في إيران عام 2007 بالمستضد gp63 المأشوب مع cytosine phosohate guanosine oligodeoxy nucleotide (CPG-ODN) كعامل مساعد إلى زيادة الاستجابة المناعية و تأمين الحماية للفئران الممنعة ضد طفيليات *L. major* و ترافقت هذه الحماية مع مستويات عالية من IFN-γ و مستويات منخفضة من IL-4 و زيادة في نسبة الأضداد IgG2a/IgG1 (56).

أدى تمنيع الفئران CBA في أمريكا عام 1993بالجزيء GP46/M2 المستخلص من طفيليات الليشمانية الأمازونية وبوجود Corynebacterium parvum *(C. parvum)* كعامل مساعد، ثم إخماجها بالنوع نفسه من الليشمانية إلى الكشف بأن فئران 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 و زيادة في نسبة الأضداد IgG2a/IGg1 (57).

أظهرت دراسة أخرى في كندا عام 2003 أن تمنيع فئران BALB/c بمستضد (LACK) Leishmania homolog of receptors for Activated C Kinase كبروتين مأشوب لوحده لم يحقق الحماية ضد طفيليات *L. major* لكن أدى حقنه مع rIL-12 كمادة مساعدة إلى تحريض حماية جزئية لدى الفئران الممنعة . إلا أن دراسة أخرى أظهرت قدرته على تحريض استجابة مناعية وقائية واضحة تجاه الإصابة بطفيليات *L.amazonensis* عند فئران BALB/c (58).

سمح استخدام لقاح مكون من مزيج CPa وCPb مع مزيج العاملين المساعدين CpG-ODN و Montanide 720 في أستراليا عام 1995 بتحريض استجابة مناعية من النمط Th1 و بالتالي حماية الفئران BALB/C من الإصابة بطفيليات الليشمانية الطفلية (59).

كما بينت دراسة قدرة البروتين (HaspB 1) Hydrophilic acylated surface protein B في بريطانيا عام 2000 على توليد المناعة و تأمين حماية الفئران BALB/C ضد الإصابة بالليشمانية الدونوفانية (60).

بينت دراسة في سويسرا عام 2003 قدرة الهيستون H1 بالمشاركة مع العامل المساعد Montanide ISA 721 حماية القرود من الإصابة بالليشمانية الجلدية التي تسببها الليشمانية الكبرى *L. major* (61).

أظهرت دراسة في إيران عام 2007 أنه قد تمكن لقاح مكون من المستضدين البروتين Thiol specific antioxidant (TSA) و بروتين LmSTI1 و كل من الإنترلوكين 12 و هلامة هيدروكسيد الألمنيوم كعاملين مساعدين من تأمين حماية قوية للفئران BALB/C و القرود ضد طفيليات الليشمانية الكبرى المسببة لداء الليشمانيات الجلدي. كما تمكن اللقاح Leish-111f المكون من مجموعة من البروتينات المأشوبة من حماية الفئران من الإصابة بالليشمانية الجلدية و الحشوية. حيث يحتوي هذا اللقاح على البروتين TSA ل *L. major* وبروتين LmSTI1 لطفيليات الليشمانية الكبرى، و بروتين (LeIF) elongation and initiation factor لليشمانية البرازيلية و ذلك في صيغة واحدة مع العامل المساعد MPL-SE و هو مكون من لبيد أحادي الفوسفوريل monophosphoryl

lipid MPL و السكوالين squalene. لكن اللقاح السابق لم يستطع حماية الكلاب الملقحة به من الإصابة في تجارب الطور III (62).

5-9 لقاحات الجيل الثالث Third generation vaccines

1-5-9 لقاحات DNA

تحرض لقاحات الدنا استجابة مناعية كاملة ضد المستضد الذي ترمز له ، وتسمى أيضا لقاحات الدنا العاري naked DNA vaccines. يشكل التمنيع باستخدام الدنا مقاربة واعدة وانقلاباً جديداً في مجال المعالجة والحماية من الأمراض المعدية. حيث تنسل المورثات المرمزة للبروتينات الهدف ضمن بلاسميد ثم يتم حقن الدنا بشكل مباشر ضمن الأدمة أو ضمن العضل. تلتقط الخلايا التغصنية المستضدات المفرزة من خلايا العضلات إلى الفراغات الخلوية للعضلة. ترتبط تسلسلات الـ CpG غير الممتيلة الخاص بالبكتريا المستخدمة كناقل non-methylated CpG sequences of bacteria بالمستقبل TLR- 9 الموجود على سطح الخلايا التغصنية و يحرض اصطناع الإنترلوكين 12 و 18 اللذان يحفزان الخلايا التائية الساذجة على التمايز إلى Th1 و التي تولد بدورها مناعة متواسطة بالخلايا، و تحفز الخلايا T السامة، وتحرض كذلك الخلايا البائية B cells على اصطناع أصناف محددة من الأضداد مثل IgG2 في الفئران، و يلعب مجموع الخلايا السابقة بأكملها دوراً هاماً في توفير الحماية ضد الإصابة بطفيليات الليشمانية طبيعية الفوعة (45).

يتم التعبير عن بروتينات المستضدات المستخدمة بواسطة الخلايا حقيقية النوى الموجودة في هذا الموقع والتي تقوم بأخذ البلاسميد المرمز للمستضدات الهدف. تستخدم لقاحات الدنا جزيئة دنا مفردة لجينة مفردة أو مجموعة جينات ضمن بلاسميد يرمز لعدة مستضدات. تمتاز لقاحات الدنا بأنها طريقة تمنيع آمنة جداً طالما أنها لا تحتوي على أية متعضيات ممرضة قد تستعيد فوعتها لاحقا ضمن المضيف (45).

تتميز لقاحات الدنا بخصائص متعددة تجعلها متميزة عن باقي اللقاحات و هي:

1- آمنة

2- سهلة التصنيع و رخيصة الثمن.
3- ثابتة بمختلف درجات الحرارة مما يجعل عملية النقل و التخزين سهلة و رخيصة.
4- يمكن تجميع مورثات متعددة تعبر عن عدة مستضدات وبالتالي تشكيل مناعة ضد معظم أنواع الليشمانية.
5- تحرض استجابة مناعية خلوية من النمط Th1 (45).

سمح استخدام لقاح دنا المكون من مزيج البلاسميدات لكل من TSA و1 LmSTI و LACK في كندا عام 2002 بتأمين حماية للفئران C57BL/6 المقاومة للإصابة و الفئران BALB/c الحساسة للإصابة من الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى (45).

و أكدت دراسة أخرى في إيران عام 2001 أن لقاح الدنا 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 و بالتالي حمايتها من الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبرى. هذا و لم يسمح استخدام كل بلاسميد على حدة بتحقيق ما سبق (63).

سمح حقن الفئران BALB/c بلقاح الدنا للبروتين الريبوزومي الحمضي لطفيليات الليشمانية الطفلية *L. infantum* acidic ribosomal protein P0 LiP 0 في إسبانيا عام 2003، بحمايتها من الإصابة بالليشمانية الكبرى (64).

أدى حقن الفئران BALB/c في إسبانيا عام 2009 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 للمورثات السابقة إلى زيادة الاستجابة المناعية و تأمين حماية ضد الإصابة بالليشمانية المكسيكية (65).

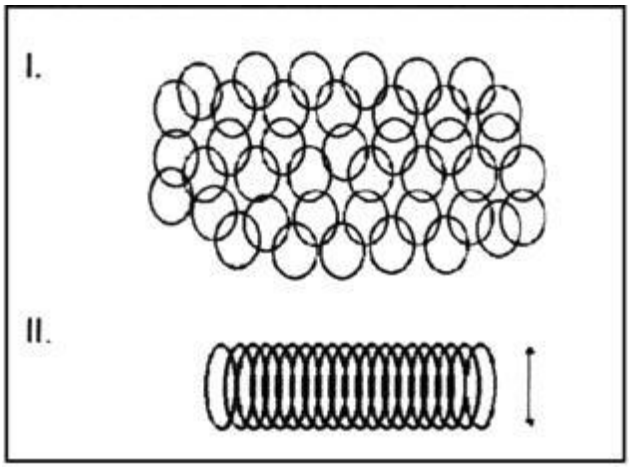
سمح لقاح DNA المكون من مزيج بلاسميدات الهيستونات الأربعة H2A و H4 وH3 وH2B في أستراليا عام 2011، بحماية الفئران BALB/C من الإصابة بالليشمانية الكبرى (66).

أدى لقاح الدنا لجين المستضد A2 في الهند عام 2005 إلى حماية الفئران من الإصابة بالليشمانية الدونوفانية. و قد أدى استخدام لقاح دنا يحوي جين المستضد KMP-11 إلى حماية الهامستر من الإصابة بالليشمانية الدونوفانية (67).

لكن و بالرغم من ميزات لقاح الدنا آنفة الذكر فإنها لم تصل حتى اليوم إلى مرحلة تجارب الطور III.

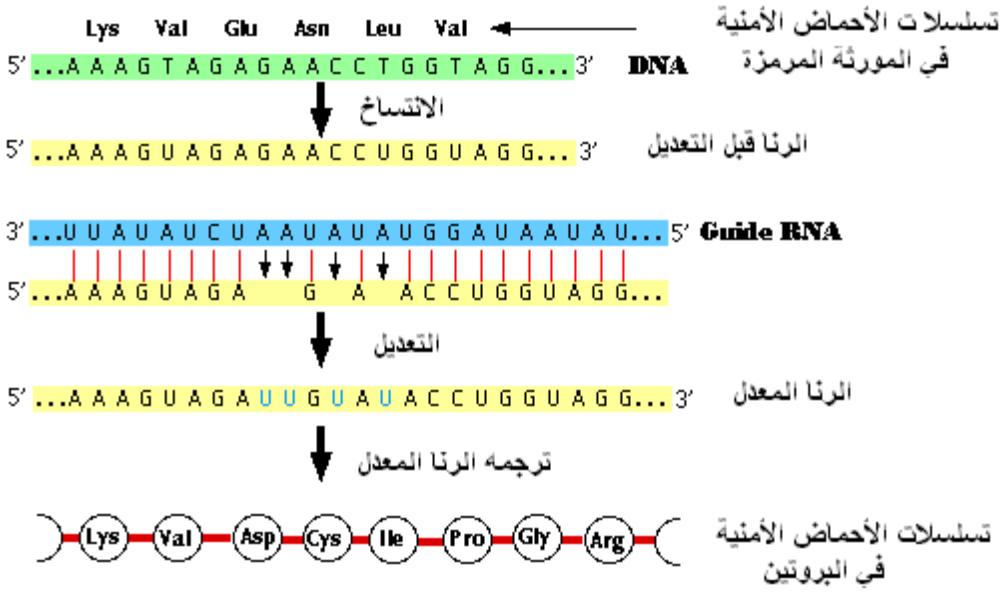
10- لمحة عامة عن جينوم الليشمانية

تعتبر الليشمانية بشكل عام من الأحياء مضاعفة الصيغة الصبغية diploid بالرغم من وجود صبغيات مختلفة الصيغة الصبغية aneuploid. يتألف جينوم الليشمانية من نوعين من الدنا : دنا نووي nuclear DNA ودنا منشأ الحركة kinetoplastide DNA. يملك الدنا النووي في صيغته الأحادية haploid 32816678 أساساً نووياً منظماً في 36 صبغي والذي يحوي 911 جين للرنا و 39 جين كاذبة pseudo-genes و8272 جين معلومة مسؤولة عن ترميز البروتين. أمّا دنا منشأ الحركة kinetoplast DNA يمثل الدنا المتقدري في ذوات منشأ الحركة kinetoplasteda ويشكل (10-20%) من الدنا الكلي. يكون دنا منشأ الحركة على شكل شبكة من دنا حلقي متسلسل يقسم إلى صفين: حلقات كبيرة maxcircle متجانسة وحلقات صغيرة minicircles متغايرة. يبلغ عدد الحلقات الكبيرة حوالي 25-50 نسخة بطول kb20 تقريباً، وتتألف من أجزاء متشابهة ذات تركيب ثابت في كل أنواع الليشمانية. ويبلغ عدد الحلقات الصغيرة حوالي 10000 نسخة تقريباً و تتألف من أجزاء مصانة و أخرى متغيرة و يختلف تركيبها بين أنواع الليشمانية و يبلغ طولها kb 0,8 تقريباً (69) الشكل (10).



الشكل (10) دنا منشأ الحركة I في الزجاج و تمثل كيفية تداخل الأقراص في المستوي . II في العضوية كيفية تكدس الأقراص (71)

تكون الحلقات الكبيرة في الدنا المتقدري مسؤولة عن تشفير بروتينات الميتوكوندريا وهي غالباً أنزيمات تدخل في الحلقة التنفسية للطفيلي ، والتي تسمح بإنتاج الطاقة. تتعرض قطع الرنا المنتسخة من هذه الجينات إلى تعديلات ما بعد الانتساخ post-transcription editing ، والتي تتمثل بإضافة أو حذف ثمالات اليوريدين uridine لإعطائه الشكل النهائي الذي يطرأ عليه بعد الترجمة. تعتبر جزيئات guide RNA هي المسؤولة عن تأمين تلك المعلومات الوراثية من أجل عملية التحرير editing كما يوضح الشكل (11) حيث أنّ الحلقات الصغيرة هي التي ترمز للرنا القائد guide RNA المسؤول عن تحرير الرنا الرسول (70) .



الشكل (11) عملية التعديل بعد الانتساخ التي تطرأ على الرنا المنتسخ من الحلقات الكبيرة

1-10 الحلقات الصغيرة في دنا منشأ الحركة

يحتوي الدنا المتقدري على 10000 حلقة صغيرة في الخلية والتي يبلغ حجم كل منها حوالي 800 زوج أساس، و تتألف كل حلقة صغيرة من منطقة مصانة conserved region في جميع أنواع الليشمانية بطول 200 زوج أساس، و منطقة متغيرة variable region بطول حوالي 600 زوج أساس.

تنبع أهمية المنطقة المتغيرة في دنا منشأ الحركة من :

- استخدامها للتمييز بين سلالات الليشمانية عن طريق الهضم بأنزيمات الهضم لإعطاء نموذج رحلان بمثل البصمة الوراثية لكل سلالة .
- ترمز المنطقة المتغيرة variable region للرنا القائد guide RNA المسؤول عن تحرير الرنا المرسال. حيث تتعرض قطع الرنا المنتسخة من هذه المورثات إلى عملية تعديلات ما بعد الانتساخ post-transcription editing و التي تتمثل بإضافة أو حذف ثمالات اليوريدين uridine لإعطائه الشكل النهائي الذي يطرأ عليه

الترجمة. حيث تعد هذه العملية واحدة من الآليات التي تتحكم بالتآثر بين المضيف و الطفيلي (73).

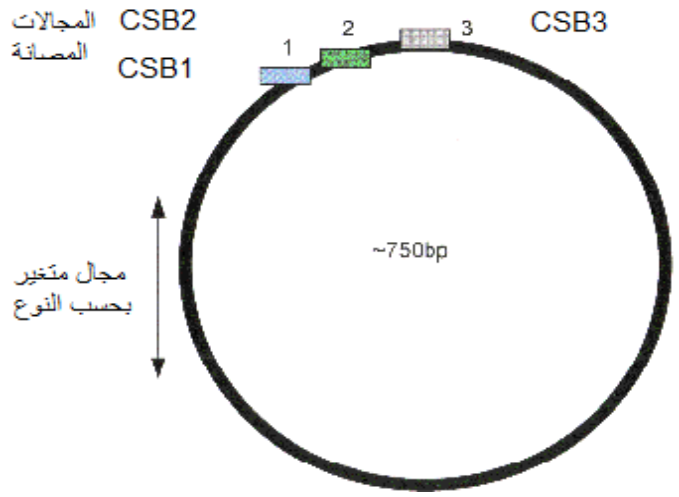
تعتبر جزيئات guide RNA المسؤولة عن تأمين تلك المعلومات الوراثية من أجل عملية التحرير editing . تصنف الحلقات الصغيرة إلى عدة صفوف تبعاً لعدد المورثات التي ترمّز للرنا القائد guide RNA المسؤول عن تحرير الرنا المرسال.

تنبع أهمية المنطقة المصانة conserved region من:

وجودها في كل صفوف الحلقات الصغيرة. تتألف من ثلاث مناطق تكون تسلسلاتها مصانة إلى حد كبير conserved sequence block تسمى (CSB1) 5'GGGCGT 3' و (CSB2) 5'CCCCGTTC 3' و (CSB3) 5'GGGGTTGGTGTA 3' وهي المسؤولة عن التضاعف البدئي للحلقة الصغيرة .

وتكون المناطق المصانة متماثلة بين الأنواع بنسبة 90-100%.

و بالتالي تم استخدامها هدفاً مثالياً لتصميم المشارع primers التي تستطيع تضخيم المجال المصان في كل صفوف الحلقات الصغيرة في أنواع الليشمانية (68-72).



الشكل (12) الحلقة الصغيرة في دنا منشأ الحركة عند طفيليات الليشمانية.

2-10 الجين المشفر لتحت الوحدة الريباسية الصغيرة :

يمثل الرنا الريباسي 80% من الرنا الكلي الموجود بحالة ثابتة - steady state في حقيقيات النوى(74). تتواجد جزيئات الرنا الريباسي في معظم الأنواع بشكل منظومات ترادفية tandem repeats متجمعة في موقع واحد أو عدة مواقع . كل منظومة ترادفية من الدنا الريباسي مفصولة عن الوحدة التي تجاورها بمفساح بين الجينات intergenic spacer (IGS) . يتم انتساخ وحدة الدنا الريبوزومي بواسطة الأنزيم RNA polymerase I (pol I) والذي ينتج طليعة كبيرة (35-47S) التي تتضمن كلا المفساحين المنتسخين الداخلي و الخارجي (ETS , ITS) . إن الإزالة اللاحقة للمفساحين الداخلي والخارجي تؤدي إلى توليد جزيئات الرنا الريباسي 28S , 5.8S , 18S .

إن جزيئة 18S هي جزء من تحت الوحدة الصغيرة (SSU) من الجسيم الريباسي ، بينما تشكل جزيئات الرنا الريباسي 5.8S و 28S تحت الوحدة الكبيرة من الجسيم الريباسي.

يمتاز المجال ITS1 بشكل خاص بأهمية كبيرة في تنميط طفيلي الليشمانية و ذلك لصغر حجمه ولكون طرفي المجال مصانين بشكل كبير مما يسمح بتصميم مشرعات primer لهما لتضخيم ITS1 . ولقد تم استخدام تضخيم ITS1 كهدف لتشخيص الليشمانية وللتعرف على الأنواع المختلفة.

تتألف جين 18S من 2127 زوج أساس ، و تكمن أهميتها في أنها مصانة بشكل كبير بين أنواع الليشمانية . يمتلك كل طفيلي 160 نسخة منها في الجينوم. تم استخدام تتالي جين 18S من قبل Van Eye وزملائه لتطوير طريقة حساسة للكشف عن دنا الليشمانية في العينات السريرية، وذلك باستخدام الجزء المركزي من تسلسل هذه الجين كهدف لتفاعلات PCR (75).

11- التنسيل الجزيئي molecular cloning

يشير مصطلح التنسيل الجزيئي إلى عزل الجين و إدخالها ضمن ناقل vector، وهو عبارة عن دنا دائري مغلق ثنائي الطاق يمتلك منشأ التضاعف origin of replication يمكّنه من التضاعف ضمن المضيف. يتضمن تنسيل الجين أربع خطوات:

1- عزل شدفة الدنا الهدف insert.
2- ربط شدفة الدنا المستخلصة ضمن ناقل تنسيل مناسب (بلاسميد) لتخليق جزيئة دنا مأشوبة.
3- إدخال البلاسميد المأشوب ضمن المضيف.
4- تقصي دخول البلاسميد المأشوب إلى المضيف.

الدنا المأشوب هو الدنا الذي يتم تخليقه اصطناعياً اعتباراً من جزيئتي دنا أو أكثر مختلفتي المصدر لتكوين جزيئة واحدة مأشوبة. يتم تحضير شدفة الدنا المراد تنسيلها إما عن طريق اقتطاعها من الدنا الأصل بواسطة أنزيمات الهضم، أو الحصول عليها مباشرة بواسطة تفاعل التضخيم السلسلي PCR (84).

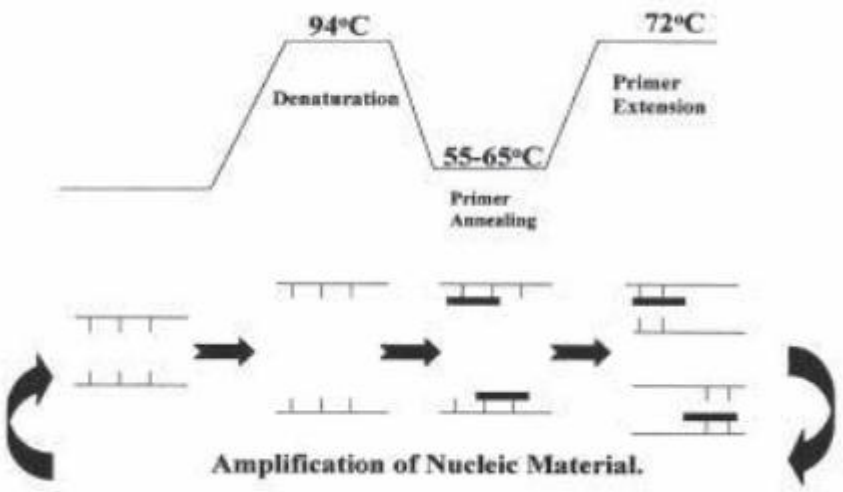
البلاسميد plasmid هو قطعة دنا دائرية صغيرة، وتتواجد بشكل مستقل عن الدنا الكرموزومي أو المجيني للمضيف و تتضاعف ضمن المضيف. يتم جعل البلاسميد خطياً بواسطة تهضيمه بأنزيمات الهضم. ثم تُعدّل نهايات كل من شدفة الدنا المراد تنسيلها DNA of interest و البلاسميد الناقل plasmid vector ، لتصبح متوافقة مع بعضها ليتم ربطها فيما بعد بواسطة DNA ligase. وذلك عن طريق الروابط الفوسفورية ثنائية الإستر لتصبح شدفة الدنا جزءاً من جزيئة جديدة هي البلاسميد المأشوب recombinant plasmid التي تتضاعف ضمن المضيف. يسمح البلاسميد الناقل plasmid vector لشدفة الدنا المراد تنسيلها بالتضاعف بسهولة و بكميات كبيرة، و يوفّر أيضاً العناصر الأساسية للضبط ليتم استخدامها في توجيه الانتساخ و الترجمة (84).

يتم استخدام أنزيمات الهضم (إندونكليازات التقييد) لتوليد شدف دنا لها نهايات ذات تسلسل نوعي متمم، بحيث ترتبط مع بعضها بواسطة DNA ligase قبل أن يتم إدخالها إلى المضيف بواسطة الاستحالة Transformation. يتطلب ذلك تحضير كل من شدفة الدنا المراد تنسيلها insert، والبلاسميد الناقل، وذلك بقطعهما بأنزيمي هضم مختلفين لتوليد نهايتين غير متوافقتين للشدفة ولكنهما متتامتين مع نهايتي البلاسميد، ليتم ارتباطها بشكل مباشر وتقليل نسبة البلاسميد الملتحم مع نفسه من جديد بعد الهضم. من ثم تتم تنقية هذه الشدف وربطها مع البلاسميد، وذلك لإجراء عملية الاستحالة ضمن سلالة جراثيم E . coli مخصصة للتنسيل. فتصبح المستعمرات الجرثومية التي تلقت البلاسميد المأشوب مقاومة للصاد الحيوي الذي توجد مورثته ضمن البلاسميد، وبالتالي تستطيع النمو على وسط مغذي يحتوي على هذا الصاد الحيوي. يتم إجراء التقصي للمستعمرات النامية بواسطة إجراء تفاعل PCR للبلاسميد المأشوب ضمن المستعمرة أو بواسطة هضمه بأنزيمات الهضم للحصول على شدفة الدنا المنسلة insert. ومن ثم يجرى تفاعل السلسلة sequencing للتأكد من دخول الشدفة بالتتالي الصحيح ضمن البلاسميد (84).

يتضمن التنسيل الجزيئي باستخدام البلاسميد كناقل vector خمسة خطوات أساسية:

1-11 عزل الدنا DNA extraction

الخطوة الأولى في تنسيل الجين هي عزل الدنا الذي يحتوي على الجين المراد تنسيله. في حال كان تسلسل الجين الهدف معروفاً، نقوم بعزلها بواسطة تفاعل PCR باستخدام مشارع نوعية له ويجب أن تتضمن هذه المشارع تسلسل التعرف على أنزيمات الهضم التي تم اختيارها من منطقة التنسيل المتعدد multiple cloning site للبلاسميد المستخدم (85).

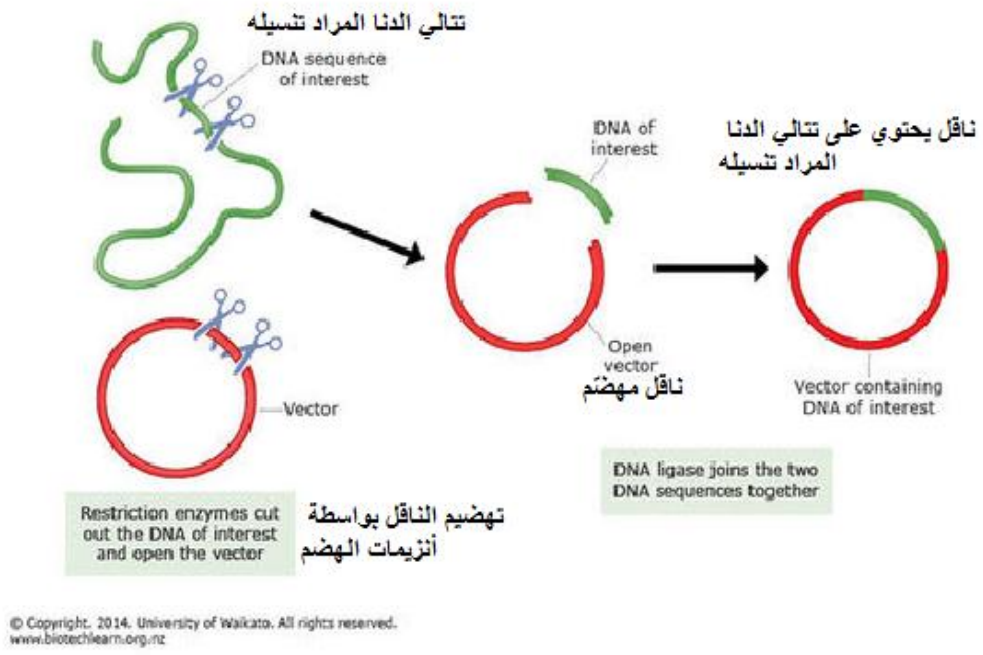


الشكل (13) تضخيم الدنا بواسطة تفاعل PCR

2-11 هضم الجين الهدف والبلاسميد بأنزيمات الهضم وربطهما بتفاعل ligation

يتم تعديل الجين الهدف والبلاسميد وذلك بهضمها بنفس النوع من أنزيمات النكلياز الداخلية الهاضمة. يحتوي البلاسميد على جين مقاومة لصاد حيوي نوعي كما يحتوي على موقع التنسيل المتعدد multiple cloning site و الذي يحتوي على المواقع الهدف الخاصة لأنزيمات النكلياز الداخلية endonuclease. يؤدي قطع البلاسميد بواسطة أحد الأنزيمات الذي يحوي البلاسميد على تسلسل التعرف recognition site الخاص بهذا الأنزيم إلى تحوله من الشكل الدائري إلى الشكل الخطي. يسمح قطع الجين المراد تنسيلها بنفس أنزيم الهضم الذي قطع به البلاسميد، بحدوث الارتباط بين الجين و البلاسميد نتيجة لحدوث تفاعل الربط ligation. لكن لا يصل احتمال الحصول على بلاسميد مأشوب دوماً إلى 100%، وذلك نتيجة إمكانية التحام البلاسميد بنفسه وعودته إلى الشكل الدائري. لذلك ولتقليل هذا الاحتمال يتم استخدام أنزيم الفوسفاتاز الذي يقوم بإزالة فوسفات النهاية 5´ليمنع إعادة ارتباط البلاسميد الخطي بنفسه. أو نقوم بهضم

البلاسميد باستخدام أنزيمي هضم مختلفين لتوليد نهايتين غير متتامتين و بالتالي لا تسمح بإعادة الارتباط مجدداً. يتم تفاعل الربط باستخدام أنزيم DNA ligase الذي يقوم بتشكيل روابط فوسفورية ثنائية الاستر بين الجين والبلاسميد المهضمين، وبالتالي يتم تشكيل البلاسميد المأشوب (85).



الشكل (14)هضم الجين الهدف و البلاسميد بأنزيمات الهضم و ربطهما بتفاعل ligation

جدول (3) تصنيف بعض الإنزيمات المستخدمة في عملية تنسيل الجين

اسم الأنزيم	نوع الأنزيم	آلية العمل
Nhe I	أنزيم هضم restriction enzyme	القطع من خلال تسلسل التعرف G CTAGC
Xho I	أنزيم هضم restriction enzyme	القطع من خلال تسلسل التعرف C TCGAG
*Eco*R I	أنزيم هضم restriction enzyme	القطع من خلال تسلسل التعرف G AATTC

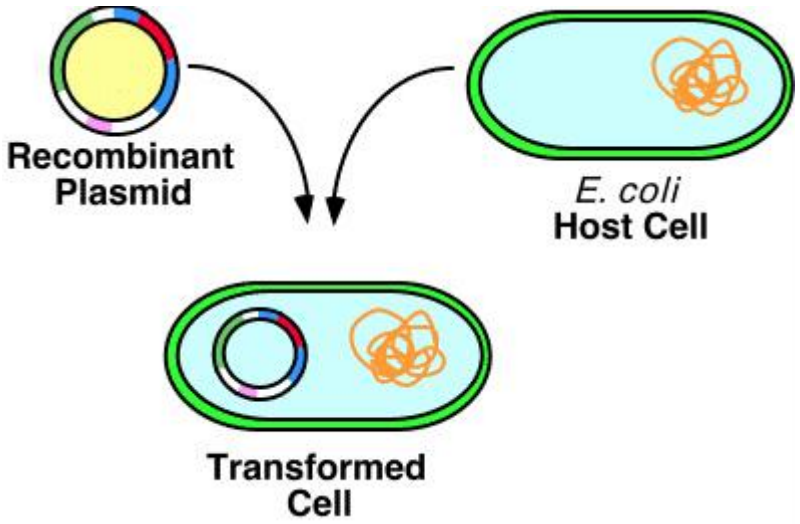
Mlu I	أنزيم هضم restriction enzyme	القطع من خلال تسلسل التعرف A CGCGT
Kpn I	أنزيم هضم restriction enzyme	القطع من خلال تسلسل التعرف GGTAC C
Xba I	أنزيم هضم restriction enzyme	القطع من خلال تسلسل التعرف T CTAGA
T4 DNA LIGASE	أنزيم ربط Ligation	تشكيل روابط الفوسفو إسترية الثنائية التساهمية بين النهاية الهيدروكسيلية 3' لنكليوتيد مع النهاية الفوسفاتية 5' لنكليوتيد ثاني

3-11 الاستحالة transformation

هي عملية نقل جزيئة البلاسميد المأشوب إلى المضيف المناسب، والذي عادة يكون أحد أنواع الخلايا جرثومية. تتضمن الطريقة التقليدية لتحضير الخلايا الجرثومية المؤهلة لعملية الاستحالة، حضن هذه الجراثيم في محلول مركز من أملاح الكالسيوم، لتعديل الشحنة السالبة لغشاء الخلية الجرثومية وجعله موجباً. وبالتالي تنجذب جزيئة البلاسميد المأشوب المشحونة سلبياً إلى غشاء الخلية الجرثومية ثم يتم تطبيق صدمة حرارية heat shock - وهي مبدأ عملية الاستحالة transformation- مما يسمح بدخول البلاسميد المأشوب خلال فترة الصدمة الحرارية بسهولة ضمن الجراثيم.

يوجد طريقة أخرى للاستحالة تدعى electroporation، وتتضمن جذب جزيئة البلاسميد المأشوب إلى الخلايا الجرثومية بواسطة تيار كهربائي قوي، إلا أنها أقل اعتماداً من طريقة الصدمة الحرارية heat shock وذلك بسبب قلة الناتج من الخلايا الجرثومية التي تتلقى البلاسميد المأشوب.

من الجراثيم المستعملة في عملية الاستحالة transformation جراثيم *E.coli* DH5α و *E.coli* Top 10. تتضاعف جزيئة البلاسميد المأشوب ضمن الخلية الجرثومية و يؤدي زرعها على وسط أغار إلى تكاثرها للحصول على مستعمرة من كل خلية جرثومية تلقت البلاسميد المأشوب، وبالتالي تزداد كمية البلاسميد المأشوب حيث تحتوي كل خلية جرثومية جديدة ناتجة عن انقسام الخلية الأصلية جزيئة البلاسميد المأشوب، و يصبح حينها جاهزاً ليتم عزله من المستعمرات الجرثومية (84).

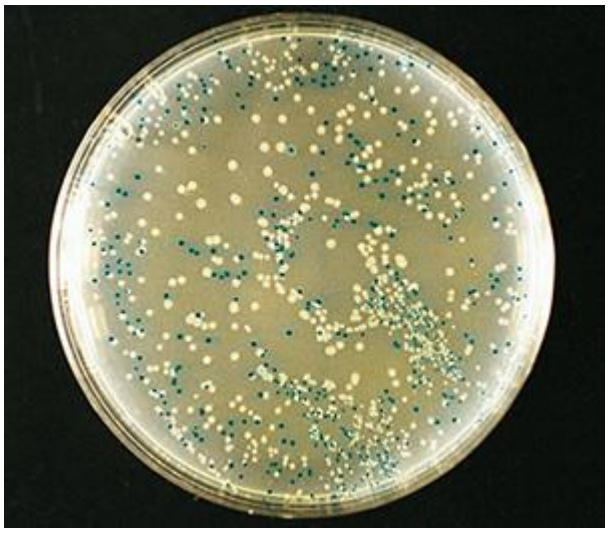


الشكل (15) عملية نقل جزيئة البلاسميد المأشوب إلى المضيف Transformation

4-11 تقصي الخلايا الجرثومية التي نجحت فيها عملية الاستحالة

لتجنب نمو الخلايا التي لم تنجح فيها عملية الاستحالة، يتم تصميم البلاسميدات المعدّة كنواقل لتحتوي على جين مقاوم لأحد الصادات الحيوية مثل (أمبيسيلين، تتراسكلين، أو كانامايسين). بحيث أنّ الوسط الذي تزرع فيه الجراثيم التي تمت عليها عملية الاستحالة، يحتوي على هذا الصاد الحيوي، وبالتالي فإن الجراثيم التي تلقت البلاسميد فقط هي التي تنمو في هذا الوسط بسبب احتوائه على جين مقاوم لهذا الصاد. بالنسبة للجراثيم التي نجحت معها عملية الاستحالة إما أن تكون قد تلقت جزيئة البلاسميد المأشوب أو أن تكون تلقت جزيئة البلاسميد غير المأشوب. من الطرق المستخدمة لتمييزالجراثيم التي تحتوي على البلاسميد المأشوب، طريقة تقصي المستعمرات البيضاء أو الزرقاء أو *lac* selection ، حيث تُنمى على وسط يحتوي الصاد الحيوي و X-gal (5-bromo-4-

chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) و هو مركب مولد للون. تتمتع البلاسميدات التي يمكن استخدامها في هذه الطريقة بوجود منطقة MCS بين الجين المرمّزة لإنزيم β-galactosidase الذي يشطر رابطة β-glycosidic في جزيئة D-lactose. إن جزيئة X-gal تحاكي D- lactose وبالتالي فإن إنزيم β-galactosidase يشطرها لينتج معقداً ذو لون أزرق. يؤدي الربط الناجح للجين بالبلاسميد إلى تمزيق جين *lac Z* و بالتالي لن يتم إنتاج إنزيم β-galactosidase و سينتج لدينا مستعمرات جرثومية بيضاء تدل على وجود البلاسميد المأشوب ضمنها. نواقل التنسيل المستخدمة في هذه الطريقة هي pUC19 و pBluescript و pGem-T . أما سلالة جراثيم *E. coli* المستخدمة في هذه الطريقة هي DH5α التي تحتوي على مورثات *lacZΔM15* الطافرة (85).

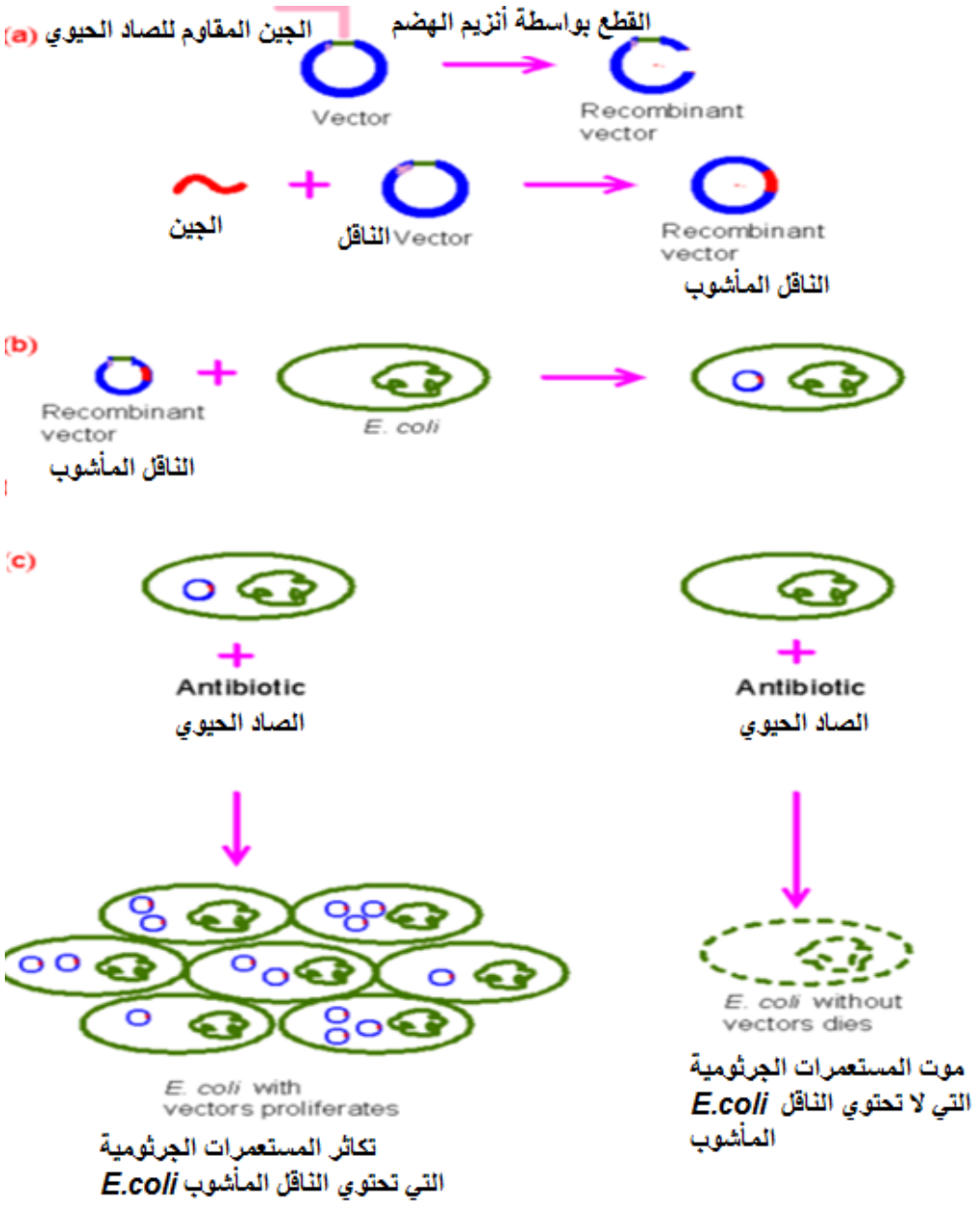


الشكل (16) تقصي الخلايا الجرثومية التي نجحت فيها عملية الاستحالة حيث تظهر الخلايا الجرثومية التي نجحت فيها عملية الاستحالة باللون الأبيض أما التي لم تنجح فيها عملية الاستحالة فتظهر باللون الأزرق.

5-11 تضخيم و تنقية البلاسميد المأشوب

تنقل المستعمرة الجرثومية التي تحتوي على البلاسميد المأشوب إلى وسط زرعي سائل و تحضن بالدرجة 37 لمدة ليلة كاملة، فينتج لدينا مستنبت غني بجزيئات البلاسميد

المأشوب.يتم استخلاص البلاسميد المأشوب من الجراثيم ومن ثم التأكد من نجاح عملية التنسيل بالهضم الأنزيمي و بالسلسلة sequencing (86).



الشكل (17) تسلسل خطوات تنسيل الجين (85).

الدراسة العملية

1- مبرر البحث

يشكل داء الليشمانيات مشكلة صحية هامة في سوريا نتيجة للانتشار الكبير لطفيليات الليشمانية، وصعوبة الشفاء العفوي للإصابات الناجمة عن الليشمانية المدارية المنتشرة في سوريا، وعدم وجود دواء نوعي آمن وفعال. وبالتالي تكتسب الوقاية من الإصابة، التي تعتمد بشكل رئيسي على وجود لقاح فعال، دوراً هاماً. حيث يتمتع لقاح الدنا لطفيلي الليشمانية في حال توفره بالعديد من المزايا كالثباتية العالية، وكلفة الإنتاج المنخفضة، والتعبير المديد عن المستضدات الداخلة في تركيبه، وأخيراً توليد استجابة مناعية من النمط Th1 و ذات ذاكرة، مما قادنا إلى اختيار هذا النمط في دراستنا.

2- هدف البحث

تم انتقاء الجينات اعتماداً على عوامل متعددة، وقد توجهنا في دراستنا لاعتماد جينات موجودة لدى جميع أنواع طفيليات الليشمانية. وقد اخترنا جين الرنا الريباسي 18S وجين المنطقة المصانة conserved region من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة في الليشمانية المدارية لتصنيعها كبلاسميد مأشوب، بسبب وجودها في جميع أنواع الليشمانية. وقد تم استخدامها في الدراسات للكشف عن الطفيلي وتشخيص الإصابة بالليشمانية، لكن لم تتم دراستها من قبل كمرشح للقاح الدنا، فقررنا استخدام هذه المورثات في دراستنا لتنسيلها، وتصنيع بلاسميد مأشوب لكل منها، ودراسة الاستجابة المناعية التي يولدها.

لذلك يهدف هذا البحث إلى:

- تنسيل كل من جين الرنا الريباسي 18S والمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.
- دراسة كل من الاستجابة المناعية التي يولدها البلاسميد المأشوب المحضّر وفعاليته في تقليل حجم الآفة الناتجة عن الإخماج بطفيليات الليشمانية ضمن فئران التجربة، وذلك بمراقبة تطور الإصابة الجلدية و دراسة الاستجابة المناعية الخلوية عن طريق معايرة السيتوكينات التالية : IFNγ و IL-12 و IL-4 في مصول الفئران.

3- موجز خطوات الدراسة العملية

استخلاص الدنا من طفيليات الليشمانية	68
الدراسة البيولوجية الحاسوبية و تصميم المشارع	71
التضخيم بواسطة تفاعل PCR	75
الرحلان الكهربائي لنواتج PCR	79
هضم نواتج PCR	81
تهيئة الجراثيم E coli TOP 10	82
تكثير البلاسميد PCI	83
استخلاص البلاسميد PCI غير المأشوب من المستعمرات الجرثومية	85
هضم البلاسميد	87
تفاعل ربط الجين بالبلاسميد Ligation	93
الاستحالة Transformation	95
الاستخلاص من الجراثيم المستحالة	96
هضم البلاسميد المأشوب المستخلص	100
تضخيم الجين ضمن البلاسميد المأشوب بواسطة PCR	100
تحضير حيوانات التجربة	102
حقن البلاسميد المأشوب ضمن حيوانات التجربة	103
اختبار التحدي	104
متابعة تطور الإصابة	105
الاعتيان	105
مقايسة السيتوكينات	106

4- المواد و الطرائق materials and methods

تمت هذه الدراسة في مركز الدراسات الوبائية و البيولوجية لطفيليات الليشمانية.

4-1 طفيليات الليشمانية

تم استخدام ذراري strain من المشيقات لطفيليات الليشمانية المدارية L.tropica المأخوذة من مركز الدراسات الوبائية و البيولوجية لطفيليات الليشمانية.

4-2 استخلاص الدنا من طفيليات الليشمانية

عُزل الدنا من الطفيليات المزروعة على وسط RPMI-1640 من شركة Sigma على شكل فلاكونات والمدعم بمصل العجل الجنيني منزوع المتممة، باستخدام عتيدة عزل الدنا من شركة (Thermoscientific,Lithuania) المعد لعزل الدنا من 50 عينة.

أ- الأدوات والمواد اللازمة للعزل

يتطلب العمل أيضاً توفر دارئة PBS، إيتانول مطلق (96-100%)، أنابيب ابندورف 1.5 مل عقيمة، رؤوس ممصات مفلترة وعقيمة، مثفلة أنابيب ابندورف.

ب- **تحضير الدارئات المستخدمة في العزل**

- **دارئة Tris EDTA buffer (TE)**

تم تحضير 50 مل من هذه الدارئة كما هو مبين في الجدول 4.

الجدول (4) المواد المطلوبة لتحضير دارئة TE والكمية المناسبة من كل مادة لتحضير 50 مل.

المادة	الكمية لتحضير 50 مل	التركيز النهائي
تريس المحمض بحمض كلور الماء Tris-Hcl	60.57 ملغ	10 Mm
EDTA	18.612 ملغ	1 Mm
PH		8

لتحضير 50 مل يتم وزن الكميات السابقة على الميزان الحساس، ثم تحل هذه الكميات في 25 مل ماء مقطر، ثم يقاس حجم المحلول مرة ثانية بالمقياس المدرج ويكمل الحجم إلى 50 مل وتضبط درجة الباهاء pH عند الدرجة 8 باضافة حمض كلور الماء M1. توضع الدارئة في عبوة زجاجية نظيفة ويعقم بالصاد الموصد ثم يحفظ بالبراد بعد وضع لصاقة تدل على اسم الدارئة، ودرجة الباهاء pH، وتاريخ التحضير.

- دارئة الغسل I (wash buffer I)

توجد هذه الدارئة ضمن عتيدة عزل الدنا (Thermoscientific,Lithuania) بشكل محلول حجمه 10 مل نضيف إليه 30 مل من الإيتانول المطلق (96-100)% كي يصبح جاهزاً للاستخدام و نقوم بوضع علامة على العبوة للإشارة بأنه تم تمديدها

- دارئة الغسل II (wash buffer II)

توجد هذه الدارة ضمن عتيدة عزل الدنا (Thermoscientific,Lithuania) بشكل محلول حجمه 10 مل نضيف إليه 30 مل من الإيتانول المطلق (96-100)% كي يصبح جاهزاً للاستخدام و نقوم بوضع علامة على العبوة للإشارة بأنه تم تمديدها

4-2-1 بروتوكول العزل

1- أُخذ 5 مل من طور الاستتباب (20 مليون طفيلي / مل) و ُثفّل بسرعة 5000 دورة/د لمدة 5 دقائق .
2- تم التخلص من الطافي ثم غسل الرسابة بـ 5 مل من الدارئة الفوسفاتية الملحية PBS (Panreac,SAU).
3- علّقت الرسابة بـ 500 مكرولتر من lysis buffer ثم أضيف 20 مكرولتر من RNase A و حضنت العينة بالدرجة 37 لمدة 10 دقائق. حيث أن كل من lysis buffer و RNase A موجود ضمن عتيدة عزل الدنا.
4- أضيف 25 مكرولتر من البروتيناز K (الموجود ضمن عتيدة عزل الدنا) و حُضنت لمدة ساعة في الحمام المائي (JSR , South Korea) في الدرجة 56ْ.

5- أضيف 200 مكل من الإيتانول المطلق (96-100%) لترسيب الدنا وخُلط لمدة 15 ثانية.
6- نُقلت العينة كاملة، أي السائل الطافي مع الدنا المترسب، إلى عمود السيليكا وثُفّلت لمدة دقيقة واحدة بسرعة 12000 دورة في الدقيقة فبقي الدنا المترسب بالإيتانول عالقاً على فلتر عمود السيلكا بينما رُميَ السائل المتجمع في أنبوب الجمع.
7- نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب جمع آخر سعة 2 مل ويرمى أنبوب الجمع الأول.
8- أضيف إلى الأنبوب 500 مكرولتر من دارئة الغسيل washing buffer 1 الممدد بالإيتانول و ثُفل لمدة دقيقة بسرعة 8000 دورة في الدقيقة .
9- نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب جمع آخر و أضيف إلى العمود 500 مكرولتر من دارئة الغسيل washing buffer II الممدد بالإيتانول وثُفل لمدة 3 دقائق بسرعة التثفيل القصوى 12000 دورة في الدقيقة .
10 - نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب ابندورف مقصوص الغطاء أيضاً وثُفل مدة دقيقة بسرعة 12000 دورة في الدقيقة للتأكد من التخلص من كل آثار washing buffer II.
11 - نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب تثفيل سعة 1.5 مل وأضيف له 200 مكرولتر من دارئة الشطف elution buffer لشطف الدنا ثم حُضن بدرجة حرارة المخبر لمدة دقيقتين .
12 - ثُفّل لمدة دقيقة بسرعة 8000 دورة في الدقيقة
13 - نُقل محتوى الأنبوب إلى أنبوب ابندورف جديد عليه لصاقة تدل على اسم العينة وتاريخ العزل وحُفظ في الدرجة - 20 .

3-4 الدراسة البيولوجية الحاسوبية Bioinformatics

أجريت دراسة حاسوبية لجينوم *L.tropica* باستخدام عدة برامج بيولوجية حاسوبية Bioinformatics softwares هدفت إلى الحصول على تسلسلات كل من الجين المرمز للوحدة الصغيرة للرنا الريباسي 18S ، والمنطقة المصانة conserved

region من الحلقات الصغيرة للدنا المتقدري من قواعد البيانات على الإنترنت لمعرفة إن كان ثمة تطابقاً مع الجينوم البشري، ولمعرفة نسبة التطابق مع الأنواع الأخرى من الليشمانية.

تمت دراسة تسلسل الجين المشفر للوحدة الصغيرة للرنا الريباسي 18S بواسطة برنامج Vector NIT Express وتم اختيار جزء من الجين ليتم تنسيله (16). حيث صُممت المشارع الخاصة لتنسيل هذا الجزء يدوياً بالاعتماد على تسلسله sequence. كما تمت دراسة تسلسل المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة للدنا المتقدري بواسطة برنامج CLC free workbench 3 الشكل (17) وصممت المشارع الخاصة لتنسيل المنطقة المصانة يدوياً بالاعتماد على هذا التسلسل.

تم التأكد من الشروط التالية أثناء تصميم المشارع :

1- طول المشرع بين 18 – 25 زوج أساس
2- محتوى المشرع من أسس السيتوزين و الغوانين = 50 - 60%
3- درجة الانصهار لكل مشرع تكون بين (55-70) درجة مئوية
4- الفرق بين درجتي الانصهار لكل من المشرع المباشر والعكسي لا تتجاوز 5 درجات .
5- ألا تحتوي آخر أربع أسس في المشرع على تتاليات C , G لأن ذلك يسبب صعوبة في فصل المثنويات dimers .

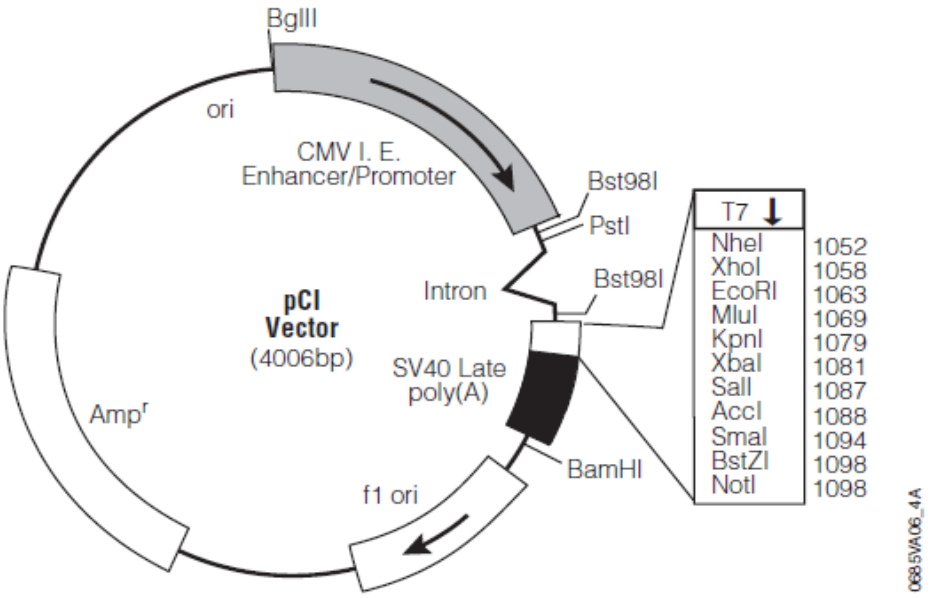
وتم ذلك بواسطة التطبيق التالي :

http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/

1-3-4 البلاسميد المستخدم في الدراسة

تم استخدام PCI plasmid (من كلية العلوم ، جامعة دمشق) في الدراسة و يبلغ حجمه 4006 زوج أساس ويحتوي على المعزاز الخاص بالفيروس المضخم للخلايا

Cytomegalovirus. حيث اختيرت أنزيمات الهضم بالاعتماد على تسلسل التنسيل لهذا البلاسميد الشكل (18).



الشكل (18) بلاسميد PCI

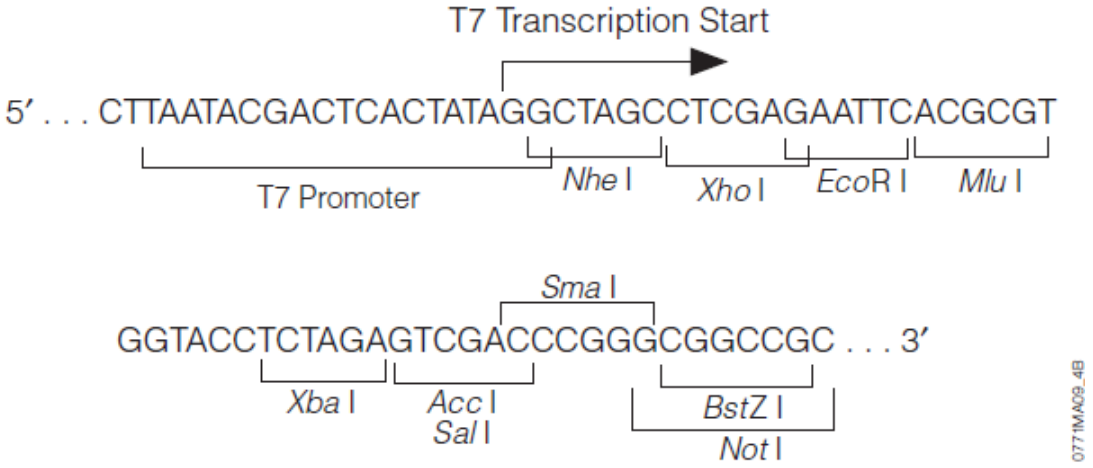
بعد أن صممت المشارع التي ستستخدم في التنسيل تم اختيار أنزيمات الهضم التي تمت إضافة تسلسلات التعرف الخاصة بها إلى المشارع وفق الشروط التالية :

1- ألا تكون تسلسلات التعرف recognition site لكل من الأنزيمين موجودة ضمن تسلسل كل من جين 18S والمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة Conserved region (باستخدام برنامج CLC Free Workbench 3.1) حتى لا يتم الهضم ضمن التسلسل المراد تنسيله.

2- أن يكون لكلا الأنزيمين الدارئة ذاتها الذي يؤمن فعالية هضم بنسبة 100% باستخدام الموقع:

/http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest

3- مراعاة ترتيب مواقع أنزيمي الهضم ضمن تسلسل التنسيل Cloning sequence للبلاسميد كما في الشكل (19):



الشكل (19) المنطقة التي تحوي تتاليات التعرف لأنزيمات القطع ضمن بلاسميد PCI

بحيث يكون تسلسل التعرف للأنزيم الوارد أولاً في تسلسل التنسيل للبلاسميد ملحقاً بالمشرع المباشر fwd primer و تتالي التعرف للأنزيم الثاني متصلاً بالمشرع العكسي rev primer ليتم الانتساخ وفق الاتجاه الصحيح المشار إليه في الشكل أعلاه .

4- أن لا تتجاوز ΔG للمشارع بعد ربطها بتتاليات التعرف الخاصة بأنزيمات الهضم قيمة (- 8) كي يسهل فصل المثنويات و heterodimer .

بعد مراعاة الشروط أعلاه ، تم اختيار الأنزيمين Xho I و Xba I بحيث يكون تسلسل التعرف للأنزيم Xho I متصلاً بالمشرع المباشر و تسلسل التعرف للأنزيم Xba I متصلاً بالمشرع العكسي. و تم اختيار الدارئة Tango 2X مع زيادة كمية

أنزيم Xba I المستخدمة في عملية الهضم إلى الضعفين لتأمين فعالية هضم تساوي 100% الشكل (20).

Reaction Conditions for Restriction Enzymes in Thermo Scientific Five Buffer System

	Incu-bation temp.	Recom-mended buffer	Units for overnight incubation	Thermal inacti-vation	Restriction enzyme activity, %					
					B	G	O	R	Tango™	
									1X	2X
XbaI	37°C	Tango™	0.1	65°C	50-100	50-100	20-50	NR(0-20)	100	50-100
XhoI	37°C	R	0.1	80°C	NR(0-20)	50-100	50-100	100	20-50	100

الشكل (20) شروط التفاعل لأنزيمي الهضم Xba I و Xho I ضمن دارئات الهضم

2-3-4 اختيار المشارع اللازمة لجين الرنا الريباسي 18S والمنطقة المصانة conserved region من الحلقات الصغيرة

حصلنا على المشرعين اللازمين لتضخيم القسم المدروس من جين الرنا الريباسي 18S وهما :

المشرع المباشر بطول 30 نكليوتيد:

AACTCGAGATGAATTGGGGATCTTATGGGC

المشرع العكسي بطول 20 نكليوتيد:

ATTCTAGATCACTCTTGCGAACGTACTCC

تتالي التعرف لأنزيم Xho I : CTCGAG

تتالي التعرف لأنزيم Xba I : TCTAGA

تمت إضافة الأساسين AA للمشرع المباشر والأساسين AT للمشرع العكسي من أجل زيادة فعالية الهضم للأنزيمات .

وحصلنا على المشرعين اللازمين لتضخيم المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة Conserved region :

المشرع المباشر بطول 26 نكليوتيد:

AACTCGAG ATT CGG CTA AAA ATG GCC ***Xho* I**

المشرع العكسي بطول 26 نكليوتيد:

AT TCTAGACAG GAC CAC CCC CAC CTA ***Xba* I**

حيث أضيف الأساسين AA للمشرع المباشر والأساسين AT للمشرع العكسي من أجل زيادة فعالية الهضم للأنزيمات.

4-4- التضخيم بواسطة تفاعل PCR

استخدمت عتيدة PCR من شركة Thermo scientific,Lithuania وصُنّعت المشارع في هيئة الطاقة الذرية .

1-4-4 تفاعل PCR لجين 18S

ضُخمت المنطقة المدروسة من جين 18S باستخدام المشرعين التاليين :

المشرع المباشر : AACTCGAGATGAATTGGGGATCTTATGGGC

المشرع العكسي : ATTCTAGATCACTCTTGCGAACGTACTCC

أ- حل المشارع

كانت المشارع التي تم شراؤها من هيئة الطاقة الذرية على شكل محلول قدره 100 مكرولتر في إيبندورف لكل مشرع و تركيز قدره 361 µM للمشرع المباشر و 469

µM للمشرع العكسي حيث مددنا المشرعين المباشر و العكسي إلى تركيز100 µM و من ثم إلى تركيز 10 µM.

مُدّد المشرع المباشر إلى تركيز 100 µM وذلك بأخذ 27,7 مكرو لتر من المشرع و إكمال الحجم إلى 100 مكرولتر بإضافة 72.3 مكرولتر من ماء PCR .

وحضّرنا من المحلول السابق محلولاً تركيزه 10µM بأخذ 10 مكرولتر من المحلول ذو التركيز 100 مكرولتر و إضافة 90 مكرو لتر من ماء PCR ومدّد المشرع العكسي إلى تركيز 100µM بأخذ 21,3 مكرولتر من المشرع و إكمال الحجم إلى 100 مكرولتر بإضافة 78,7 مكرولتر من ماء PCR. وحضّرنا من المحلول السابق محلولاً تركيزه 10 µM بأخذ 10 مكرولتر من المحلول ذو التركيز 100 مكرولتر وأضفنا لها 90 مكرو لتر من ماء PCR و تم الحفظ في الدرجة – 20.

ب- بروتوكول تفاعل PCR

حضّر حجم نهائي قدره 25 مكرولتر لتفاعل PCR يحوي على دارئة خاصة بالتفاعل بتركيز 1X، و 2mM من كلوريد المغنزيوم $MgCl_2$ ، و 0.2 mM من كل نكليوتيد ثلاثي الفوسفات منزوع الأوكسجين dNTPs ، و 0.025u/µl من أنزيم Taq بوليمراز (Thermo scientific,Lithuania) ، و 0.4µM من كل مشرع ، و 250 ng/µl من الدنا الجينومي المستخلص. بُرمج جهاز المدوّر الحراري Thermocycler (Cleaver,UK) لينجز 35 دورة تتألف كل منها من المراحل المبينة في الجدول 5:

الجدول (5) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم المنطقة المنسلة من جين 18S

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة	الخطوة
1	5 دقائق	94	التمسخ البدئي initial denaturation

35	دقيقة	94	التمسخ denaturation
	45 ثانية	56	الالتحام annealing
	دقيقة و نصف	72	الاستطالة extension
1	5 دقائق	72	Final extension

2-4-4 تفاعل PCR للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة

تم التضخيم باستخدام المشرعين :

المشرع المباشر

AACTCGAG ATT CGG CTA AAA ATG GCC

المشرع العكسي

AT TCTAGACAG GAC CAC CCC CAC CTA

أ- حل المشارع

كانت المشارع التي تم شراؤها من هيئة الطاقة الذرية على شكل محلول قدره 100 مكرولتر في إيبندورف لكل مشرع وتركيز قدره 526µM للمشرع المباشر و 631 µM للمشرع العكسي حيث مددنا المشرعين المباشر والعكسي إلى تركيز 100 µM ومن ثم إلى تركيز 10 µM.

مُدّد المشرع المباشر إلى تركيز 100 µM وذلك بأخذ 19 مكرولتر من المشرع و إكمال الحجم إلى 100 مكرولتر بإضافة 81 مكرولتر من ماء PCR .وحضّرنا من المحلول السابق محلولاً تركيزه 10 µM بأخذ 10 مكرولتر من المحلول ذو التركيز 100 مكرولتر و إضافة 90 مكرو لتر من ماء PCR ،ومدّد المشرع العكسي إلى تركيز 100 µM بأخذ 14,68 مكرولتر من المشرع وإكمال الحجم إلى 100 مكرولتر بإضافة 85,32 مكرولتر من ماء PCR. وحضّرنا من المحلول السابق محلولاً تركيزه 10 µM

بأخذ 10 مكرولتر من المحلول ذو التركيز 100 مكرولتر وأضيف لها 90 مكرولتر من ماء PCR و حُفظ في الدرجة – 20 .

ب- بروتوكول تفاعل PCR

حضّر حجم نهائي قدره 25 مكرولتر لتفاعل PCR يحوي على دارئة خاصة بالتفاعل بتركيز 1X و 2mM من كلوريد المغنزيوم $MgCl_2$ و 0.2 mM من كل نكليوتيد ثلاثي الفوسفات منزوع الأوكسجين dNTPs و 0.025u/µl من أنزيم Taq بوليمراز (Thermo scientific,Lithuania) و 0.4µM من كل مشرع و 250 ng/µl من الدنا الجينومي المستخلص. بُرمج جهاز المدوّر الحراري Thermocycler (Cleaver,UK) لينجز 35 دورة تتألف كل منها من المراحل المبينة في الجدول (6):

الجدول (6) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم جين المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة	الخطوة
1	5 دقائق	94	التمسخ البدئي initial denaturation
40	دقيقة	94	التمسخ denaturation
	45 ثانية	58	الالتحام annealing
	دقيقة و نصف	72	الاستطالة extension
1	5 دقائق	72	Final extension

4-5- الرحلان الكهربائي

تم ترحيل نواتج PCR لكل من المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S و المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة conserved

regionعلى هلامة أغاروز تركيزها 2% ملونة stained بالإيثيديوم بروماید من شركة (Vivantis,Malaysia).

1-5-4 المواد المستخدمة في الرحلان الكهربائي :

1- أغاروز(vivantis, Malaysia) لتحضير هلامة الأغاروز .
2- دارئة TBE تركيز5X .
3- Loading dye (Thermo scientific,Lithuania)
4- جهاز رحلان كهربائي أفقي (Cleaver,UK)

2-5-4 تحضير محاليل ودارئات الرحلان

أ- دارئة TBE (Tris Borate EDTA buffer)

لتحضير 1 ليتر من دارئة TBE (5X) وُزن 54 غرام من مادة Tris base من شركة (promega,US)، و 27.5 غرام من حمض البور boric acid من شركة USB.

حُلت المساحيق السابقة بجزء من الماء المقطر ثم أضيف 20 مل من محلول EDTA ذو تركيز 0.5 M ودرجة باهاء pH=8، ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1 ليتر ويجب التأكد مرة ثانية أن درجة الباهاء pH=8. أما إذا كانت درجة الباهاء أعلى أو أقل من 8 يضبط مرة ثانية بمحلول حمض كلور الماء أو ماءات الصوديوم 1 نظامي.

حُضّر1 لتر من محلول EDTA ذو التركيز 0.5 M ، ودرجة باهاء PH=8 بوزن 186.12 ملغ EDTA من شركة Bio Basic Inc, Canada، وحلها بجزء من الماء المقطر، لا يحدث الانحلال حتى يتم تعديل درجة الباهاء إلى 8 باضافة قطرات من NaOH 1 نظامي، ثم أُكمل الحجم بالماء المقطر إلى الحجم المطلوب.

ب – تحضير هلامة الأغاروز

لتحضير هلامة الأغاروز بتركيز 2% وُزن 2غ من الأغاروز (vivantis, Malaysia) و حُلّت في فيول زجاجي يحوي 100 مل من محلول يتألف من 10 مل

TBE تركيزه 5X و 90 مل من الماء المقطر بمساعدة الحرارة، حتى يصبح المحلول شفافاً تماماً. عندما وصلت درجة حرارة الأغاروز المنحل إلى 55 درجة أضفنا 7,5 مكرولتر من الإيثيديوم بروميد (vivantis, Malaysia) للفيول. وضعنا المشط في حامل الهلامة في المكان المخصص له ثم صُبّ محلول الآغار في حامل الهلامة وترك حتى يبرد ويتهلم.عندما برد الآغار وتهلم تماما نُزع المشط بلطف وبشكل عمودي. ثم نُقل الهلام الى حوض الرحلان حيث غمرت الهلامة بدارئة 0.5X TBE.

حُقنت العينات في الآبار وذلك بمزج 5 مكرولتر من ناتج التضخيم بالـ PCR للمنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 لجين 18S + 1مكرولتر من الملون bromophenol blue (loading dye) من شركة (Thermo scientific,Lithuania) في أنبوب إبندورف ، خلطت جيداً ثم حقنت بواسطة رأس ممص دقيق في البئر المناسب. كما مُزج 5 مكرولتر من ناتج تضخيم المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة مع 1 مكرولتر من loading dye في أنبوب إبندورف ثم حقنت بواسطة رأس ممص دقيق في البئر المناسب.

كذلك حُقن 2,5 مكرولتر من 50 bp DNA ladder ممزوجة مع 0,5 مكرولتر من الملون bromophenol blue (loading dye) من شركة (Thermo scientific,Lithuania) في البئر المناسب. تم توصيل جهاز الرحلان إلى تيار كهربائي 100 فولط و شدته 120 ميلي أمبير و كانت مدة الترحيل 50 دقيقة. وعند الانتهاء أُظهرت العصابات بوضع الهلامة في جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV (Cleaver,UK) وصوّرت الهلامة بعد ذلك.

4-6 هضم نواتج PCR

4-6-1 هضم ناتج تضخيم المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S

هُضمت نواتج تضخيم المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S (لأنها منطقة Open reading frame)بواسطة أنزيمي الهضم Xho I و Xba I من

شركة (Thermo scientific, Lithuania) وفق البروتوكول التالي : وُضع في أنبوب سعة 0.2 مل 10 مكرولتر من ناتج تضخيم الجينة المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S، و 6 مكرولتر من الدارئة 10x tango، و 11 ميكرولتر من الماء خالي النكلياز، و 1 مكرولتر من الأنزيم Xho I، و2 مكرولتر من الأنزيم Xba I ، بالتالي بلغ الحجم الكلي 30 مكرولتر. حيث تؤمن دارئة tango بتركيز 2X عملية هضم بنسبة 100% لأنزيم Xho I و بنسبة 50% لأنزيم Xba I لذلك ضوعفت الكمية المضافة من هذا الأنزيم و ذلك حسب تعليمات الشركة المصنعة. ثم حُضن الأنبوب بدرجة 37 م لمدة ساعتين، وبعد انتهاء مدة الحضن رُحّل 10 مكرولتر من ناتج الهضم على هلامة الأغاروز 2%.

2-6-4 هضم ناتج تضخيم المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة conserved region

هُضمت نواتج تضخيم المنطقة المصانة conserved region بواسطة أنزيمي الهضم Xho I و Xba I من شركة (Thermo scientific,Lithuania) وفق البروتوكول التالي : وُضع في أنبوب سعة 0.2 مل 10 مكرولتر من ناتج تضخيم المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ، و 6 مكرولتر من الدارئة 10x tango، و11 ميكرولتر من الماء خالي النكلياز، و1 مكرولتر من الأنزيم Xho I ، و2 مكرولتر من الأنزيم Xba I و بالتالي بلغ الحجم الكلي 30 مكرولتر. حيث تؤمن دارئة tango بتركيز 2X عملية هضم بنسبة 100% لأنزيم Xho I و بنسبة 50% لأنزيم Xba I لذلك ضوعفت الكمية المضافة من هذا الأنزيم وذلك حسب تعليمات الشركة المصنعة. ثم حُضن الأنبوب بدرجة 37 م لمدة ساعتين ، و بعد انتهاء مدة الحضن رُحل 10 مكرولتر من ناتج الهضم على هلامة الأغاروز 2%.

7-4 تهيئة الجراثيم *E coli* TOP 10

أحضرت الجراثيم *E coli* TOP 10 (promega) من كلية العلوم على شكل محلول في إبندورف حجمه 100 مكرولتر ثم قمنا بتهيئتها (أي جعلها competent cells) بطريقة كلوريد الكالسيوم.

1-7-4 تحضير الأوساط اللازمة لنمو الجراثيم

أ- تحضير وسط Luria-Bertani (LB) أغار

تم وزن 3.5 غ من الوسط ثم حُلّت في 100 مل من الماء المقطر في عبوة زجاجية و من ثم تم تعقيم الوسط بالصاد الموصد بدرجة حرارة 121م° وضغط 1.5 بار لمدة 20 دقيقة، ثم أغلق بإحكام ووُضع عليها لصاقة تدل على اسم المادة.

ب- تحضير وسط Luria-Bertani (LB) مرق broth

تم وزن 2 غ من الوسط ثم حُلّت في 100 مل من الماء المقطر في عبوة زجاجية و من ثم تم تعقيم الوسط بالصاد الموصد بدرجة حرارة 121م° وضغط 1.5 بار لمدة 20 دقيقة، ثم أغلق بإحكام ووضع عليها لصاقة تدل على اسم المادة.

2-7-4 بروتوكول تهيئة جراثيم *E.coli* TOP 10

حُضّر pre culture من جراثيم TOP 10 حيث أُخذ 100 مكرولتر من الجراثيم المجمدة بالدرجة – 80 ووُضعت في 5 مل من وسط مرق Luria-Bertani (LB) من شركة (Roth,Germany) في إبندورف سعة 1.5 مل وتم حضنها في الدرجة 37 لمدة 24 ساعة .

1- نُقل pre culture السابق إلى فيول زجاجي يحتوي 100مل من مرق Luria-Bertani (LB) (Roth,Germany) ومن ثم حُضن محتوى الفيول في حاضنة هزازة (JSR, South Korea) بالدرجة 37 مع الرج بسرعة 225 دورة / دقيقة مع مراقبة الكثافة الضوئية للمستنبت الموجود في الفيول وذلك بأخذ عينة

من الفيول كل ساعتين وقياس الكثافة الضوئية على طول موجة 600 نانو متر. تم القياس بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي حتى تصل إلى قيمة 0,4.

2- وُزّع محتوى الفيول على أنبوبين بلاستيكيين مخصصين للزرع سعة 50 مل ثم ثُفّل بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق .

3- عُلّق الراسب الناتج من كل أنبوب في 20 مل من كلوريد الكالسيوم (Merck,Germany) المبرّد والمعقم والذي يحتوي على 15% منه غليسيرول (Merck,Germany) .

4- ثُفّل المعلق السابق بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق في مثفلة (BIOSAN) بدرجة حرارة (+4).

5- تم التخلص من الطافي وعُلق الراسب الناتج من كل أنبوب في 20 مل من مزيج كلوريد الكالسيوم والغليسيرول السابق ثم حُضن في الثلج لمدة 30 دقيقة.

6- ثُفّل الأنبوبين بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق في مثفلة (BIOSAN, Germany) ثم عثلق الراسب الناتج في كل أنبوب في 2 مل من مزيج كلوريد الكالسيوم والغليسيرول السابق.

7- وُزعت الكمية السابقة على إبندورفات عقيمة بحيث يحتوي كل إبندورف على 100 مكرولتر من جراثيم E coli TOP 10 competent cells وحفظت في المجمدة بالدرجة -80 .

8-4 تكثير البلاسميد PCI

استُخدم البلاسميد PCI الذي تم الحصول عليه من كلية العلوم في جامعة دمشق على شكل محلول حجمه 10 مكرولتر في إبندورف. تم تكثير البلاسميد بواسطة الاستحالة transformation وهي عملية إدخال البلاسميد إلى جراثيم *E. coli* TOP 10 المهيئة سابقاً بطريقة كلوريد الكالسيوم ومن ثم تكثير الجراثيم بزرعها على وسط LB Agar.

نحتاج في عملية الاستحالة transformation إلى مايلي :

- رؤوس ممصات عقيمة قياس 100 مكرولتر و 1000 مكرولتر.

- أنابيب إبندورف عقيمة قياس 1,5 مل
- ثلج
- وسط مرق (Luria-Bertani,Vivantis) LB من دون صادات.
- تحضير أطباق LB أغار تحوي صاد الأمبيسيلين بتركيز 100 مكروغرام /مل .

تمت عملية transformation وفق البروتوكول التالي :

1- تمت إذابة أحد أنابيب الجراثيم المهيّئة competent cells على الجليد لمدة 15 دقيقة .
2- وُضع في إبندورف سعة 1,5 مل 60 مكرولتر من الجراثيم competent cells و 2 مكرولتر من البلاسميد غير المأشوب.
3- تُرك المزيج لمدة 30 دقيقة على الجليد .
4- نُقلت الأنابيب بسرعة من الجليد إلى الحمام المائي بدرجة 42 لمدة دقيقة واحدة مما سمح بدخول البلاسميد إلى خلايا الجراثيم.
5- وُضعت الأنابيب في الثلج لمدة دقيقتين .
6- أضيف 900 مكرولتر من وسط مرق (Luria-Bertani) LB دون صادات إلى الإبندورف الحاوي على الخلايا الجرثومية التي استقبلت البلاسميد غير المأشوب.
7- تم الحضن في الحاضنة الهزازة (JSR,South korea) بالدرجة 37 لمدة 45 دقيقة وبسرعة اهتزاز 225 هزة/دقيقة.
8- بعد الانتهاء من الحضن ثفلنا الإبندورف بأقصى سرعة و تم التخلص من 800 مكرولتر من السائل الطافي ثم عُلقت الرسابة بالحجم المتبقي من مرق LB(Luria-Bertani) .
9- أُخذ 60 مكرولتر من محتوى الإبندورف بواسطة الممص الدقيق و زُرعت على أطباق تحوي LB أغار مضاف لها الأمبيسيلين بتركيز 100 مكغ / مل، و تم فرشها بواسطة الماسحة على كامل الطبق ثم تم تدوير الطبق بزاوية 60

درجة وتم الفرش مجدداً على كامل مساحة الطبق وكررت هذه العملية 3 مرات.

10- تم حضن أطباق LB(Luria-Bertani) أغار من شركة (Roth, Germany) في الدرجة 37 لمدة 24 ساعة .

أضيف الأمبيسيلين إلى LB(Luria-Bertani) أغار من شركة (Roth, Germany) كي تنمو لدينا فقط مستعمرات الجراثيم الحاوية على البلاسميد المأشوب لأن البلاسميد يحوي على جين مقاومة الأمبيسيلين. حضنت أطباق الزرع لمدة 24 ساعة في الدرجة 37 في الحاضنة الهزازة (JSR,South Korea)، ثم أخرجت للتحقق من نمو المستعمرات الجرثومية المحتوية على البلاسميد.

9-4 استخلاص البلاسميد PCI غير المأشوب من المستعمرات الجرثومية

1- أخذت مستعمرة جرثومية من المستعمرات النامية على طبق LB أغار بواسطة loop المخصص للزرع الجرثومي (العمل يكون بجوار اللهب) وزرعت المستعمرة في 5 مل من وسط LB مرق من شركة (Roth, Germany) الحاوي على صاد الأمبيسلين بتركيز 100 مكغ / مل وحضنت بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة .

2- أُخذ ناتج الزرع في اليوم التالي و زُرع مجدداً في 50 مل من وسط مرق LB في أنبوب سعة 50 مل، وحُضن الأنبوب في حاضنة هزازة (JSR, South Korea) بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة وسرعة اهتزاز 225 هزة / دقيقة .

3- استُخلص في اليوم التالي البلاسميد من مزروع جراثيم الإيشريكية الكولونية Top 10، بواسطة عتيدة عزل البلاسميد من المستنبت الجرثومي من شركة (Euroclone, Italy) وفق الخطوات التالية:

- تُفل الأنبوب الحاوي على المستنبت الجرثومي بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق بالدرجة 4 .

- تم التخلص من السائل الطافي ثم أضيف للرسابة 4 مل من المحلول I من العتيدة والمضاف له RNase A وعلقت الرسابة فيه بشكل كامل بواسطة الرجاجة.
- أضيف المحلول II ثم قُلب الأنبوب و تم تدويره من 6 – 8 مرات للحصول على حلالة lysate صافية وُحضن بدرجة حرارة الغرفة.
- أضيف إلى الأنبوب 4 مل من المحلول III المبرد مسبقاً بالدرجة 4 ثم مُزجت الحلالة بلطف بواسطة القلب و التدوير من 6 – 8 مرات ثم حُضن في الثلج لمدة 5 دقائق .
- تمت تهيئة عمود الاستخلاص بإضافة 2,5 مل من دارئة EQ إلى العمود و تركناها ليتم إفراغها عبر العمود بواسطة الجاذبية الأرضية، ثم استُبعد السائل المتدفق عبر العمود.
- رُشحت الحلالة الجرثومية بواسطة المراشح المرفقة مع طاقم عزل البلاسميد من المستنبت الجرثومي. حيث وُضعت المرشحة في قمع صغير لتثبيتها ثم رطبت ببضع قطرات من الدارئة EQ قبل ترشيح الحلالة الجرثومية . تم صب الحلالة الجرثومية عبر المرشحة المرطبة بالدارئة ثم تم جمعها بعد الترشيح .
- نُقلت الرشاحة السابقة إلى العمود الخاص بالعتيدة ثم تركت لتفرغ عبر العمود بواسطة الجاذبية الأرضية.
- غُسل العمود بـ 10 مل من دارئة غسل الدنا ثم استبعدت الغسالة .
- أضيف 5 مل من دارئة الشطف Elusion buffer مباشرة إلى المطرس الرابط للدنا في العمود من أجل الحصول على البلاسميد النقي.
- أضيف 3,5 مل من الإيزبروبانول المحفوظ بدرجة حرارة الغرفة لترسيب الدنا البلاسميدي المشطوف. تم المزج جيداً ثم ثُفل العمود بسرعة 9800 xg لمدة 25 دقيقة بالدرجة 4 وبعد انتهاء التثفيل استبعد الطافي .
- جففت الرسابة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .

- حُلت الرسابة الناتجة بـ 200 مكرولتر من دارئة TE بالاستعانة بحمام مائي (JSR, South Korea) درجة حرارته 65 ثم حُفظ البلاسميد الناتج بالدرجة 20 -

10-4 رحلان البلاسميد PCI

تم ترحيل البلاسميد PCI على هلامة أغاروز بتركيز 1% و ذلك للتأكد من جودة البلاسميد. تم إظهار عصابات البلاسميد بتعريض الهلامة لمنبع الأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة (Cleaver, UK) ووثقت الهلامة باستخدام جهاز توثيق الهلام (Cleaver, UK).

11-4 قياس تركيز البلاسميد PCI

تم قياس تركيز البلاسميد بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي حيث أُخذ 5 مكرولتر من البلاسميد ومدّد بالماء المقطر حتى 100 مكرولتر، فكان تركيز البلاسميد = 0,2448 مكروغرام / ميكرولتر و نقاوته مساوية لـ 1.83 .

12-4 هضم البلاسميد

تم هضم البلاسميد بواسطة أنزيمي الهضم Xho I و Xba I من شركة (Thermo scientific,Lithunia) وفق البروتوكول التالي : وُضع في إبندورف سعة 0.2 مل 1 مكغ من البلاسميد و تعادل 4 مكرولتر، و4 مكرولتر من الدارئة 10x tango، و9 مكرولتر من الماء خالي النكلياز، و 1 ميكرولتر من الأنزيم Xho I ، و2 ميكرولتر من الأنزيم Xba I، وبالتالي بلغ الحجم الكلي في الإبندورف 20 ميكرولتر. تم الحضن بدرجة 37 لمدة ساعتين ، و بعد انتهاء مدة الحضن تم ترحيل 10 مكرولتر من ناتج الهضم على هلامة الأغاروز1%.

13-4 الاستخلاص من هلامة الأغاروز

أ- استخلاص المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18s بعد التهضيم بأنزيمات الهضم :

تم قص عصابة المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين **18S** بعد ترحيلها على هلامة الأغاروز 2% تحت أشعة UV واستخلاصها بواسطة عتيدة استخلاص الدنا من الهلام وذلك عبر البروتوكول التالي:

1- تم قص جزء الهلامة الحاوي على العصابة بواسطة مشرط أو شفرة، مع مراعاة أن يكون القص للمنطقة الحاوية على العصابة فقط لتقليل حجم الهلامة. وُضع الجزء المقصوص في أنابيب 1.5 مل الموزونة سابقاً ومن ثم سُجل وزن الهلامة. كان وزن جزء الهلامة الحاوي على المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S مع الأبندورف يساوي 90 ملغ.

2- أضيف Binding Buffer إلى الهلامة بنسبة (1:1)، أي أضيف 90 ميكرو لتر من الدارئة السابق إلى 90 ملغ من هلامة الأغاروز المحتوية على المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S.

3- تم حضن مزيج الهلامة بالدرجة 50-60° ولمدة 10 دقائق في حمام مائي (JSR,South Korea)، أو حتى انحلال الهلامة بشكل كامل. ومزجت خلال هذه الفترة كل بضع دقائق عبر قلب الأنبوب من أجل تسهيل عملية انحلال الهلامة. يجب أن يكون لون المحلول أصفر وهذا يشير أن درجة PH مثالية لربط الـ DNA.
بما أن طول قطعة DNA لدينا في المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18s (197 زوج أساس) فقد أضيف إيزوبربانول 100% إلى محلول الهلامة المنحلة بنسبة (1:2) و مزج بشكل كامل ، أي تمت إضافة 90 ميكرولتر من إيزوبروبانول إلى 90 ملغ من الهلامة المنحلة (18S)في 90 مكرولتر من Binding buffer .

4- تم نقل محلول الهلامة المنحلة إلى عمود التنقية ، ثم ثُفّل لمدة دقيقة في مثفلة مخصصة للأبندورف (HERMLE,Germany)، وتم التخلص من السائل المتدفق

من العمود –Flow-Through– وإرجاع العمود إلى نفس أنبوب الجمع. ثم تم التثفيل لمدة 30 إلى 60 ثانية في مثفلة مخصصة للإبندورف (HERMLE,Germany)، وتم التخلص من السائل المتدفق من العمود.

5- أضفنا 700 ميكرو لتر من دارئة الغسل –Wash Buffer- الممدد بالإيتانول إلى عمود التنقية، وتم التثفيل لمدة دقيقة و التخلص من السائل المتدفق من العمود –Flow-Through– وإرجاع العمود إلى نفس أنبوب الجمع. مع الانتباه إلى أن دارئة الغسل المرفقة مع عتيدة العزل مركزة، لذلك يجب قبل البدء بخطوات العمل أن يتم تمديد دارئة الغسل بوساطة الايتانول (96-100%) وذلك بإضافة 45 مل ايتانول إلى كمية دارئة الغسل- 9 مل- للوصول إلى حجم كلي يعادل 54 مل.

6- ثفلت أعمدة التنقية الفارغة لمدة دقيقة واحدة من أجل التخلص بشكل كامل من بقايا دارئة الغسل. هذه الخطوة ضرورية لتجنب بقايا الايتانول في محلول Purified DNA، لأن وجود الإيتانول فيها من الممكن أن يثبط العمليات الأنزيمية اللاحقة.

7- نقل عمود التنقية إلى أنابيب microcentrifuge سعة 1.5 أو 2مل، ومن ثم أضيف 50 ميكرولتر من دارئة الاستخلاص –Elution Buffer- إلى مركز غشاء عمود التنقية، وثُفل لمدة دقيقة. مع إمكانية إنقاص حجم دارئة الاستخلاص إذا كانت كمية الدنا قليلة وذلك من أجل زيادة تركيز الدنا، مع التأكيد أن حجم دارئة الاستخلاص المضاف لا يؤثر بشكل ملحوظ على ناتج الدنا إذا كان يتراوح بين 20 و 50 ميكرو لتر، لكن يجب أن لا يكون الحجم المضاف من الدارئة أقل من 10 ميكرو لتر.

8- التخلص من عمود التنقية.

9- قيس تركيز الدنا المنقى الذي تم استخلاصه بواسطة مقياس الطيف الضوئي على طول موجة 260 نانومتر و قياس نقاوته و ذلك بحساب النسبة: الامتصاص على طول الموجة 260/ الامتصاص على طول الموجة 280 وحُفظ في إبندورف عقيم بالدرجة - 20.

ب- استخلاص المنطقة المصانة conserved region من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة بعد التهضيم بأنزيمات الهضم

تم قص عصابة المنطقة المصانة conserved region من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة بعد ترحيلها على هلامة الأغاروز 2% تحت أشعة UV و استخلاصها بواسطة عتيدة استخلاص الدنا من الهلام و ذلك عبر البروتوكول التالي:

1- تم قص جزء الهلامة الحاوي على العصابة بواسطة مشرط أو شفرة، مع مراعاة أن يكون القص للمنطقة الحاوية على العصابة فقط لتقليل حجم الهلامة. و وضع الجزء المقصوص في أنابيب 1.5 مل الموزونة سابقاً ومن ثم سجل وزن الهلامة. كان وزن جزء الهلام الحاوي على المنطقة المصانة 80 ملغ.
2- أضيف Binding Buffer إلى الهلامة بنسبة (1:1)، أي أضيف 80 مكرولتر إلى 80 ملغ من هلامة الأغاروز المحتوية على المنطقة المصانة.
3- تم حضن مزيج الهلامة بالدرجة 50-60 ° ولمدة 10 دقائق في حمام مائي (JSR,South Korea) أو حتى انحلال الهلامة بشكل كامل. و مزجت خلال هذه الفترة كل بضع دقائق عبر قلب الأنبوب من أجل تسهيل عملية انحلال الهلامة. يجب أن يكون لون المحلول أصفر وهذا يشير أن درجة PH مثالية لربط الـ DNA.
4- بما أن طول قطعة DNA لدينا في المنطقة المصانة (181 زوج أساس)أصغر من 500 زوج أساس فقد أضفنا إيزوبربانول 100% إلى محلول الهلامة المنحلة بنسبة (1:2) ومزجت بشكل كامل ، أي تمت إضافة 80 مكرولتر من إيزوبربانول إلى 80 ملغ (المنطقة المصانة) من الهلامة المنحلة.

5- تم نقل محلول الهلامة المنحلة إلى عمود التنقية ، ثم ثُقّل لمدة دقيقة في مثفلة إبندورف (HERMLE,Germany) وتم التخلص من السائل المتدفق من العمود –Flow-Through– وإرجاع العمود إلى نفس أنبوب الجمع. ثم ثُقل عمود التنقية لمدة 30 إلى 60 ثانية، وتم التخلص من السائل المتدفق من العمود.

6- أضيف 700 ميكرو لتر من دارئة الغسل –Wash Buffer- الممدد بالايتانول إلى عمود التنقية، وتم التثفيل لمدة دقيقة والتخلص من السائل المتدفق من العمود –Flow-Through– وإرجاع العمود إلى نفس أنبوب الجمع.
مع الانتباه إلى أن دارئة الغسل المرفقة مع عتيدة العزل مركزة، لذلك يجب قبل البدء بخطوات العمل أن يتم تمديد دارئة الغسل بوساطة الايتانول (96-100%) ، وذلك بإضافة 45 مل ايتانول إلى كمية دارئة الغسل- 9 مل- للوصول إلى حجم كلي يعادل 54 مل.

7- ثفلت أعمدة التنقية الفارغة لمدة دقيقة واحدة في مثفلة إبندورف من أجل التخلص بشكل كامل من بقايا دارئة الغسل. هذه الخطوة ضرورية لتجنب بقايا الايتانول في محول Purified DNA، لأن وجود الإيتانول فيها من الممكن أن يثبط العمليات الأنزيمية اللاحقة.

8- نقل عمود التنقية إلى أنابيب microcentrifuge سعة 1.5 أو 2مل، ومن ثم أضيف 50 ميكرو لتر من دارئة الاستخلاص –Elution Buffer- إلى مركز غشاء عمود التنقية، وثُفل لمدة دقيقة.

9- تم التخلص من عمود التنقية

10- قيس تركيز الدنا المنقى الذي تم استخلاصه بواسطة مقياس الطيف الضوئي على طول موجة 260 نانومتر و قياس نقاوته و ذلك بحساب النسبة : الامتصاص على طول الموجة 260/ الامتصاص على طول الموجة 280 وحُفظ في إبندورف عقيم بالدرجة -20.

14-4 استخلاص البلاسميد من الهلام بعد التهضيم بأنزيمات الهضم

تم قص عصابة البلاسميد PCIبعد هضمها وترحيلها على هلامة الأغاروز 2% تحت أشعة UV واستخلاصها بواسطة عتيدة استخلاص الدنا من الهلام وذلك عبر البروتوكول التالي:

1- تم قص جزء الهلامة الحاوي على العصابة بواسطة مشرط أو شفرة، مع مراعاة أن يكون القص للمنطقة الحاوية على العصابة فقط لتقليل حجم الهلامة

المقصوصة. ووضع الجزء المقصوص في أنابيب 1.5 مل الموزونة سابقاً ومن ثم سجل وزن الهلامة. كان وزن جزء الهلام الحاوي على البلاسميد المهضّم يساوي 110 ملغ.

2- أضيف Binding Buffer إلى الهلامة بنسبة (1:1)، أي تمت إضافة 110 مكرولتر من Binding Buffer إلى 110 ملغ من هلامة البلاسميد المهضّم .

3- تم حضن مزيج الهلامة بالدرجة 50-60° ولمدة 10 دقائق في حمام مائي (JSR, South Korea) أو حتى انحلال الهلامة بشكل كامل. ومزجت خلال هذه الفترة كل بضع دقائق عبر قلب الأنبوب من أجل تسهيل عملية انحلال الهلامة.

4- تم نقل محلول الهلامة المنحلة إلى عمود التنقية ، ثم ثُفّل لمدة دقيقة في مثفلة إبندورف (HERMLE,Germany) وتم التخلص من السائل المتدفق من العمود –Flow-Through– وإرجاع العمود إلى نفس أنبوب الجمع. ثم ثفّل لمدة 30 إلى 60 ثانية، وتم التخلص من السائل المتدفق من العمود.

5- أضيف 700 ميكرو لتر من دارئة الغسل –Wash Buffer- الممدد بالايتانول إلى عمود التنقية، وتم التثفيل لمدة دقيقة والتخلص من السائل المتدفق من العمود –Flow-Through– وإرجاع العمود إلى نفس أنبوب الجمع.

مع الانتباه إلى أن دارئة الغسل المرفقة مع عتيدة العزل مركزة، لذلك يجب قبل البدء بخطوات العمل أن يتم تمديد دارئة الغسل بوساطة الايتانول (96-100%)و ذلك بإضافة 45 مل ايتانول إلى كمية دارئة الغسل- 9 مل- للوصول إلى حجم كلي يعادل 54 مل.

6- ثفلت أنابيب التنقية الفارغة لمدة دقيقة واحدة في مثفلة إبندورف من أجل التخلص بشكل كامل من بقايا دارئة الغسل. هذه الخطوة ضرورية لتجنب بقايا الإيتانول في محلول Purified DNA، لأن وجود الإيتانول فيها من الممكن أن يثبط العمليات الأنزيمية اللاحقة.

7- نقل عمود التنقية إلى أنابيب microcentrifuge سعة 1.5 أو 2مل، ومن ثم أضيف 50 ميكرو لتر من دارئة الاستخلاص –Elution Buffer- إلى مركز غشاء عمود التنقية، وتُفل لمدة دقيقة.

8- تم التخلص من عمود التنقية

9- قيس تركيز الدنا المنقى الذي تم استخلاصه بواسطة مقياس الطيف الضوئي على طول موجة 260 نانومتر و قياس نقاوته و ذلك بحساب النسبة : الامتصاص على طول الموجة 260/ الامتصاص على طول الموجة 280 وحفظ الـدنا المتبقي في إبندورف عقيم بالدرجة -20.

15-4 تفاعل ربط الجين بالبلاسميد ligation

إن الخطوة الأخيرة في بناء البلاسميد المأشوب هي وصل الجين المهضّمة بأنزيمات الهضم مع هيكل البلاسميد المهضّم بأنزيمات الهضم نفسها عن طريق أنزيم T4 dna ligase الذي يقوم بتحفيز تشكيل روابط الفوسفو إسترية الثنائية التساهمية و التي تربط النكليوتيدات بشكل دائم معاً .

تم تحديد كمية الجين اللازم إدخالها في تفاعل الربط مع 100غ من البلاسميد PCI المهضم حسب القانون التالي، على اعتبار أن النسبة المولية بين الجين والبلاسميد هي (3 جين : 1 بلاسميد)

كمية الجين المراد إدخالها بـ نانوغرام = النسبة المولية × [طول الجين bp/طول البلاسميد bp] × كمية البلاسميد بـ نانوغرام .

أ- ربط المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S بالبلاسميد PCI

تم إجراء تفاعل ربط المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S بالبلاسميد PCI بعد أن حسبت كمية الجين اللازم إدخالها في التفاعل مع 100 نانو غرام من البلاسميد حسب القانون السابق وعلى اعتبار أن النسبة المولية بين الجين و

البلاسميد = 3 جينة : 1 بلاسميد و طول الجين = 197 bp و طول البلاسميد = 4006 bp ، وبالتالي فإن كمية الجين تساوي 14,75 نانوغرام.

و بما أن تركيزها يساوي 41,4 نانوغرام/مكرولتر تم استخدام 0,59 مكرولتر من محلول الجين لإتمام التفاعل. وبما أن تركيز البلاسميد يساوي 29,9 نانوغرام/مكرولتر استخدم 3,4 مكرولتر من محلول البلاسميد لنحصل على 100 نانوغرام.

تم إجراء تفاعل الربط مع ligation بواسطة عتيدة T4 ligase من شركة (Thermo scientific) وفق البروتوكول التالي:

وضع في إبندورف سعة 0.2 مل 2 مكرولتر من الدارئة 10x t4 dna ligase، و 13 مكرولتر من الماء خالي النكلياز، و 0,6 مكرولتر من محلول الجين ،و 3,4 مكرولتر من البلاسميد، و1 مكرولتر من أنزيم T4 dna ligase. تم الحضن بالدرجة 16 طول الليل overnight بوضع الأنبوب في حمام مائي (JSR,South Korea) ثم تم تعطيل تفاعل الربط ligation بوضع الإبندورف في حمام مائي (JSR,South Korea) بدرجة حرارة 65 مدة 5 دقائق و من ثم حفظ ناتج ligation بالدرجة – 20 .

ب- ربط المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة بالبلاسميد

أجري تفاعل ربط المنطقة المصانة conserved region بالبلاسميد PCI بعد أن حسبت كمية الجين اللازم إدخالها في التفاعل مع 100 نانو غرام من البلاسميد حسب القانون السابق وعلى اعتبار أن النسبة المولية بين الجين و البلاسميد = 3 جين : 1 بلاسميد و طول الجين = 197 bp و طول البلاسميد = 4006 bp، فنتج لدينا أن كمية الجين اللازمة 13,55 نانوغرام. وبما أن تركيزها يساوي 32,3 نغ / مكرولتر، فقد استخدم 0,7 مكرولتر من محلول الجين لإتمام التفاعل. كما استخدم 3,4 مكرولتر من محلول البلاسميد للحصول على 100 نانوغرام .

تم إجراء تفاعل الربط مع البلاسميد ligation بواسطة عتيدة T4 ligase من شركة (Thermo scientific,Lithunia) وفق البروتوكول التالي:

وضع في إبندورف سعة 0.2 مل 2 مكرولتر من الدارئة T4 dna ligase 10x، و 12,9 مكرولتر من الماء خالي النكلياز، و0,7 مكرولتر من محلول الجين، و3,4 مكرولتر من البلاسميد، و1 مكرولتر من أنزيم T4 dna ligase . تم الحضن بالدرجة 16 طول الليل overnight بوضع الأنبوب في حمام مائي (JSR,South Korea)، ثم تم تعطيل تفاعل الربط ligation بوضع الإبندورف في حمام مائي (JSR,SouthKorea) بدرجة حرارة 65ْ مدة 5 دقائق، ومن ثم حفظ ناتج ligation بالدرجة – 20.

16-4 الاستحالة Transformation

بعد القيام بربط الجين مع البلاسميد نقوم بإدخال البلاسميد المأشوب ضمن جراثيم *E.coli* Top 10 المؤهلة بطريقة كلوريد الكالسيوم وفق البروتوكول التالي:

تمت إذابة competent cells المحفوظة في المجمدة بدرجة -80 على الثلج لمدة 15 دقيقة .

1- وُضع في إبندورف سعة 1,5 مل 60 مكرولتر من الجراثيم competent cells ، و2 مكرولتر من ناتج الربط ligation.
2- تُرك المزيج لمدة 30 دقيقة على الثلج .
3- نُقلت الأنابيب بسرعة من الجليد إلى الحمام المائي بدرجة 42 لمدة دقيقة واحدة.
4- وضعت الأنابيب مجدداً في الثلج لمدة دقيقتين .
5- أضيف 900 مكرولتر من وسط مرق LB دون صادات إلى الإبندورف الحاوي على ناتج الربط ligation .
6- تم الحضن في حاضنة هزازة ((JSR,South Korea)بالدرجة 37 لمدة 45 دقيقة وبسرعة اهتزاز 225 هزة/دقيقة.
7- بعد الانتهاء من الحضن تُفل الإبندورف بأقصى سرعة و تم التخلص من 800 مكرولتر من السائل الطافي ثم عُلقت الرسابة بالحجم المتبقي من مرق LB.

8- أُخذ 60 مكرولتر من محتوى الإبندورف بواسطة الممص الدقيق، وزُرع على أطباق تحوي LB أغار من شركة (Roth) مضاف لها الأمبيسيلين بتركيز 100 مكغ / مل ، حيث فُرش بواسطة الماسحة على كامل الطبق ثم دوّر الطبق بزاوية 60 درجة و تم الفرش مجدداً على كامل مساحة الطبق، وكررت هذه العملية 3 مرات.

9- تم حضن أطباق LB أغار في الدرجة 37 لمدة 24 ساعة.

أضيف الأمبيسيلين إلى LB أغار كي تنمو لدينا فقط مستعمرات الجراثيم الحاوية على البلاسميد المأشوب، لأن البلاسميد يحوي على جينة مقاومة الأمبيسيلين. ثم حضنت أطباق الزرع لمدة 24 ساعة في الدرجة 37 في الحاضنة (JSR,South Korea) ثم أخرجت للتحقق من نمو المستعمرات الجرثومية المحتوية على البلاسميد المأشوب.

4-17 استخلاص البلاسميد المأشوب من جراثيم *E.coli* Top 10 :

تم استخلاص البلاسميد المأشوب من جراثيم *E.coli* Top 10 بواسطة عتيدة عزل البلاسميد من المستنبت الجرثومي من شركة Euroclone ,Italy.

4-17-1 استخلاص البلاسميد الحاوي على المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S

أخذت مستعمرة جرثومية من المستعمرات النامية على طبق LB أغار بواسطة loop المخصص للزرع الجرثومي (العمل يكون بجوار اللهب)، و زرعت المستعمرة في 5 مل من وسط LB مرق الحاوي على صاد الأمبيسلين بتركيز 100 مكغ / مل، وحضنت بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة .

أُخذ ناتج الزرع في اليوم التالي. زُرع مجدداً في 50 مل من وسط LB مرق في أنبوب زرع سعة 50 مل وحُضن الأنبوب في حاضنة هزازة (JSR,South Korea) بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة وسرعة اهتزاز 225 هزة / دقيقة.

استخلص البلاسميد المأشوب في اليوم التالي من مزروع جراثيم الإيشريكية الكولونية Top 10 بواسطة عتيدة عزل البلاسميد من المستنبت الجرثومي من شركة Euroclone وفق الخطوات التالية:

- تُفل الأنبوب الحاوي على المستنبت الجرثومي بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق بالدرجة(+4) في مثفلة (BIOSAN,Germany).
- تم التخلص من السائل الطافي ثم أضيفن للرسابة 4 مل من المحلول I المضاف له RNase A وعُلقت الرسابة فيه بشكل كامل بواسطة الرجاجة .
- أضيف المحلول II ثم تم قلب الأنبوب وتدويره من 6 – 8 مرات للحصول على حلالة lysate صافية و حُضن بعد ذلك بدرجة حرارة الغرفة .
- أضيف إلى الأنبوب 4 مل من المحلول III المبرد مسبقاً بالدرجة 4 ثم مزجت الحلالة بلطف بواسطة القلب والتدوير من 6 – 8 مرات ثم حضنت في الثلج لمدة 5 دقائق .
- تم تهيئة عمود الاستخلاص بإضافة 2,5 مل من دارئة EQ إلى العمود، وتم تركها ليتم إفراغها عبر العمود بواسطة الجاذبية الأرضية. ثم تم استبعاد السائل المتدفق عبر العمود.
- رشحت الحلالة الجرثومية بواسطة المراشح المرفقة مع طاقم عزل البلاسميد من المستنبت الجرثومي، حيث وضعت المرشحة في قمع صغير لتثبيتها، ثم رطبت ببضع قطرات من الدارئة EQ قبل ترشيح الحلالة الجرثومية. تم صب الحلالة الجرثومية عبر المرشحة المرطبة بالدارئة ثم تم جمعها بعد الترشيح.
- نُقلت الرشاحة السابقة إلى العمود الخاص بالعتيدة ثم تُركت لتفرغ عبر العمود بواسطة الجاذبية الأرضية.
- غُسل العمود بـ 10 مل من دارئة غسل الدنا للتخلص من الشوائب، ثم استبعدت الغسالة.
- أضيف 5 مل من دارئة الشطف Elution Buffer مباشرة إلى المطرس الرابط للدنا في العمود من أجل الحصول على الدنا البلاسميدي النقي.

- أضفي 3,5 مل من الإيزبروبانول المحفوظ بدرجة حرارة الغرفة لترسيب الدنا البلاسميدي المشطوف. تم المزج جيداً ثم التثفيل بسرعة 9800 xg لمدة 25 دقيقة بالدرجة 4 و بعد انتهاء التثفيل استُبعد الطافي .
- جففت الرسابة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .
- حلت الرسابة الناتجة بـ 200 مكرولتر من دارئة TE بالاستعانة بحمام مائي درجة حرارته 65، ثم حُفظ البلاسميد المأشوب الناتج بالدرجة -20 .

2-17-4 استخلاص البلاسميد الحاوي على المنطقة المصانة conserved region من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة

أخذت مستعمرة جرثومية من المستعمرات النامية على طبق LB أغار بواسطة loop المخصص للزرع الجرثومي (العمل يكون بجوار اللهب)، وزرعت المستعمرة في 5 مل من وسط LB مرق الحاوي على صاد الأمبيسلين بتركيز 100 مكغ / مل، وتم الحضن بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة .

أُخذ ناتج الزرع في اليوم التالي، و زرع مجدداً في 50 مل من وسط LB مرق في أنبوب زرع سعة 50 مل، و تم حضن الأنبوب في حاضنة هزازة (JSR,South Korea) بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة وسرعة اهتزاز 225 هزة / دقيقة .

استخلص البلاسميد المأشوب في اليوم التالي من مزروع جراثيم الإيشريكية الكولونية Top 10 بواسطة عتيدة عزل البلاسميد من المستنبت الجرثومي من شركة Euroclone,Italy وفق الخطوات التالية:

- ثفل الأنبوب الحاوي على المستنبت الجرثومي بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق بالدرجة (+4) في مثفلة (BIOSAN, Germany)..
- تم التخلص من السائل الطافي ثم أضيف للرسابة 4 مل من المحلول I المضاف له RNase A ، وعلقت الرسابة فيه بشكل كامل بواسطة الرجاجة .

- أضيف المحلول II ثم قُلب الأنبوب وتم تدويره من 6 – 8 مرات للحصول على حلالة lysate صافية وُحضن بدرجة حرارة الغرفة.
- أضيف إلى الأنبوب 4 مل من المحلول III المبرد مسبقاً بالدرجة 4 ثم مزجت الحلالة بلطف بواسطة القلب و التدوير من 6 – 8 مرات، ثم حُضن في الثلج لمدة 5 دقائق .
- قمنا بتهيئة عمود الاستخلاص بإضافة 2,5 مل من دارئة EQ إلى العمود، و تركها ليتم إفراغها عبر العمود بواسطة الجاذبية الأرضية. ثم تم استبعاد السائل المتدفق عبر العمود.
- رشحت الحلالة الجرثومية بواسطة المراشح المرفقة مع طاقم عزل البلاسميد من المستنبت الجرثومي. حيث وضعت المرشحة في قمع صغير لتثبيتها ثم رُطبت ببضع قطرات من الدارئة EQ قبل ترشيح الحلالة الجرثومية . تم صب الحلالة الجرثومية عبر المرشحة المرطبة بالدارئة ثم تم جمعها بعد الترشيح .
- نقلنا الرشاحة السابقة إلى العمود الخاص بالعتيدة ثم تركناها تفرغ عبر العمود بواسطة الجاذبية الأرضية .
- غُسل العمود بـ 10 مل من دارئة غسل الدنا للتخلص من الشوائب ثم استبعدت الغسالة.
- أضيف 5 مل من دارئة الشطف Elution Buffer مباشرة إلى المطرس الرابط للدنا في العمود من أجل الحصول على الدنا البلاسميدي النقي.
- أضيف 3,5 مل من الإيزبروبانول المحفوظ بدرجة حرارة الغرفة لترسيب الدنا البلاسميدي المشطوف. مُزج جيداً ثم ثقّل بسرعة 9800 xg لمدة 25 دقيقة بالدرجة 4 . وبعد انتهاء التثفيل استُبعد الطافي.
- جففت الرسابة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
- حُلّت الرسابة الناتجة بـ 200 مكرولتر من دارئة TE بالاستعانة بحمام مائي درجة حرارته 65 ثم حفظت بالدرجة (-20).

18-4 هضم البلاسميد الحاوي على المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S

بعد أن تم الحصول على البلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S من المستعمرات الجرثومية، تم هضمه بواسطة أنزيمات الهضم Xho I و Xba I وفق البروتوكول التالي: وُضع في إبندورف سعة 0.2 مل 4 مكرولتر من البلاسميد، و4 مكرولتر من الدارئة 10x tango، و9 مكرولتر من الماء خالي النكلياز، و1 ميكرولتر من الأنزيم Xho I، و 2 ميكرولتر من الأنزيم Xba I، بحيث بلغ الحجم الكلي في الإبندورف 20 ميكرولتر ثم تم الحضن بدرجة 37 مدة ساعتين، ثم تم ترحيل 10 مكرولتر من ناتج الهضم على هلامة الأغاروز1%.

19-4 هضم البلاسميد الحاوي على المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة conserved region

بعد الحصول على البلاسميد الحاوي على المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة conserved region من المستعمرات الجرثومية تم هضمه بواسطة أنزيمات الهضم Xho I و Xba I وفق البروتوكول التالي : وُضع في إبندورف سعة 0.2 مل 4 مكرولتر من البلاسميد، و 4 مكرولتر من الدارئة 10x tango، و9 مكرولتر من الماء خالي النكلياز، و1 ميكرولتر من الأنزيم Xho I، و 2 ميكرولتر من الأنزيم Xba I، بحيث بلغ الحجم الكلي في الإبندورف 20 ميكرولتر. ثم تم الحضن بدرجة 37 مدة ساعتين، ثم تم ترحيل 10 مكرولتر من ناتج الهضم على هلامة الأغاروز1%.

20-4 تفاعل PCR للمنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ضمن البلاسميد PCI

تم إجراء تفاعل PCR باستخدام عتيدة PCR من شركة Thermo scientific باستخدام المشارع السابقة للجين والتي تم تصنيعها في هيئة الطاقة الذرية.

المشرع المباشر : AACTCGAGATGAATTGGGGATCTTATGGGC

المشرع العكسي : ATTCTAGATCACTCTTGCGAACGTACTCC

حضّر حجم نهائي قدره 25 مكرولتر لتفاعل PCR يحوي على دارئة خاصة بالتفاعل بتركيز 1X، و2mM من كلوريد المغنزيوم $MgCl_2$، و0.2 mM من كل نكليوتيد ثلاثي الفوسفات منزوع الأوكسجين dNTPs، و0.025u/µlمن أنزيم Taq بوليمراز (Thermo scientific,Lithuania)، و0.4µM من كل مشرع و 250 ng/µl من الدنا الجينومي المستخلص. بُرمج جهاز المدوّر الحراري Thermocycler (Cleaver,UK) لينجز 35 دورة تتألف كل منها من المراحل المبينة في الجدول (7) :

الجدول (7) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ضمن البلاسميد PCI

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة	الخطوة
1	5 دقائق	94	التمسخ البدئي initial denaturation
35	دقيقة	94	التمسخ denaturation
	45 ثانية	56	الالتحام annealing
	دقيقة و نصف	72	الاستطالة extension
1	5 دقائق	72	Final extension

و أجري رحلان لناتج تضخيم المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ضمن البلاسميد على هلامة الأغاروز بتركيز 2%.

4-21 تفاعل PCR للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة ضمن البلاسميد PCI

تم إجراء تفاعل PCR باستخدام عتيدة PCR من شركة Thermo scientific و باستخدام المشارع السابقة للجين التي تم تصنيعها في هيئة الطاقة الذرية.

المشرع المباشر

AACTCGAG ATT CGG CTA AAA ATG GCC

المشرع العكسي

AT TCTAGACAG GAC CAC CCC CAC CTA

حضّر حجم نهائي قدره 25 مكرولتر لتفاعل PCR يحوي على دارئة خاصة بالتفاعل بتركيز 1X، و 2mM من كلوريد المغنزيوم $MgCl_2$، و 0.2 mM من كل نكليوتيد ثلاثي الفوسفات منزوع الأوكسجين dNTPs، و 0.025u/µl من أنزيم Taq بوليمراز (Thermo scientific,Lithuania)، و 0.4µM من كل مشرع، و 250 ng/µl من الدنا الجينومي المستخلص. بُرمج جهاز المدوّر الحراري Thermocycler (Cleaver,UK) لينجز 35 دورة تتألف كل منها من المراحل المبينة في الجدول (8):

الجدول (8) البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة	الخطوة
1	5 دقائق	94	التمسخ البدئي initial denaturation
35	دقيقة	94	التمسخ denaturation
	45 ثانية	56	الالتحام annealing
	دقيقة و نصف	72	الاستطالة extension
1	5 دقائق	72	Final extension

وأجري رحلان لناتج تضخيم المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة ضمن البلاسميد PCI على هلامة الأغاروز بتركيز 2%.

22-4 تحضير حيوانات التجربة :

استخدم ثمانية عشر فأر إناث من سلالة BALB\c وهي سلالة معدلة جينياً تمتاز بحساسيتها لليشمانية تتراوح أعمارها من 4 – 6 أسابيع. قسمت إلى ثلاث مجموعات تحوي كل منها 6 فئران.

1- المجموعة الأولى :

حقنت فئران المجموعة الأولى حقناً عضلياً بـجرعة 50 مكغ من لقاح جين 18S بحجم 50 مكرولتر من PBS ثم تم إعطاء جرعة داعمة من اللقاح بعد أسبوعين من الجرعة الأولى.

2- المجموعة الثانية :

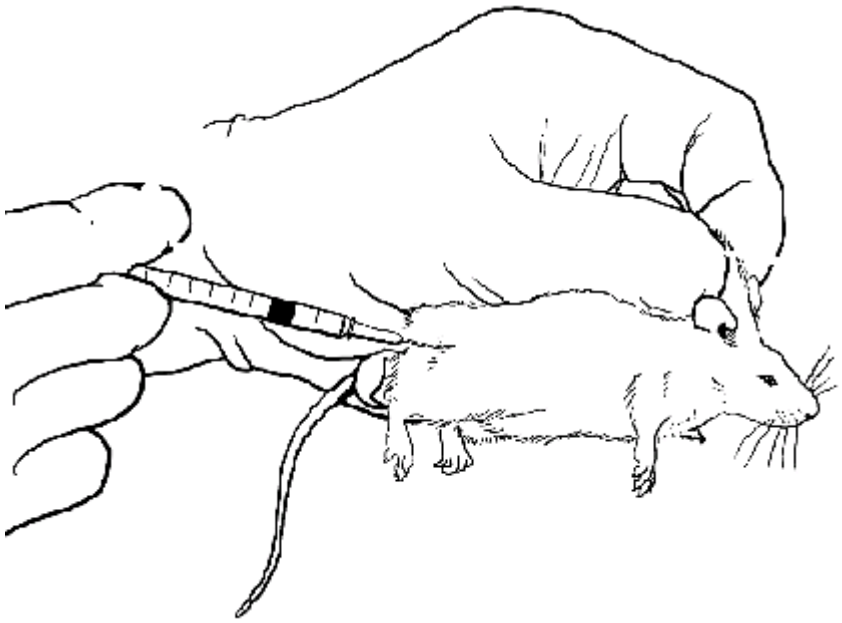
حقنت فئران المجموعة الثانية حقناً عضلياً بـ 50 مكغ من البلاسميد PCI بحجم 50 مكرولتر من PBS ثم تم إعطاء جرعة داعمة بعد أسبوعين من الجرعة الأولى.

3- المجموعة الثالثة :

حقنت فئران المجموعة الثالثة حقناً عضلياً بـ 50 مكرولتر من الدارئة الفوسفاتية PBS و ذلك وفق البروتوكول المتبع مع فئران كل من المجموعتين الأولى و الثانية .

1-22-4 الحقن العضلي

وضع الفأر على سطح القفص وتم سحب الجلد في منطقة خلف الأذنين بواسطة السبابة والإبهام بحيث يتشكل مثلث. وحددت المنطقة من الفخذ في الرجل اليسرى التي تحوي الكتلة العضلية المناسبة للحقن، ثم حقنت بواسطة محقنة قياس 1 مل بحيث تم إدخال الإبرة بشكل عمودي .



الشكل (21) طريقة الحقن العضلي لفئران التجربة

4-22-2 اختبار التحدي

تم عدّ الطفيليات في عبوة flask الزرع التي تحوي السلالة وحُسب الحجم الواجب تعليق كامل الطفيليات به حتى تأخذ كل فأرة جرعة من الطفيليات مقدارها 5×10^6 طفيلي. كان عدد الطفيليات في عبوة flask الزرع مساوياً لـ 20×10^6 لذلك تم أخذ 2.5 مل من عبوة الزرع، وتم تثفيلها 5000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق بالدرجة (+4) . ثم عُلّقت رسابة الطفيليات بـ 1 مل من وسط RPMI المدعم بمصل العجل الجنيني.

تم إجراء اختبار التحدي بعد أسبوعين من تلقي الفئران للجرعة الداعمة من البلاسميد المأشوب، وذلك بحقن 5×10^6 من مشيقات الليشمانية المدارية في أسفل القدم اليسرى تحت الجلد (63).

4-22-3 متابعة تطور الإصابة

اعتُمد مقياس التورم في قدم الفئران الممنعة لمتابعة تطور الإصابة في المجموعات المدروسة، حيث تم قياس ثخانة قدمي كل فأرة (القدم الممنعة و القدم الأخرى الشاهدة غير الممنعة)، بواسطة المسماك caliper وحساب الفرق بين ثخانتي القدمين، ثم تكرار عملية القياس كل أسبوعين بدءاً من الأسبوع 0 الذي قمنا فيه باختبار التحدي ولمدة 6 أسابيع (63,64).

4-22-4 الاعتيان

1- خُدر الفأر بوضعه تحت ناقوس محكم الإغلاق مع قطعة من القطن المبلل بالإيتر الإيتيلي لمدة ثلاث دقائق حتى توقف الفأر عن الحركة. يجب ألا يترك الفأر أكثر من ذلك حتى لا يموت. ثم تم إخراجه و وُضع على جنبه.
2- أدخل ممص باستور زجاجي معقم بلطف وهدوء في زاوية العين الأنسية وتم تدوير الممص قليلاً مع الاستمرار في إدخاله حتى نلاحظ صعود الدم في الممص.
3- ثُبت الممص حتى استمرار صعود الدم بالخاصة الشعرية.
4- سحبت الماصة بهدوء عندما توقف صعود الدم، وتم إفراغ الدم بأنبوب إبندورف والانتظار إلى أن يتخثر الدم تلقائياً بدرجة حرارة المخبر حيث يتطلب ذلك حوالي نصف ساعة ثم تم تثفيله.
5- وضعت قطرة مضادة للالتهاب في عين الفأر ثم تم إنعاشه وذلك بتعريضه للهواء الطلق ثم إعادته للقفص.
6- تم تثفيل العينات بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق باستخدام المثفلة (HERMLE,Germany). حفظت عينات المصل في إبندورفات مرقمة وفق المجموعات المدروسة، بدرجة حرارة -20 لحين الاستخدام.
7- تم سحب الدم بعد أسبوعين من الجرعة الداعمة للبلاسميد المأشوب وبعد أسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع من اختبار التحدي.

25-4 مقايسة السيتوكينات

تمت المقايسة باستخدام عتيدة من شركة koma biotech,South Korea لمقايسة كل من :الأنترفيرون الفأري mouse IFN-γ و الإنترلوكين 12 الفأري mouse IL-12 و الإنترلوكين 4 الفأري mouse IL-4 بواسطة مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ذو الشطيرة ELISA sandwich .

1-25-4 مقايسة الإنترفيرون غاما (IFNγ)

سمحت هذه العتيدة بمقايسة كمية لمستويات الأنترفيرون غاما في السوائل البيولوجية مثل المصل والبلازما و أوساط الزرع الخلوي.كما سمحت هذه العتيدة بمقايسة تراكيز تصل إلى 23 بيكو غرام / مل بالنسبة للإنترفيرون غاما.

اعتمد الاختبار على حضن المحلول العياري والعينات المجهولة الحاوية على السيتوكين المطلوب معايرته في آبار الصفائح المكروية للعتيدة التي تكون مغطاة بأضداد هذا السيتوكين الفأرية، مما سمح بارتباط أضداد الإنترفيرون غاما مع الأضداد السابقة . تم كشف الإنترفيرون غاما المرتبط مع الأضداد من خلال إضافة أضداد للإنترفيرون غاما فأرية مقترنة بالبيوتين ،Biotinylated IFN-γ antibody فترتبط مع الإنترفيرون غاما المرتبط بالأضداد التي تغطي الصفيحة مؤدية لتشكل معقد ضد – مستضد – ضد . تم كشف المعقد السابق بإضافة السترتبتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار streptavidin-HRP الذي يرتبط مع أضداد الأنترفيرون غاما الفأرية المقترنة بالبيوتين أثناء الحضن. يؤثر البيروكسيداز في حال وجود المعقد السابق على محلول الركازة تترامیتیل البنزیدین TMB-Substrate الذي تمت إضافته في مرحلة لاحقة فحصلنا على منتج ملون تقاس امتصاصيته بطول موجة 450 نانو متر . تتناسب شدة الامتصاصية المقاسة مع تركيز IFN-γ في عينات مصول الفئران المفحوصة .

استخدم محلول عياري بتركيز 0.05 مكغ / مل لتحضير سلسلة عيارية تمت معاملتها كمعاملة مصول الفئران السابقة ، و بالتالي سمح لقارئ الأليزا بالحصول على المنحني العياري لقيم امتصاص المعياريات مقابل تراكيزها. تم الحصول على تراكيز العينات

المجهولة باستخدام هذا المنحني العياري بعد معرفة امتصاصيتها في طول الموجة السابق.

أ - تحضير المحاليل و التخزين :

1- تركت العتيدة بعد إخراجها من البراد، قبل فتح أي من الزجاجات، الوقت اللازم لتصل درجة حرارتها إلى درجة حرارة المخبر 20 – 25 م .
2- مدد محلول الغسل 20 مرة قبل استخدامه حيث أضيف 50 مل من محلول الغسل إلى 950 مل من الماء المقطر .
3- حلت الأضداد الفأرية للإنترفيرون غاما الموجودة بشكل جفادة في 250 مكرولتر من الماء المقطر. ثم مدد هذا المحلول بمحلول تمديد العينات assay diluent بنسبة (1:20)
4- مدد محلول الستربتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار بواسطة محلول تمديد العينات assay diluent بنسبة (1:20)
5- حضرت السلسلة المعيارية بنسبة (1:2) و ذلك وفق الجدول (8):

الجدول (9) تحضير السلسلة العيارية لعتيدة الإنترفيرون غاما

تركيز العياري	طريقة التمديد	رقم الخطوة
1500 pg/ml	نضيف 15 مكرولتر من العياري إلى 0.485 مكرولتر من المحلول الممدد للعينات	1
750 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 1 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	2
375 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 2 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	3
187.5 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 3 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	4

5	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 4 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	93.75 pg/ml
6	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 5 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	46.875 pg/m
7	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 6 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	23.4375 pg/m

خطوات العمل :

كررت جميع المقايسات للسلسلة العيارية والعينات مرتين حيث خصص بئرين لكل تركيز من السلسلة العيارية و لكل عينة من العينات المجهولة .

1- وضعت الكواشف في درجة حرارة المخبر لمدة نصف ساعة على الأقل لتبلغ درجة حرارتها 20-25 م قبل بدء المعايرة. حُضر محلول الغسل والسلسلة العيارية كما هو موصوف في الفقرات السابقة .
2- سحبت الصفيحة الرئيسية الملبسة بالأضداد من كيسها القصديري و أخذ العدد المطلوب من الآبار و أعيد تخزين باقي الآبار في الكيس القصديري الذي يحفظ من جديد في درجة الحرارة 4 م.
3- حددت الآبار المطلوبة لكل من السلسلة العيارية والعينات والناصع الذي يحوي فقط المحلول الممدد للعينات .
4- غسلت الآبار السابقة بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل الممدد و أعيد الغسيل 4 مرات .
5- نضع 100 مكرولتر من محاليل السلسلة العيارية في الآبار المحددة لها و 100 مكرولتر من محلول تمديد العينات في البئر المخصص للناصع و 100 مكرولتر من العينات في الآبار المخصصة للعينات ثم مزجت جيداً بواسطة الممص المكروي.
6- تم تغطية الصفيحة وحضنت لمدة ساعتين في درجة حرارة المخبر.

7- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل و أعيدت عملية الغسل 3 مرات .

8- أضيف إلى كل بئر 100 مكرولتر من الأضداد الفأرية للإنترفيرون غاما الموسومة بالبيوتين ثم حضنت لمدة ساعتين في درجة حرارة المخبر .

9- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل وأعيدت عملية الغسل 3 مرات .

10- أضيف 100 مكرولتر من محلول الستربتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار إلى كل بئر وحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة .

11- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل وأعيدت عملية الغسل 3 مرات.

12- أضيف إلى كل بئر 100 مكرولتر من محلول الركازة تتراميتيل بنزيدين وحضنت لمدة تتراوح بين (12-22) دقيقة في درجة حرارة المخبر .

13- أضيف 100 مكرولتر من المحلول الموقف للتفاعل إلى كل بئر فتحول اللون من الأزرق إلى الأصفر.

14- قرأت الامتصاصية بطول موجة 450 نانو متر، ثم رسم المنحني العياري الذي يربط قيم الامتصاصيات للسلسلة العيارية للإنترفيرون غاما مع تراكيزها و من معادلته نحسب تركيز العينات المجهولة .

4-25-2 مقايسة الإنترلوكين 12 (IL-12)

تسمح هذه العتيدة بمقايسة كمية لمستويات الإنترلوكين 12 في السوائل البيولوجية مثل المصل و البلازما و أوساط الزرع الخلوي و تسمح هذه العتيدة بمقايسة تراكيز تصل إلى و 39 بيكوغرام / مل لإنترلوكين 12 .

يعتمد الاختبار على حضن المحلول العياري و العينات المجهولة الحاوية على IL-12 المراد معايرته في آبار الصفائح المكروية للعتيدة التي تكون مغطاة بأضداد هذا السيتوكين الفأرية ، مما يسمح بارتباط أضداد الإنترلوكين 12مع الأضداد السابقة . يتم كشف الإنترلوكين 12 المرتبط مع الأضداد من خلال إضافة أضداد الإنترلوكين 12

فأرية مقترنة بالبيوتين ،Biotinylated IFN-γ antibody فترتبط مع الإنترلوكين 12 المرتبط بالأضداد التي تغطي الصفيحة مؤدية لتشكل معقد ضد – مستضد – ضد . يتم كشف المعقد السابق بإضافة السترتبتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار streptavidin-HRP الذي يرتبط مع أضداد الإنترلوكين 12 الفأرية المقترنة بالبيوتين أثناء الحضن . يؤثر البيروكسيداز في حال وجود المعقد السابق على محلول الركازة تتراميتيل البنزيدين TMB-Substrate الذي تتم إضافته في مرحلة لاحقة فنحصل على منتج ملون تقاس امتصاصيته بطول موجة 450 نانو متر . تتناسب شدة الامتصاصية المقاسة مع تركيز الإنترلوكين 12 في عينات مصول الفئران المفحوصة .

يستخدم محلول عياري بتركيز 0.1 مكغ / مل لتحضير سلسلة عيارية تتم معاملتها كمعاملة مصول الفئران السابقة ، و بالتالي يسمح قارئ الأليزا بالحصول على المنحني العياري لقيم امتصاص المعياريات مقابل تراكيزها .يتم الحصول على تراكيز العينات المجهولة باستخدام هذا المنحني العياري بعد معرفة امتصاصيتها في طول الموجة السابق .

أ - تحضير المحاليل و التخزين :

1- تترك العتيدة بعد إخراجها من البراد، قبل فتح أي من الزجاجات، الوقت اللازم لتصل درجة حرارتها إلى درجة حرارة المخبر 20 – 25 م .
2- يجب تمديد محلول الغسل 20 مرة قبل استخدامه حيث يضاف 50 مل من محلول الغسل إلى 950 مل من الماء المقطر .
3- يجب حل الأضداد الفأرية للإنترلوكين 12 الموجودة بشكل جفادة وزنها 2.2 مكروغرام في 275 مكرولتر من الماء المقطر ثم يتم تمديد هذا المحلول بمحلول تمديد العينات assay diluent بنسبة (1:20)
4- يجب تمديد محلول الستربتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار بواسطو محلول تمديد العينات assay diluent بنسبة (1:20)
5- يتم تحضير السلسلة المعيارية بنسبة (1:2) و ذلك وفق الجدول (10):

الجدول (10) تحضير السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلكين 12

تركيز العياري	طريقة التمديد	رقم الخطوة
2500 pg/ml	نضيف 12 مكرولتر من العياري إلى 0.488 مكرولتر من المحلول الممدد للعينات	1
1250 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 1 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	2
625 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 2 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	3
312.5 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 3 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	4
156.25 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 4 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	5
78.12 pg/m	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 5 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	6
39.06 pg/m	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 6 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	7

خطوات العمل :

كررت جميع المقايسات للسلسلة العيارية والعينات مرتين حيث خصص بئرين لكل تركيز من السلسلة العيارية و لكل عينة من العينات المجهولة .

1- وضعت الكواشف في درجة حرارة المخبر لمدة نصف ساعة على الأقل لتبلغ درجة حرارتها 20-25 م قبل بدء المعايرة. حُضر محلول الغسل والسلسلة العيارية كما هو موصوف في الفقرات السابقة .

2- سحبت الصفيحة الرئيسية الملبسة بالأضداد من كيسها القصديري و أخذ العدد المطلوب من الآبار و أعيد تخزين باقي الآبار في الكيس القصديري الذي يحفظ من جديد في درجة الحرارة 4 م.

3- حددت الآبار المطلوبة لكل من السلسلة العيارية والعينات والناصع الذي يحوي فقط المحلول الممدد للعينات .

4- غسلت الآبار السابقة بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل الممدد و أعيد الغسيل 4 مرات .

5- وضع 100 مكرولتر من محاليل السلسلة العيارية في الآبار المحددة لها و 100 مكرولتر من محلول تمديد العينات في البئر المخصص للناصع و 100 مكرولتر من العينات في الآبار المخصصة للعينات ثم مزجت جيداً بواسطة الممص المكروي.

6- تم تغطية الصفيحة وحضنت لمدة ساعتين في درجة حرارة المخبر.

7- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل و أعيدت عملية الغسل 3 مرات .

8- أضيف إلى كل بئر 100 مكرولتر من الأضداد الفأرية للإنترفيرون غاما الموسومة بالبيوتين ثم حضنت لمدة ساعتين في درجة حرارة المخبر .

9- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل وأعيدت عملية الغسل 3 مرات .

10- أضيف 100 مكرولتر من محلول الستربتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار إلى كل بئر وحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة .

11- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل وأعيدت عملية الغسل 3 مرات.

12- أضيف إلى كل بئر 100 مكرولتر من محلول الركازة تتراميتيل بنزيدين وحضنت لمدة تتراوح بين (12-22) دقيقة في درجة حرارة المخبر .

13- أضيف 100 مكرولتر من المحلول الموقف للتفاعل إلى كل بئر فتحول اللون من الأزرق إلى الأصفر.

14- قرأت الامتصاصية بطول موجة 450 نانو متر، ثم رسم المنحني العياري الذي يربط قيم الامتصاصيات للسلسلة العيارية للإنترفيرون غاما مع تراكيزها و من معادلته نحسب تركيز العينات المجهولة . يضاف إلى كل بئر 100 مكرولتر من محلول الركازو تتراميتيل بنزيدين و تحضن لمدة تتراوح بين (23-33) دقيقة في درجة حرارة المخبر .

15- أضيف 100 مكرولتر من المحلول الموقف للتفاعل إلى كل بئر فيتحول اللون من الأزرق إلى الأصفر.

قرئت الامتصاصية بطول موجة 450 نانو متر ، ثم نرسم المنحني العياري الذي يربط قيم الامتصاصيات للسلسلة العيارية للإنترلوكين 12 مع تراكيزها و من معادلته نحسب تركيز العينات المجهولة .

3-25-4 مقايسة الإنترلوكين 4 (IL4)

تسمح هذه العتيدة بمقايسة كمية لمستويات الإنترلوكين 4 في السوائل البيولوجية مثل المصل و البلازما و أوساط الزرع الخلوي و تسمح هذه العتيدة بمقايسة تراكيز تصل إلى 16 بيكوغرام / مل للإنترلوكين 4 .

يعتمد الاختبار على حضن المحلول العياري و العينات المجهولة الحاوية على السيتوكين المطلوب معايرته في آبار الصفائح المكروية للعتيدة التي تكون مغطاة بأضداد هذا السيتوكين الفأرية ، مما يسمح بارتباط أضداد الإنترلوكين 4 مع الأضداد السابقة . يتم كشف الإنترلوكين 4 المرتبط مع الأضداد من خلال إضافة أضداد للإنترلوكين 4 فأرية مقترنة بالبيوتين ،Biotinylated IL-4 antibody فترتبط مع الإنترلوكين 4 المرتبط بالأضداد التي تغطي الصفيحة مؤدية لتشكل معقد ضد – مستضد – ضد . يتم كشف المعقد السابق بإضافة السترتبتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار -streptavidin HRP الذي يرتبط مع أضداد الإنترلوكين الفأرية المقترنة بالبيوتين أثناء الحضن . يؤثر

البيروكسيداز في حال وجود المعقد السابق على محلول الركازة تترامیتیل البنزیدین TMB-Substrate الذي تتم إضافته في مرحلة لاحقة فنحصل على منتج ملون تقاس امتصاصيته بطول موجة 450 نانو متر . تتناسب شدة الامتصاصية المقاسة مع تركيز IL4 في عينات مصول الفئران المفحوصة .

يستخدم محلول عياري بتركيز 0.1 مكغ / مل لتحضير سلسلة عيارية تتم معاملتها كمعاملة مصول الفئران السابقة ، و بالتالي يسمح قارئ الأليزا بالحصول على المنحني العياري لقيم امتصاص المعياريات مقابل تراكيزها .يتم الحصول على تراكيز العينات المجهولة باستخدام هذا المنحني العياري بعد معرفة امتصاصيتها في طول الموجة السابق .

أ - تحضير المحاليل و التخزين :

1- تترك العتيدة بعد إخراجها من البراد، قبل فتح أي من الزجاجات، الوقت اللازم لتصل درجة حرارتها إلى درجة حرارة المخبر 20 – 25 م .
2- تم تمديد محلول الغسل 20 مرة قبل استخدامه حيث يضاف 50 مل من محلول الغسل إلى 950 مل من الماء المقطر .
3- حلت الأضداد الفأرية للإنترفيرون غاما الموجودى بشكل جفادة في 250 مكرولتر من الماء المقطر ثم يتم تمديد هذا المحلول بمحلول تمديد العينات assay diluent بنسبة (1:20)
4- مدد محلول الستربتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار بواسطو محلول تمديد العينات assay diluent بنسبة (1:20)
5- تم تحضير السلسلة المعيارية بنسبة (1:2) و ذلك وفق الجدول (10) :

الجدول (11) تحضير السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلوكين 4

تركيز العياري	طريقة التمديد	رقم الخطوة
2000 pg/ml	نضيف 10 مكرولتر من العياري إلى 0.49 مل من المحلول الممدد للعينات	1

1000 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 1 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	2
500 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 2 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	3
250 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 3 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	4
125 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 4 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	5
62.5 pg/m	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 5 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	6
31.25 pg/m	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 6 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	7
15.625 pg/ml	نضيف 0.25 مل من محلول العياري رقم 7 إلى 0.25 من محلول تمديد العينات	8

خطوات العمل :

يجب تكرار جميع المقايسات للسلسلة العيارية و العينات مرتين حيث يخصص بئرين لكل تركيز من السلسلة العيارية و لكل عينة من العينات المجهولة .

1- وضعت الكواشف في درجة حرارة المخبر لمدة نصف ساعة على الأقل لتبلغ درجة حرارتها 20-25 م قبل بدء المعايرة . حضر محلول الغسل و السلسلة العيارية كما هو موصوف في الفقرات السابقة .
2- سحبت الصفيحة الرئيسية الملبسة بالأضداد من كيسها القصديري و أخذ العدد المطلوب من الآبار وأعيد تخزين باقي الآبار في الكيس القصديري الذي يحفظ من جديد في درجة الحرارة 4 م .

3- حددت الآبار المطلوبة لكل من السلسلة العيارية و العينات والناصع التي يحوي فقط المحلول الممدد للعينات .
4- غسلت الآبار السابقة بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل الممدد و يعاد الغسيل 4 مرات .
5- وضع 100 مكرولتر من محاليل السلسلة العيارية في الآبار المحددة لها و 100 مكرولتر من محلول تمديد العينات في البئر المخصص للناصع و 100 مكرولتر من العينات في الآبار المخصصة للعينات ثم مزجت جيداً بواسطة الممص المكروي.
6- تم تغطية الصفيحة وحضنت لمدة ساعتين في درجة حرارة المخبر .
7- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل و تعاد عملية الغسل 3 مرات .
8- أضيف إلى كل بئر 100 مكرولتر من الأضداد الفأرية للإنترفيرون غاما الموسومة بالبيوتين ثم نحضن لمدة ساعتين في درجة حرارة المخبر .
9- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل و تعاد عملية الغسل 3 مرات .
10- أضيف 100 مكرولتر من محلول الستربتافيدين الموسوم ببيروكسيداز الفجل الحار إلى كل بئر و نحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة .
11- غسلت الآبار بواسطة 300 مكرولتر من محلول الغسيل و تعاد عملية الغسل 3 مرات.
12- أضيف إلى كل بئر 100 مكرولتر من محلول الركازة تتراميتيل بنزيدين و حضن لمدة تتراوح بين (4-14) دقيقة في درجة حرارة المخبر .
13- أضيف 100 مكرولتر من المحلول الموقف للتفاعل إلى كل بئر فيتحول اللون من الأزرق إلى الأصفر.

قرئت الامتصاصية بطول موجة 450 نانو متر ، ثم نرسم المنحني العياري الذي يربط قيم الامتصاصيات للسلسلة العيارية للإنترلوكين 4 مع تراكيزها و من معادلته حسب تركيز العينات المجهولة .

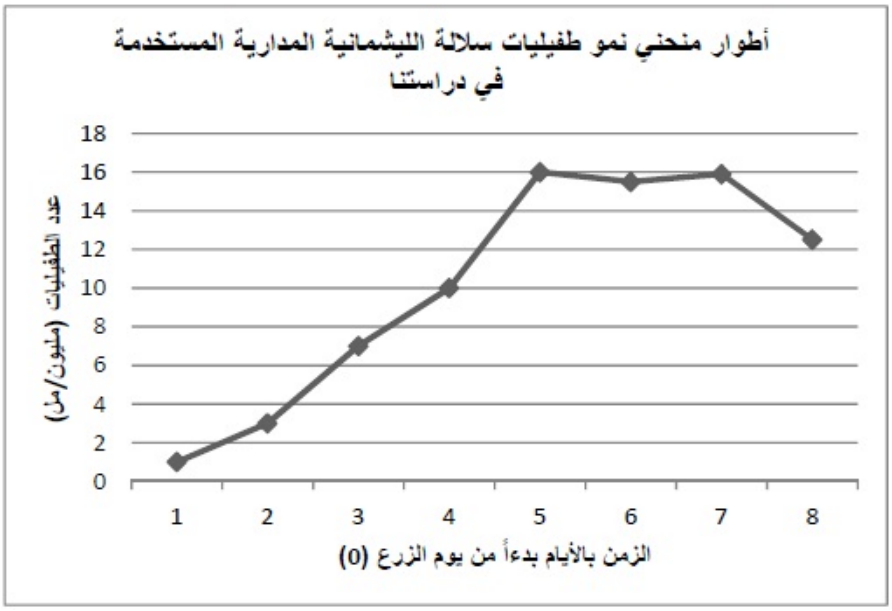
26-4 الدراسة الإحصائية

تم التعبير عن القيم بالمتوسط الحسابي X و الانحراف المعياري SD، اعتمد اختبار t-test لتحديد فيما إذا كان الفارق بين المتوسطات ناجماً عن الحظ و المصادفة أم أنه فارق جوهري ذو دلالة إحصائية. اعتمدت $P<0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً، و اعتمد معامل ارتباط Pearson لدراسة قوة علاقة الارتباط، حيث تكون العلاقة قوية كلما اقترب قيمة R من الواحد. استخدم برنامج Microsoft office Excel 2010 لمعالجة البيانات إحصائياً و تحليلها و رسم المنحنيات البيانية.

5- النتائج

5-1 توصيف سلالة الليشمانية المستخدمة في دراستنا

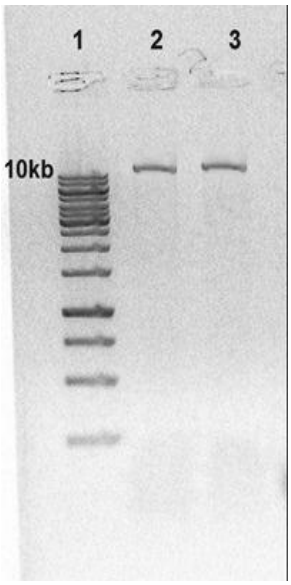
تنتمي هذه السلالة إلى نوع الليشمانية المدارية L.tropica. وقد أخذت من شاب يعيش في ريف دمشق. يؤدي زرع 10^6 طفيلي/مل من هذه الطفيليات على وسط RPMI-1640، المدعم بـ 10% مصل عجل جنيني منزوع المتممة، إلى نموها وفقاً لمنحني النمو المبين بالشكل (22). يتألف منحني نمو السلالة المختارة من الأطوار الأربعة التالية: طور الكمون في بداية الزرع حيث تحتاج الطفيليات إلى 24 ساعة للتأقلم 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 و النضج حيث يتوقف خلاله الطفيلي عن الانقسام، ويستمر هذا الطور لمدة 48 ساعة، و طور الانحلال الذي تبدأ فيه أعداد الطفيليات بالتناقص حيث يتحلل خلالها الطفيلي و يموت. 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 كما في الشكل (22).



الشكل (22) منحني تكاثر المشيقات لسلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا. تم الحصول على هذا المنحني بعد زرع مليون طفيلي في 5 مل من وسط RPMI-1640 الكامل و الحضن بالدرجة 26 و تعداد عدد الطفيليات يوميا

2-5 استخلاص الدنا الكلي

استخلص الدنا الجينومي من الرسابة الطفيلية باستخدام عتيدة خاصة باستخلاص الدنا لشركة (Thermo sceintific)، مع بعض التعديلات في خطوات العمل لضمان استخلاص الدنا من طفيليات الليشمانية بالشكل الأمثل. تم التأكد من جودة الدنا المستخلص من المستنبتات بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة أغاروز بتركيز 0,8%. بتعريض الهلامة لمنبع الأشعة فوق البنفسجية تبين وجود عصابة رئيسية تمثل الدنا الجينومي لطفيلي الليشمانية. أظهرت نتائج الرحلان جودة استخلاص الدنا حيث يظهر على الهلامة بشكل عصابة واحدة مما يشير إلى عدم تدركه أثناء الاستخلاص.



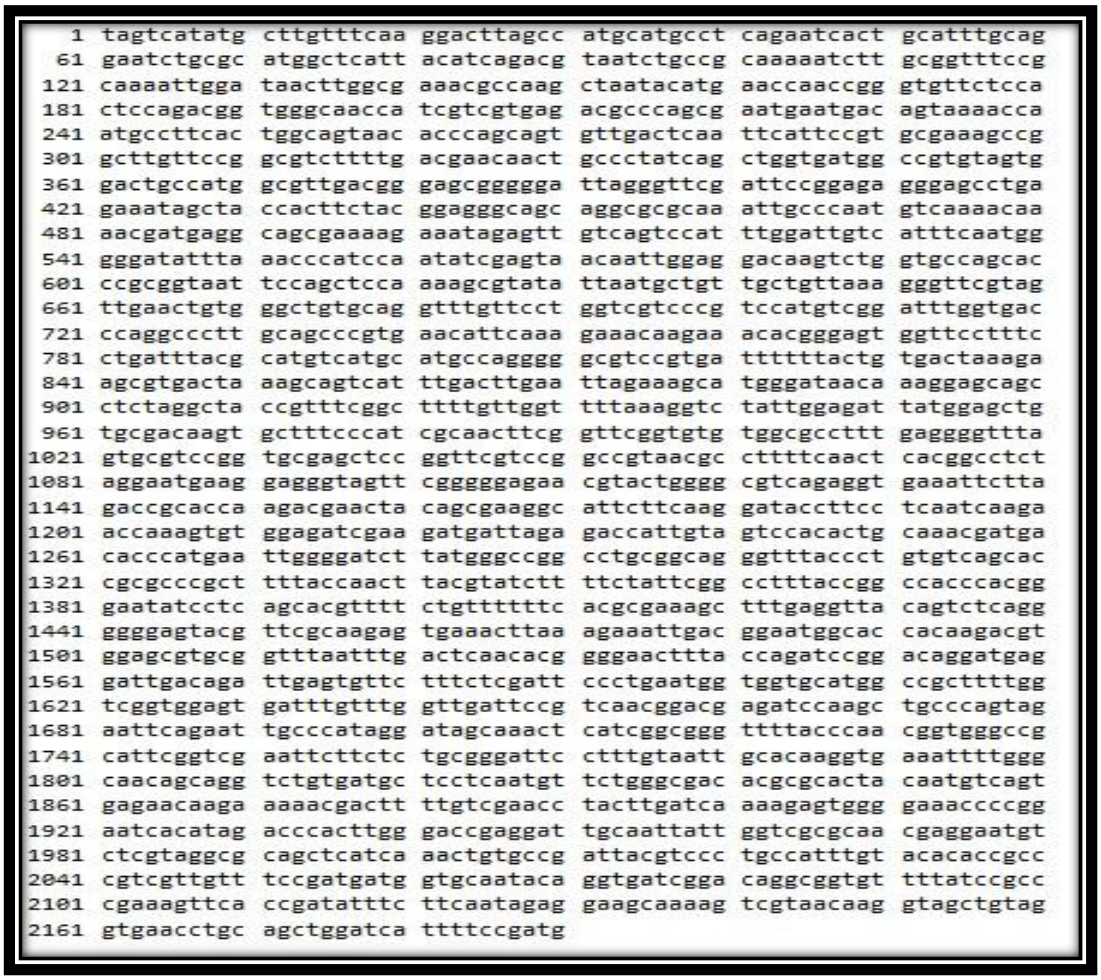
الشكل (23) رحلان الدنا الجينومي لطفيليات الليشمانية بالمقارنة مع واسم الأطوال معيارية. يمثل البئر 1 رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 1kb، ويمثل البئرين 2 و 3 عينيتي الدنا الجينومي مستخلصتين من طفيليات الليشمانية.

3-5 معايرة DNA

تمت معايرة الدنا المستخلص من طفيليات الليشمانية، وقيست نقاوته فكان تركيز الدنا المستخلص مساوياً لـ 120 ng/µl ، وكانت النسبة A260/A280 تساوي 1.8، مما يشير إلى نقاوة عالية لعينة الدنا المستخلصة وخلوها بشكل شبه كامل من البروتينات.

4-5 الدراسة البيولوجية الحاسوبية

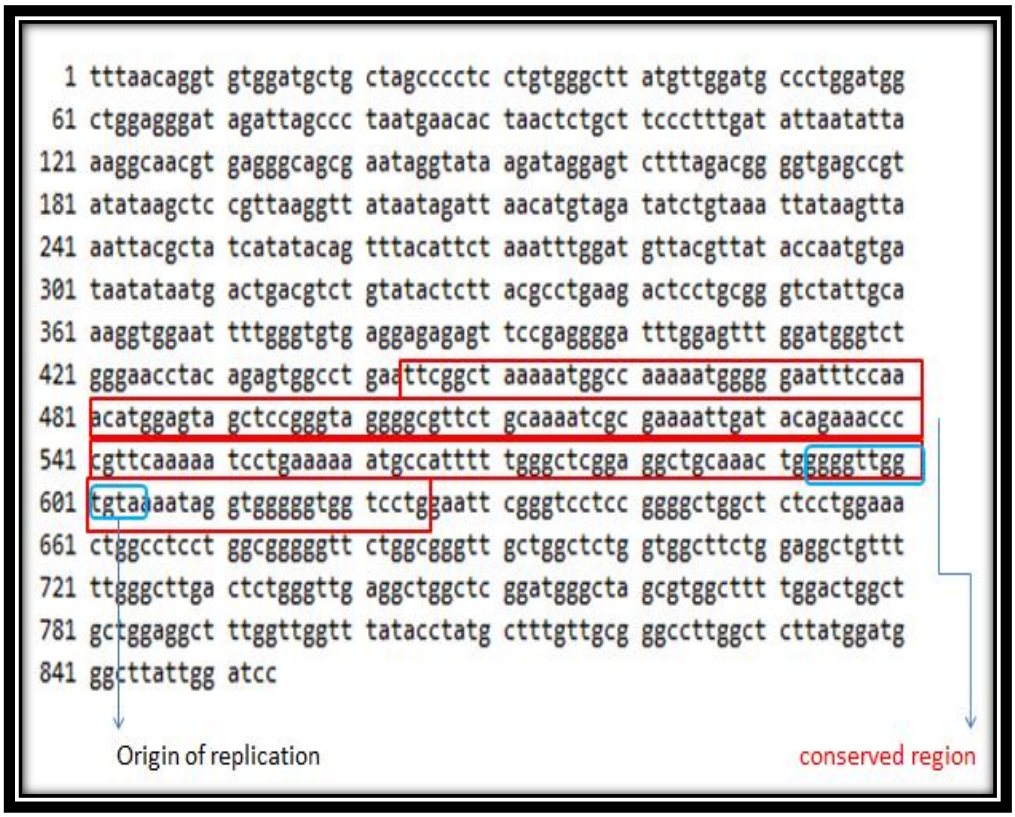
تم الاعتماد على البرامج البيولوجية الحاسوبية المتخصصة حيث حصلنا على تسلسل جين 18S، وتسلسل المنطقة المصانة conserved region لليشمانية المدارية، و المنشورة عالمياً على الموقع موقع NCBI وفق رقم الدخول Accession No GQ332363.1 بالنسبة لجين 18S الشكل (24) و رقم الدخول Accession No Z32843.1 بالنسبة للمنطقة المصانة conserved region الشكل (25).



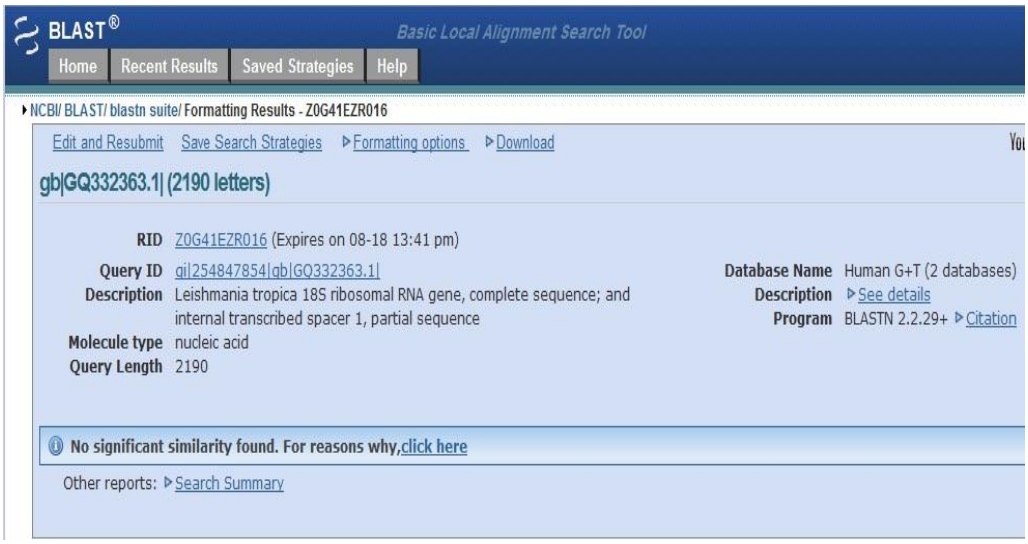
الشكل (24) تسلسل جين 18S لطفيلي الليشمانية المدارية في موقع NCBI و فق رقم الدخول

Accesion no GQ332363.1

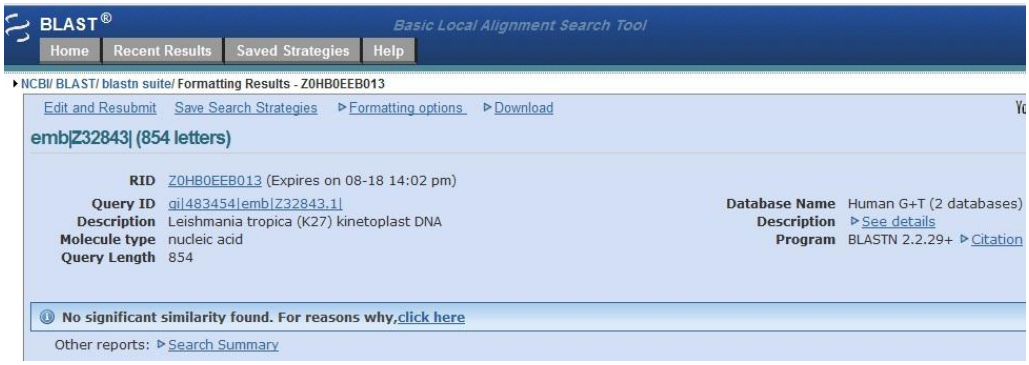
كما تم التأكد من عدم وجود تطابق لتسلسل كل من المورثتين المدروستين مع الجينوم البشري، وذلك كما في الشكل 26 بالنسبة لجين 18S والشكل (27) لجين المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة.



الشكل (25) تسلسل المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة لطفيلي الليشمانية المدارية وفق رقم الدخول Accesion no Z32843.1. تمثل المنطقة المحاطة بمستطيل كبير تسلسل المنطقة المصانة conserved region والتي قمنا بتنسيلها، وتمثل المنطقة المحاطة بمستطيل صغير تسلسل منطقة منشأ تضاعف الحلقة الصغيرة origin of replication.

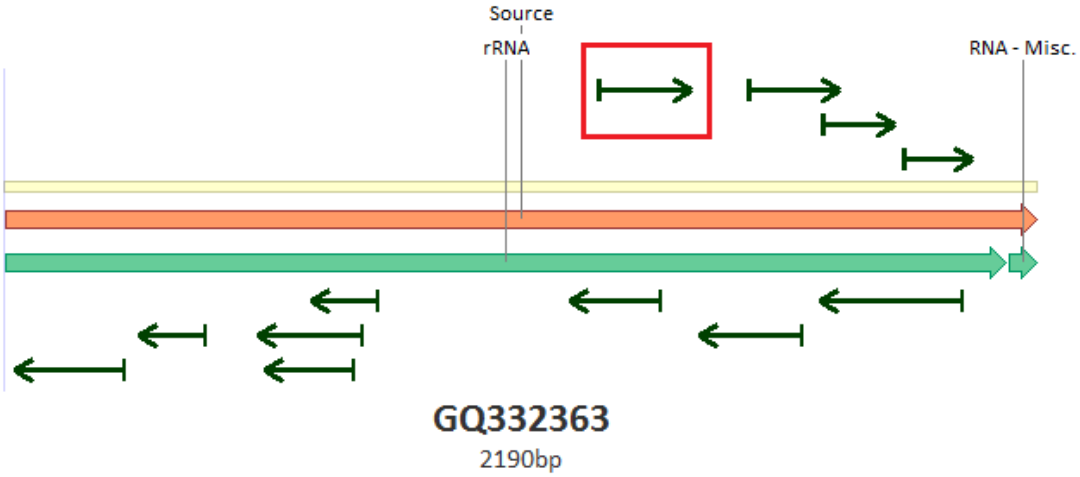


الشكل (26) عدم وجود تطابق بين تتالي جين 18S عند الليشمانية و تتالي الجينوم البشري بعد إجراء تطبيق Blast على موقع ncbi

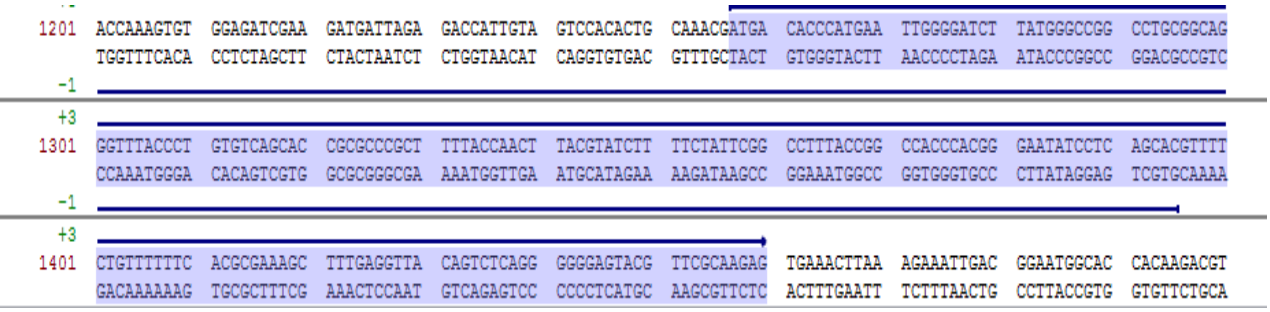


الشكل (27) عدم وجود تطابق ملحوظ بين تتالي الحلقة الصغيرة لليشمانية المدارية و الجينوم البشري بعد إجراء تطبيق Blast على موقع ncbi

ثم باستخدام برنامج Vector NIT Express – لمعرفة منطقة open reading frame - تم اختيار المنطقة المشار إليها بالسهم ضمن المستطيل والواقعة بين التتاليين (1267 و 1463) من جين 18S كما في الشكل (28).

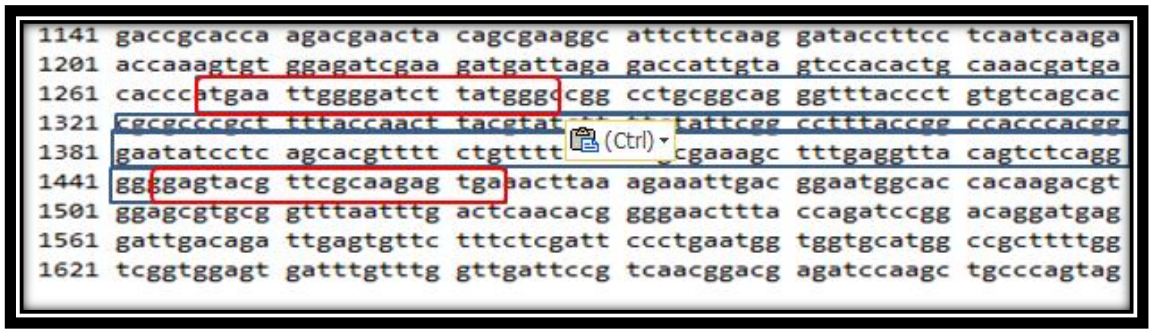


الشكل (28) جين 18S في الليشمانية المدارية باستخدام برنامج Vector NIT Express و يشير السهم ضمن المستطيل إلى منطقة open reading frame



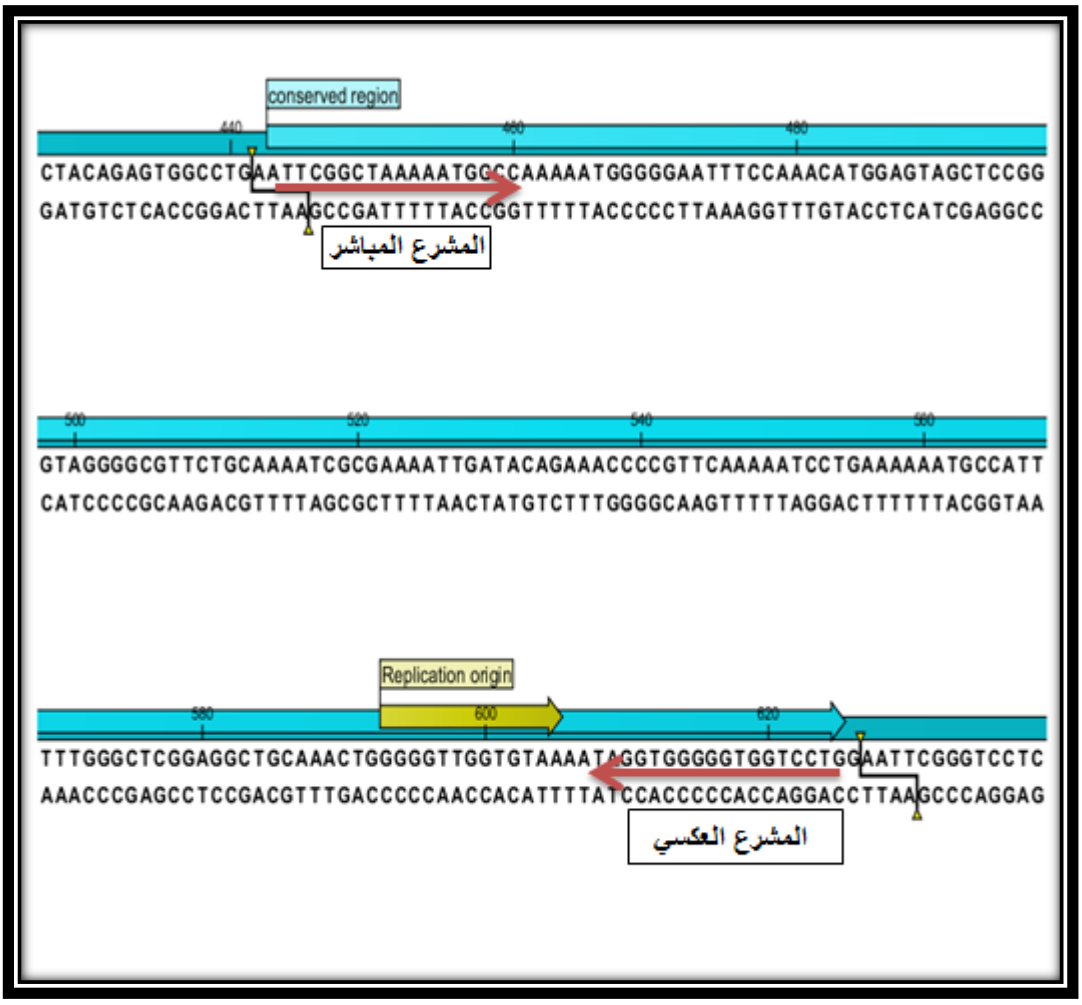
الشكل (29) تسلسل المنطقة open reading frame باستخدام برنامج Vector NIT Express

تم تصميم المشارع يدوياً واختبارموافقتها لشروط تصميم المشارع المشار إليها في المواد والطرق، وذلك باستخدام تطبيق Oligoanalyzer3.1 على النت. يبين الشكل (30) توضع المشرعين المباشر و العكسي ضمن المنطقة المنسلة من جين 18S.



الشكل (30) توضع المشرعين المباشر ATGAATTGGGGATCTTATGGGC **والعكسي**
TCACTCTTGCGAACGTACTCC **ضمن تسلسل المنطقة المنسلة من جين 18S**

تم دراسة تسلسل المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة بواسطة برنامج CLC Free Workbench 3.1 و تم تصميم المشارع المستخدمة في تنسيل هذه المنطقة يدوياً و اختبار موافقتها لشروط تصميم المشارع باستخدام تطبيق Oligoanalyzer3.1 على النت. يبين الشكل (31) توضع المشرعين المباشر و العكسي ضمن المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة.



الشكل (31) توضع المشرعين المباشر ATT CGG CTA AAA ATG GCC **والعكسي** CAG GAC CAC CCC CAC CTA **ضمن المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة**

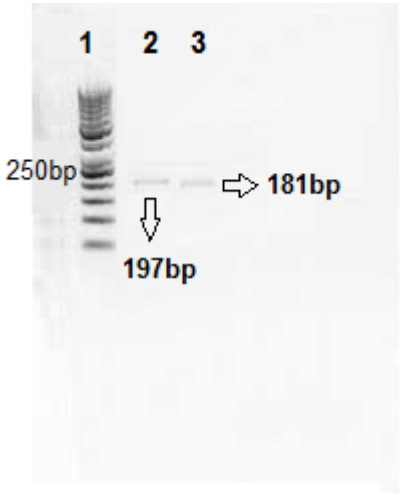
5-5 نتائج تفاعل PCR للمنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 2% لناتج التضخيم السلسلي للبوليمراز للجزء المدروس من جين 18S عصابة بطول 197bp و لم يتم تضخيم أي جينة أخرى و بالتالي فإن زوج المشارع المصمم نوعي للجزء المدروس من جين 18S كما في الشكل (32).

الشكل (32) رحلان ناتج تضخيم المنطقة المنسلة من جين 18S. يمثل البئر 1 رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50bp ، وتمثل الآبار 2 و 3 و 4 عصابات المنطقة المنسلة من جين 18S بطول 197 bp

6-5 نتائج تفاعل PCR للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة conserved region

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 2% لناتج التضخيم السلسلي للبوليمراز للجزء المدروس من جين 18S عصابة بطول 181bp و لم يتم تضخيم أي جينة أخرى و بالتالي فإن زوج المشارع المصمم نوعي للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة كما في الشكل (33)



الشكل (33) رحلان نواتج PCR لكل من المنطقة المنسلة من جين 18S و المنطقة المصانة conserved region بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50bp. حيث يمثل البئر رقم 1 واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50bp، و يمثل البئر رقم 2 عصابة المنطقة المنسلة من جين 18S بطول 197 bp، و يمثل البئر رقم 3 عصابة المنطقة المصانة conserved region بطول 181 bp

7-5 استخلاص البلاسميد PCI من جراثيم E.coli TOP 10 و قياس تركيزه و نقاوته

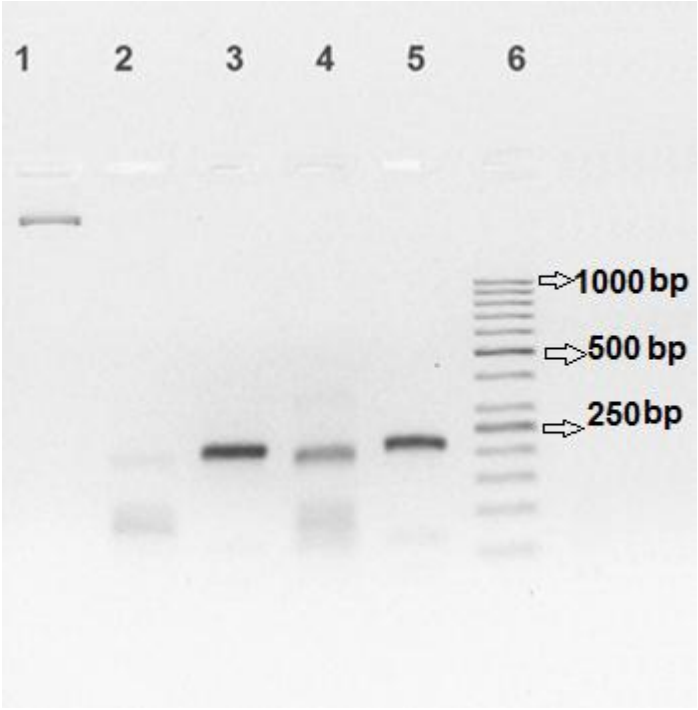
بعد إدخال البلاسميد PCI إلى داخل جراثيم E.coli TOP 10 بواسطة عملية الاستحالة Transformation و فق البروتوكول المتبع في المواد و الطرق، استخلص البلاسميد PCI من المستعمرات الجرثومية بعد زرعها على أطباق LB أغار (Roth) بواسطة عتيدة استخلاص البلاسميد من المستعمرات الجرثومية (Euro clone) و رُحّل على هلامة الأغاروز بتركيز 1% فظهرت لدينا عصابتين هما عصابة nicked في الأعلى و عصابة supercoiled في الأسفل. و هاتان العصابتان تدلان على جودة استخلاص البلاسميد وعدم تدركه كما في الشكل (34) . قيس تركيز البلاسميد المستخلص ونقاوته بواسطة مقياس الطيف الضوئي فكان تركيز البلاسميد = 244,8 نانو غرام / ميكرولتر ونقاوته مساوية لـ 1.83 .

الشكل (34) رحلان البلاسميد PCI غير المهضم بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية 100bp.
تمثل الآبار 2 و 34 و 4 و 5 رحلان البلاسميد PCI غير المهضّم . يمثل البئر 1 رحلان واسم الأطوال المعيارية 100bp ladder .

8-5 هضم البلاسميد PCI و المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S و المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة للدنا المتقدري conserved region بأنزيمات Xho I و Xba I

تم هضم كل من البلاسميد PCI و المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S والمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة للدنا المتقدري conserved region بأنزيمات Xho I في التسلسل CTCGAG ، و Xba I في التسلسل TCTAGA، وفق البروتوكول المتبع في المواد والطرق. ثم رُحّل ناتج الهضم على هلامة أغاروز بتركيز 1.5% فنتج لدينا عصابة تعبر عن المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S،وعصابة تعبرعن المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة للدنا المتقدري conserved region، وعصابة وحيدة تعبّر عن البلاسميد PCI المهضّم، والذي تحوّل بفعل عملية الهضم من الشكل الحلقي إلى الشكل الخطي. و يدل ظهور

عصابة وحيدة تدل على تحول البلاسميد إلى الشكل الخطي على فعالية الهضم، كما في الشكل (35).



الشكل (35) رحلان نواتج هضم جين 18S و جين المنطقة المصانة و البلاسميد PCI بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية 50bp. يمثل البئر 1 رحلان ناتج هضم البلاسميد PCI، و يمثل البئر 3 و 5 رحلان نواتج هضم جين 18S، ويمثل البئر 2 و 4 رحلان ناتج هضم المنطقة المصانة، و يمثل البئر 6 رحلان واسم الأطوال المعيارية ladder 50 bp.

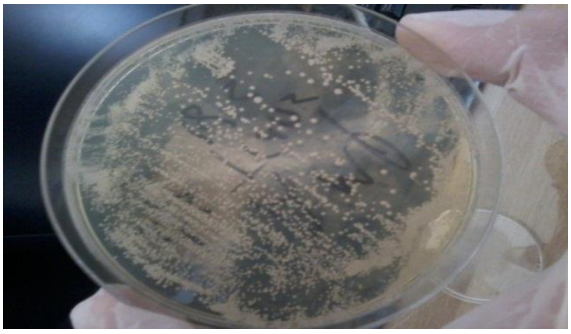
9-5 استخلاص البلاسميد PCI و المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S و المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة من هلامة الأغاروز

تم استخلاص كل من البلاسميد PCI و المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S و المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة بعد الهضم بالأنزيمات Xho I و Xba I و الترحيل على هلامة الأغاروز ذات التركيز 1.5% بواسطة عتيدة استخلاص الدنا من الهلام من شركة (Thermo scientific) حسب

البروتوكول المتبع في المواد والطرق. ثم قيس التركيز والنقاوة باستخدام مقياس الطيف الضوئي فكان كان تركيز المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين **18S** المستخلصة = 41,4 نغ / مكل و نقاوتها = 1.6 ، وكان تركيز المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة conserved region = 32,2 نغ / مكل و نقاوتها = 1.7 ، وكان تركيز البلاسميد المهضّم = 29.2 نغ / مكل ونقاوته = 1.6 .

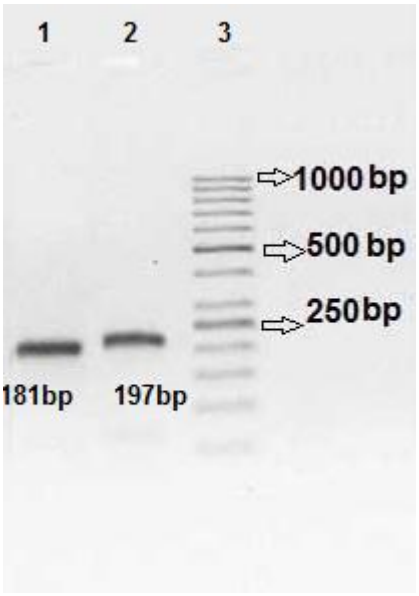
10-5 تنسيل المنطقة المدروسة من جين 18S

قمنا بتأشيب المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S والبلاسميد PCI بواسطة عتيدة T4 Ligase من شركة (Thermo scientific)، وذلك بعد أن تمت عمليات التهضيم، والترحيل على هلامة الأغاروز واختياركل من عصابة المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S، وعصابة البلاسميد المهضمين. ثم استخلاص هاتين العصابتين من هلامة الأغاروز باستخدام البروتوكول المتبع في المواد والطرق، ثم تم إدخال البلاسميد المأشوب في جراثيم *E. coli* TOP 10 المهيّئة بطريقة كلوريد الكالسيوم، وذلك باستخدام عملية الاستحالة transformation حسب البروتوكول المتبع في المواد والطرق. ثم تم التأكد من نمو المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميد المأشوب وذلك بواسطة الزرع على أطباق LB أغار التي تحتوي على الأمبيسلين، والتي تسمح فقط للمستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميد بالنمو لأن البلاسميد يحتوي على جينة مقاومة للأمبيسلين، وبالتالي يسمح بنمو المستعمرة على الأغار الحاوي على الصاد الحيوي، كما في الشكل (36).



الشكل (36) نمو مستعمرات جراثيم الإشريكية الكولونية Top 10الحاوية على البلاسميد المأشوب على وسط LB أغار يحتوي على الأمبيسلين

بعد ذلك تم استخلاص البلاسميد المأشوب من المستعمرات الجرثومية بعد تكثيرها على وسط مرق LB، ثم الاستخلاص بواسطة عتيدة لاستخلاص الدنا من المستعمرات الجرثومية لشركة (Euro clone). قيس تركيز البلاسميد المأشوب بواسطة مقياس الطيف الضوئي و كان تركيزه = 120نانوغرام / مكرولتر، وبلغت نقاوته 1.6 . أجري تفاعل PCR للمنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ضمن البلاسميد PCI باستخدام عتيدة PCR من شركة Thermo scientific، ومشارع تضخيم الجين المستخدمة سابقاً. رُحّل ناتج PCR على هلامة الأغاروز ذات التركيز 2% فظهرت لدينا عصابة وحيدة بطول 197bp تدل على وجود المنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 من جين 18S ضمن البلاسميد كما في الشكل (37).



الشكل (37) رحلان ناتج تضخيم كل من جين المنطقة المصانة و المنطقة المنسلة من جين 18S بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية 50bp. يمثل البئر 1 رحلان ناتج تضخيم جين المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة ضمن البلاسميد المأشوب حيث تظهر لدينا عصابة الجين بطول 181bp، ويمثل البئر 2 رحلان ناتج تضخيم المنطقة المنسلة من جين 18S ضمن البلاسميد المأشوب حيث تظهر عصابة الجين بطول 197bp، ويمثل البئر 3 رحلان واسم الأطوال المعيارية 50bp

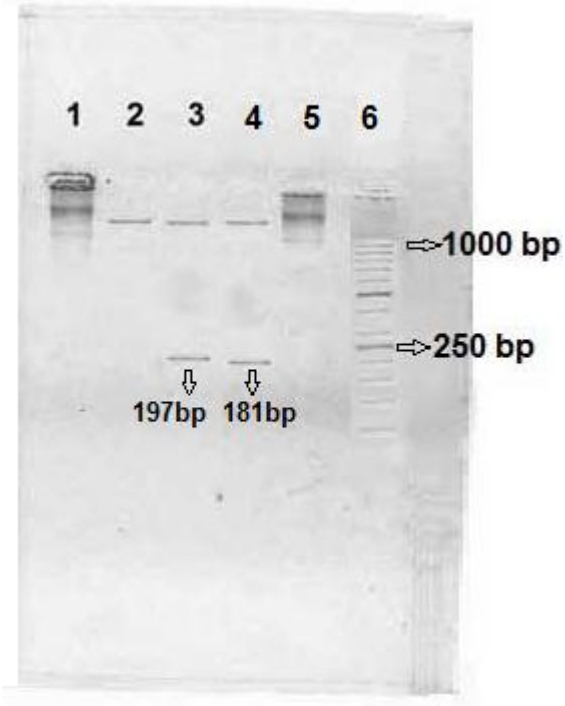
11-5 تنسيل المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة

قمنا بتأشيب المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة والبلاسميد PCIالمهضّم بواسطة عتيدة T4 Ligase لشركة (Thermo scientific)، ثم تم الترحيل على هلامة الأغاروز، واختياركل من عصابة المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة ، والبلاسميد المهضّمين واستخلاصهما من هلامة الأغاروز باستخدام البروتوكول المتبع في المواد والطرق. ثم تم إدخال البلاسميد المأشوب في جراثيم *E. coli* TOP 10 المهيّئة بطريقة كلوريد الكالسيوم، وذلك باستخدام عملية الاستحالة transformation حسب البروتوكول المتبع في المواد والطرق. ثم تم زرع الجراثيم الحاوية على البلاسميد المأشوب،على أطباق LB أغار حاوية على الأمبيسلين تسمح فقط للجراثيم الحاوية على البلاسميد بالنمو،لأن البلاسميد يحتوي على جينة مقاومة للأمبيسلين. ثم تم استخلاص البلاسميد المأشوب من المستعمرات الجرثومية التي نمت على الطبق السابق بعد تكثيرها على وسط مرق LB، بواسطة عتيدة استخلاص الدنا من المستعمرات الجرثومية لشركة (Euro clone, Italy). تم قياس تركيز البلاسيد المأشوب المستخلص بواسطة مقياس الطيف الضوئي و كان تركيزه = 139نانوغرام/ مكرولتر، وبلغت نقاوته 1.7 . أجري تفاعل PCR لجين المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة ضمن البلاسميد PCI،للتأكد من وجوده و بالتالي ضمان التأكد من صحة خطوات تنسيل الجين المتبعة. تم ذلك باستخدام عتيدة PCR لشركة Thermo scientific، و رُحّل ناتج PCR على هلامة الأغاروز ذات التركيز 2%، فظهرت لدينا عصابة وحيدة بطول 181bp تدل على وجود المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة ضمن البلاسميد كما في الشكل (37).

12-5 هضم البلاسميد المأشوب المرمز جين 18S و البلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة:

تم هضم كل من البلاسميد المأشوب الحاوي على جين 18S، والبلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة بأنزيمي Xho I و Xba I ، فنتج لدينا عصابتين إحداهما تمثل البلاسميد المهضّم، وتقع في المنطقة العليا

من بئر الرحلان. أما العصابة الأخرى تعبّر عن الجين المنسل، وتقع أسفل عصابة البلاسميد المهضّم كما في الشكل (38).



الشكل (38) رحلان البلاسميد المأشوب الحاوي على جين 18S و البلاسميد المأشوب الحاوي على جين المنطقة المصانة بالشكلين المهضّم و غير المهضّم بالمقارنة مع واسم الأطوال المعيارية 50bp. يمثل البئر 1 رحلان البلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المنسلة من جين 18S، ويمثل البئر 5 البلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المصانة، ويمثل البئر 2 رحلان البلاسميد المهضم وغير المأشوب، ويمثل البئر 3 رحلان البلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المنسلة من 18S والمهضّم بالأنزيمين Xho I و Xba I، ويمثل البئر 4 رحلان البلاسميد المأشوب الحاوي على المنطقة المصانة والمهضّم بالأنزيمين Xho I و Xba I، ويمثل البئر 6 يمثل واسم الأطوال المعيارية 50bp

13-5 تقييم فعالية تمنيع البلاسميد المأشوب الحاوي على جين 18S عند الفئران

تم تقييم فعالية التمنيع بالبلاسميد المأشوب بجين 18S عند الفئران و ذلك بمتابعة التغيرات في حجم الآفة لكل فأر ومقايسة السيتوكينات IFNγ و IL-12 وIL-4 بواسطة عتيدة مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ذو الشطيرة ELISA Sandwich.

14-5 متابعة التغيرات في حجم الآفة

تم قياس الفرق في الثخانة بين قدمي كل فأر من فئران مجموعات الدراسة بواسطة المسماك caliper، بدءاً من الأسبوع الذي قمنا فيه باختبار التحدي، ثم تم تكرار هذا القياس بعد أسبوعين، وبعد 4 أسابيع، وبعد 6 أسابيع من إجراء الاختبار. يبين الجدول التالي تطور فرق الثخانة بين قدمي كل فأر من فئران المجموعة الشاهدة.

الجدول (12) تطور فرق الثخانة بين قدمي كل فأر من فئران المجموعة المحقونة بـ PBS

فئران المجموعة الشاهدة	قبل اختبار التحدي	بعد أسبوعين من اختبار التحدي	بعد 4 أسابيع من اختبار التحدي	بعد 6 أسابيع من اختبار التحدي
الفأر1	0	0.3	0.95	1
الفأر2	0	0.35	0.95	0.93
الفأر3	0	0.3	0.9	1
الفأر4	0	0.3	1	1.2
الفأر5	0	0.35	1	0.93
الفأر6	0	0.25	0.95	1
الوسطي	0	0.30±0.03	0.95±0.03	1.01±0.09
P value	0.0000005		0.000000000001	0.275

أدّى اختبار التحدي إلى زيادة الفرق في الثخانة بين قدمي فئران المجموعة الشاهدة حيث كان 0.3 بعد أسبوعين من اختبار التحدي، و0.95 بعد أربعة أسابيع، و1.5 بعد ستة أسابيع من اختبار التحدي.

يبين الجدول التالي تطور الفرق في الثخانة بين قدمي فئران مجموعة البلاسميد.

الجدول (13) تطور الفرق في الثخانة بين قدمي فئران مجموعة البلاسميد

فئران مجموعة البلاسميد	قبل اختبار التحدي	بعد أسبوعين من اختبار التحدي	بعد 4 أسابيع من اختبار التحدي	بعد 6 أسابيع من اختبار التحدي
الفأر1	0	0.35	0.9	1
الفأر2	0	0.35	0.95	0.9
الفأر3	0	0.25	0.8	1
الفأر4	0	0.3	1	1
الفأر5	0	0.3	0.9	0.95
الفأر6	0	0.25	0.9	1
الوسطي	0	0.3±0.04	0.91±0.06	0.975±0.041
P value	0.000001		0.000000002	0.069

أدّى اختبار التحدي إلى زيادة الفرق في الثخانة بين قدمي فئران المجموعة المحقونة بالبلاسميد حيث كان 0.3 بعد أسبوعين من اختبار التحدي، و0.91 بعد أربعة أسابيع، و0.975 بعد ستة أسابيع من اختبار التحدي.

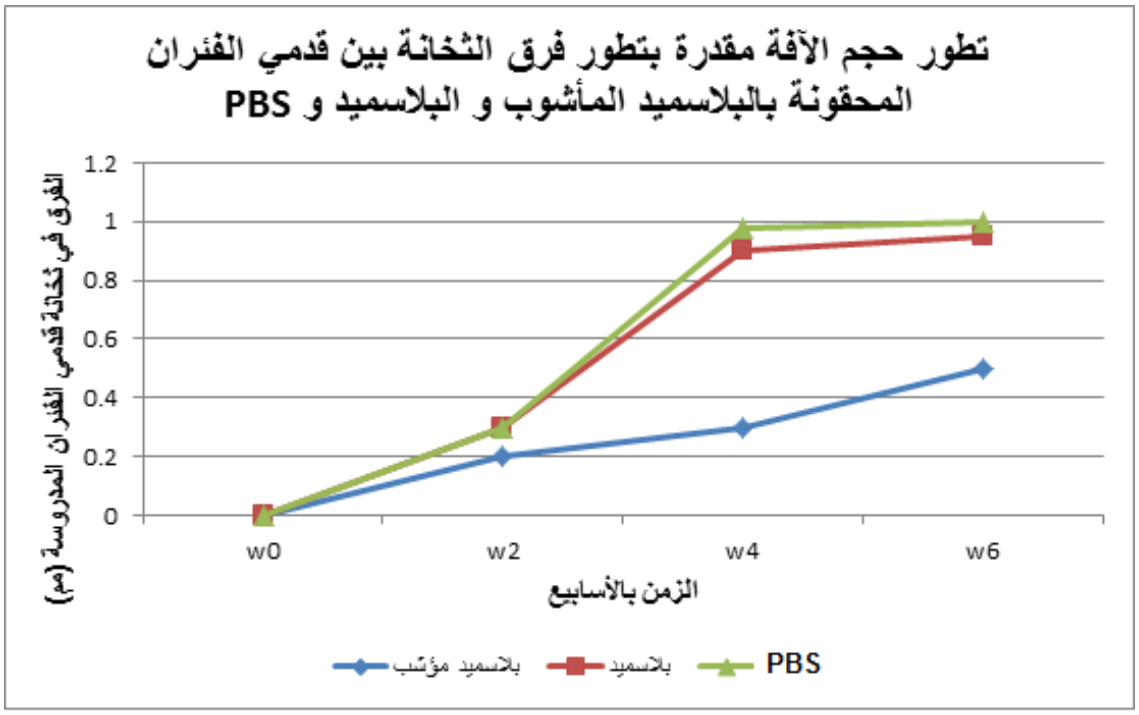
يبين الجدول التالي تطور الفرق في الثخانة بين قدمي فئران مجموعة البلاسميد المأشوب.

الجدول (14) تطور الفرق في الثخانة بين قدمي فئران مجموعة البلاسميد المأشوب.

فئران مجموعة البلاسميد	قبل اختبار التحدي	بعد أسبوعين من اختبار التحدي	بعد 4 أسابيع من اختبار التحدي	بعد 6 أسابيع من اختبار التحدي
الفأر1	0	0.2	0.3	0.5
الفأر2	0	0.25	0.35	0.5
الفأر3	0	0.2	0.3	0.8
الفأر4	0	0.15	0.3	0.7
الفأر5	0	0.2	0.35	0.5
الفأر6	0	0.2	0.2	0.5
الوسطي	0	0.2±0.031	0.3±0.05	0.58±0.13
P value	0.000002		0.0047	0.0021

أدّى اختبار التحدي إلى زيادة الفرق في الثخانة بين قدمي فئران المجموعة المحقونة بالبلاسميد المأشوب حيث كان 0.2 بعد أسبوعين من اختبار التحدي، و0.3 بعد أربعة أسابيع، و0.58 بعد ستة أسابيع من اختبار التحدي.

كان ارتفاع حجم الآفة بين فئران المجموعة الشاهدة و فئران مجموعة البلاسميد المأشوب ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P 0.0003 في الأسبوع الثاني بعد اختبار التحدي و 0.0000000002 في الأسبوع الرابع و 0.0000002 في الأسبوع السادس بعد اختبار التحدي. كذلك كان ارتفاع حجم الآفة بين فئران مجموعة البلاسميد المأشوب ومجموعة البلاسميد ذو دلالة إحصائية حيث بلغت قيمة P 0.0015 في الأسبوع الثاني، و 0.000000001 في الأسبوع الرابع، و0.0004 في الأسبوع السادس بعد اختبار التحدي. بينما كان ارتفاع حجم الآفة بين فئران مجموعتي البلاسميد والشاهد لا يعتد به إحصائياً على مدى أسابيع القياس حيث بلغت قيمة P 0.73 في الأسبوع الثاني و 0.14 في الأسبوع الرابع و0.45 في الأسبوع السادس بعد اختبار التحدي.



الشكل (39) تطور حجم الآفة مقدراً بتطور الفرق في الثخانة بين قدمي الفئران لمجموعات الدراسة (PBS، البلاسميد، البسميد المأشوب) قبل اختبار التحدي و بعد اختبار التحدي بأسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع.

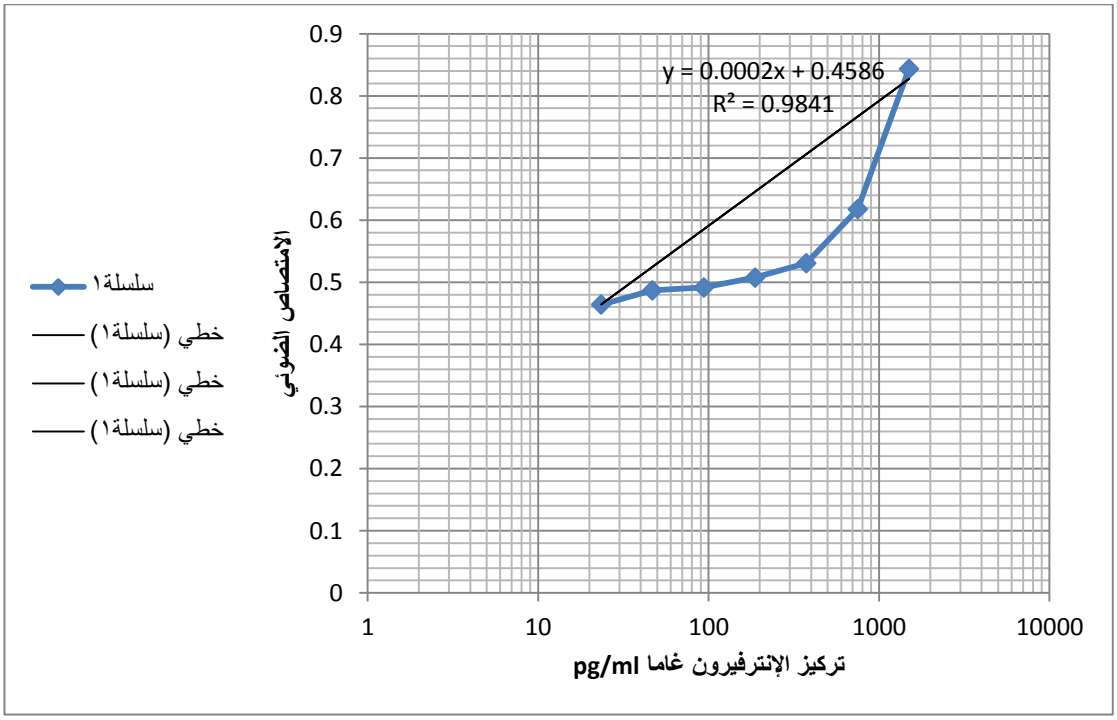
15-5 دراسة رد الفعل المناعي لدى الفئران Balb c بعد التمنيع بالبلاسميد المؤشب

قمنا بمقايسة السيتوكينات: الإنترفيرون غاما و الإنترلوكين 12 و الإنترلوكين 4 في مصول الفئران من المجموعات الشاهدة و المحقونة بالبلاسميد و المحقونة باللقاح و ذلك بعد أسبوعين من الجرعة الداعمة للقاح و بعد أسبوعين و أربع أسابيع و ستة أسابيع من إجراء اختبار التحدي و ذلك لتقييم رد الفعل الخلوي تجاه اللقاح.

1-15-5 نتائج مقايسة الإنترفيرون غاما

قمنا بمقايسة الإنترفيرون غاما في مصول جميع الفئران و مقارنة متوسطات مستوياته بين مجموعات الدراسة و ذلك بقصد دراسة قدرة اللقاح على تحفيز استجابة مناعية

خلوية من نمط Th1. تم إجراء مقايستين لكل عينة مصل مأخوذة من كل فأر و تم حساب وسطي المقايستين لكل فأر و من ثم حساب تركيز الإنترفيرون غاما IFNγ من خلال الخط البياني الذي يربط بين قيم الامتصاص الضوئي للسلسلة العيارية التي قمنا بتحضيرها بدءاً من العياري المرفق بعتيدة مقايسة الإنترفيرون غاما IFNγ.



الشكل (40) الخط البياني المرسوم بالاعتماد على تراكيز السلسلة العيارية لعتيدة الإنترفيرون غاما

أ- نتائج تراكيز الإنترفيرون غاما لدى الفئران قبل التحدي

قيست تراكيز الإنترفيرون غاما لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أسبوعين من إعطاء الجرعة الداعمة من اللقاح و كان متوسط تركيز IFNγ لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 24.7 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة باللقاح 37.89 pg/ml و لدى

الفئران المحقونة بالبلاسميد 24.98 pg/ml. يلخص الجدول التالي نتائج المقايسة بعد الجرعة الداعمة من البلاسميد المأشوب.

الجدول(15) قيم المتوسط الحسابي للإنترفيرون غاما و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي

التركيز pg/ml	بلاسميد مأشوب	بلاسميد	PBS
الفأر 1	38.5	25.7	26.9
الفأر 2	37.5	24.1	22.71
الفأر 3	38.6	23.3	22.71
الفأر 4	36.3	27.2	26.5
الفأر 5	38	26.1	24.6
الفأر 6	39	23.5	23
المتوسط	37.98	24.98	24.70
الانحراف المعياري	0.97	1.58	1.73
P value	0.0000000008		0.03

هذا و تشير نتائجنا إلى أن تراكيز الإنترفيرون غاما عند الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى منها عند مجموعة الفئران المحقونة بـ PBS، وبفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.00000002 وكانت نتائج الإنترفيرون غاما عند الفئران المحقونة بالبلاسميد أعلى منها في الفئران الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.03 و كانت قيمة النتائج عند الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من قيمتها عند الفئران المحقونة بالبلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000000008 .

ب- نتائج تركيز الإنترفيرون غاما لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترفيرون غاما لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي لدى الفئران و كان متوسط تركيز IFNγ لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 27.91 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة باللقاح 42.18 pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 28.45 pg/ml. و قد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة باللقاح أعلى من تركيزه لدى فئران المجموعة الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000000009 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أعلى من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.004 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة باللقاح أعلى من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000000008.

ج- نتائج تركيز الإنترفيرون غاما لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد أربعة أسابيع من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترفيرون غاما لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أربعة أسابيع من إجراء اختبار التحدي لدى الفئران و كان متوسط تركيز IFNγ لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 32.48 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب 73.63 pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 37.51 pg/ml. و قد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة باللقاح أعلى من تركيزه لدى فئران المجموعة الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.00000000008 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أعلى من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.001 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة باللقاح أعلى من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000000001.

د- نتائج تركيز الإنترفيرون غاما لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد ستة أسابيع من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترفيرون غاما لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد ستة أسابيع من إجراء اختبار التحدي لدى الفئران و كان متوسط تركيز IFNγ لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 27.28 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب 43.53 pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 31.16 pg/ml . و قد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من تركيزه لدى فئران المجموعة المحقونة بـ PBS بفارق يعتد به إحصائياً، حيث بلغت قيمة p 0.00000002 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أعلى من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة، و بفارق يعتد به إحصائياً، حيث بلغت قيمة p 0.007 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد، وبفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000000008.

يلخص الجدول التالي نتائج مقايسة الإنترفيرون غاما عند مجموعات الفئران المدروسة بعد اختبار التحدي بأسبوعين و أربع أسابيع و ستة أسابيع.

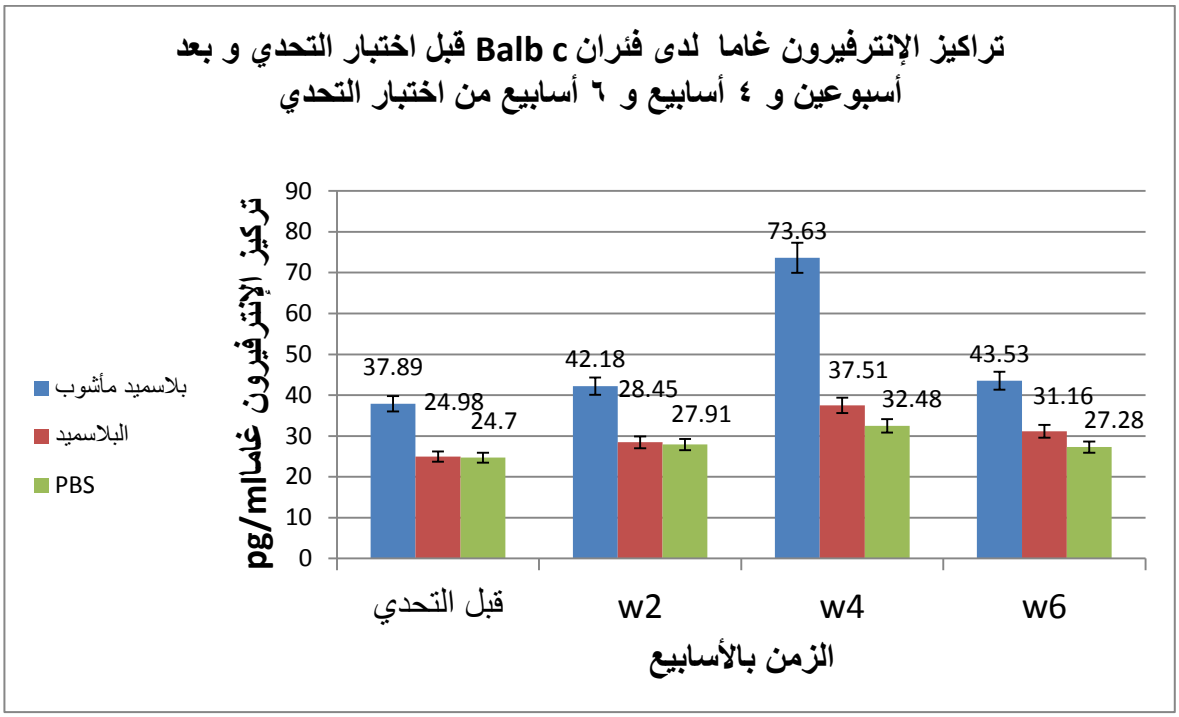
الجدول (16) قيم المتوسط الحسابي للإنترفيرون غاما و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة بعد أسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع من اختبار التحدي

	بعد أسبوعين من اختبار التحدي			بعد أربعة أسابيع من اختبار التحدي			بعد ستة أسابيع من اختبار التحدي		
	بلاسميد مأشوب	**بلاسميد**	**PBS**	**بلاسميد مأشوب**	**بلاسميد**	**PBS**	**بلاسميد مأشوب**	**بلاسميد**	**PBS**
الفأر 1	41	27.1	27.6	70.6	35.4	30.5	41.6	29.3	27.5
الفأر 2	40.5	29.5	27.1	70.1	38.7	33.8	44	29.5	27.1
الفأر 3	44	28.6	28.2	74.5	40.9	34.9	45.5	30.5	23.1

الفأر 4	43.6	28.3	28.7	72.4	36.1	31.4	42.3	33.1	28.9
الفأر 5	42.2	27.9	29.4	76.2	35.8	30.7	44.6	31.9	29.5
الفأر 6	41.8	29.3	26.5	77.5	38.2	33.6	43.2	32.7	27.6
المتوسط الحسابي	42.18	28.45	27.91	73.63	37.51	32.48	43.53	31.16	27.28
SD	0.97	1.27	0.81	1.84	2.90	2.13	2.24	1.45	1.63

حيث لاحظنا أن تركيز الإنترفيرون غاما في الأسبوع الرابع كان الأكثر ارتفاعاً فقد ارتفع بـمقدار 2.26 مرة عن تركيز الشاهد و بمقدار 1.96 عن تركيز البلاسميد في نفس الأسبوع و بمقدار 1.9 مرة عن تركيز الإنترفيرون غاما قبل إجراء اختبار التحدي.

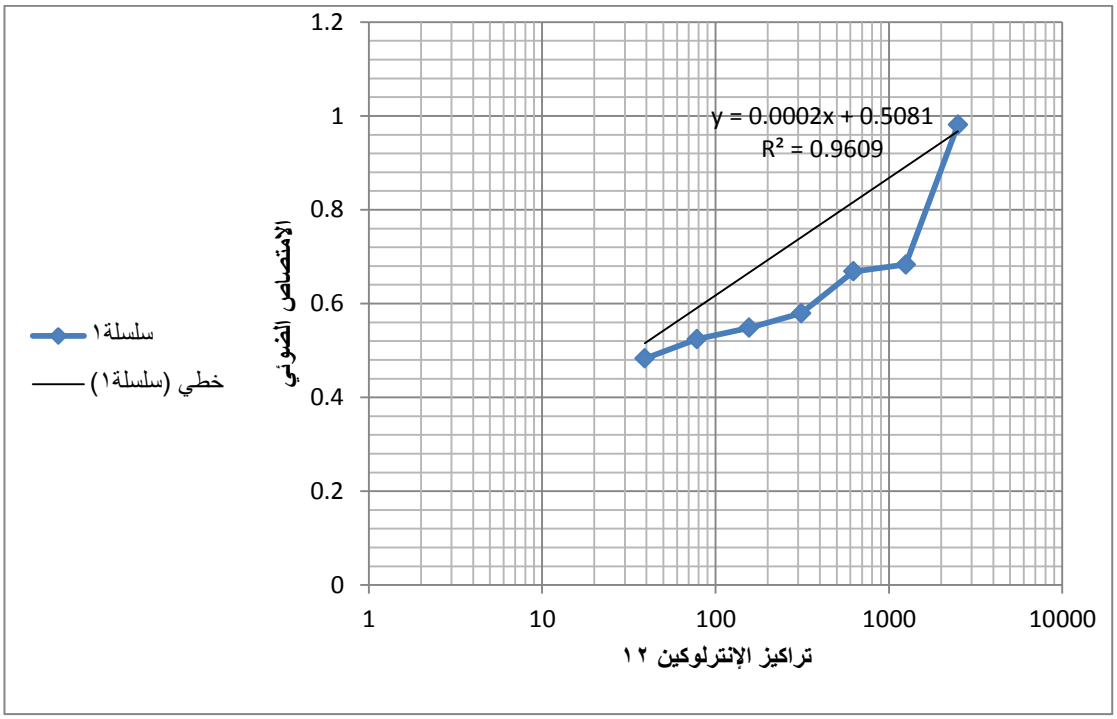
يلخص الشكل التالي متوسطات تراكيز الإنترفيرون غاما لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي و بعد اختبار التحدي بأسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع.



الشكل (41) تراكيز الإنترفيرون غاما لدى فئران Balb c قبل اختبار التحدي و بعد أسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع من اختبار التحدي

2-15-5 نتائج مقايسة الإنترلوكين 12

قمنا بمقايسة الإنترلوكين 12 في مصول جميع الفئران و مقارنة متوسطات مستوياته بين مجموعات الدراسة و ذلك بقصد دراسة قدرة اللقاح على تحفيز استجابة مناعية خلوية من نمط Th1. تم إجراء مقايستين لكل عينة مصل مأخوذة من كل فأر و تم حساب وسطي المقايستين و من ثم حساب تركيز الإنترلوكين 12 (IL12) من خلال الخط البياني الذي يربط بين قيم الامتصاص الضوئي للسلسلة العيارية التي قمنا بتحضيرها بدءاً من العياري المرفق بعتيدة مقايسة الإنترلوكين 12 (IL12).



الشكل (42) الخط البياني المرسوم بالاعتماد على تراكيز السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلوكين 12

أ- نتائج تراكيز الإنترلوكين 12 لدى الفئران قبل إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 12 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أسبوعين من إعطاء الجرعة الداعمة من اللقاح و كان متوسط تركيز IL12 لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 40.38 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة باللقاح 60.2 pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 42.36 pg/ml. يلخص الجدول التالي نتائج المقايسة بعد الجرعة الداعمة من اللقاح.

الجدول (17) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 12 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي

التركيز pg/ml	بلاسميد مأشوب	بلاسميد	PBS
الفأر 1	60.3	43.2	39.5
الفأر 2	58.6	41.7	40.6
الفأر 3	59.7	42.8	41.7
الفأر 4	60.1	44.1	40.4
الفأر 5	61.7	41.9	39.3
الفأر 6	60.8	40.5	40.8
المتوسط	60.2	42.36	40.38
الانحراف المعياري	1.04	1.26	0.88
P value	0.001		0.00000000002

هذا و تشير نتائجنا إلى أن تراكيز الإنترلوكين 12 عند الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى منها عند مجموعة الفئران الشاهدة، وبفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000000000001 و كانت نتائج الإنترلوكين 12 عند الفئران المحقونة بالبلاسميد أعلى منها في الفئران المحقونة بـPBS بفارق يعتد به إحصائياً، حيث بلغت قيمة p 0.01 و كانت قيمة النتائج عند الفئران المحقونة باللقاح أعلى من قيمتها عند الفئران المحقونة بالبلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.00000000002 .

ب- نتائج تركيز الإنترلوكين 12 لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 12 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أسبوعين من إعطاء الجرعة الداعمة من البلاسميد المأشوب.وكان متوسط تركيز IL12 لدى المجموعة المحقونة بالـPBS مساوياً لـ 42.33 pg/ml. أما لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب 75.9 pg/ml .ولدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 45.33 pg/ml. وقد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من تركيزه لدى فئران المجموعة الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.00000001 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أعلى من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.04 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة باللقاح أعلى من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000000001.

ج- نتائج تركيز الإنترلوكين 12 لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد أربعة أسابيع من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 12 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد ستة أسابيع من إعطاء الجرعة الداعمة من البلاسميد المأشوب. وكان متوسط تركيز IL12 لدى المجموعة المحقونة بالـ PBS مساوياً لـ 45.46 pg/ml. أما لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب 91.11 pg/ml، ولدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 62.63 pg/ml. وقد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من تركيزه لدى فئران المجموعة المحقونة بالـ PBS بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000000000001 ، وتركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أعلى من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000001 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من

تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد، وبفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000000001.

د- نتائج تركيز الإنترلوكين 12 لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد ستة أسابيع من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 12 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد ستة أسابيع من إعطاء الجرعة الداعمة من البلاسميد المأشوب. وكان متوسط تركيز IL12 لدى المجموعة المحقونة بالـPBS مساوياً لـ 43.3 pg/ml. أما لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب 72.45 pg/ml. ولدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 53.82 pg/ml و قد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من تركيزه لدى فئران المجموعة المحقونة بالPBS بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000000000003 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أعلى من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة، وبفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000001 وتركيزه في مصول المجموعة المحقونة بالبلاسميد المأشوب أعلى من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد، وبفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000001.

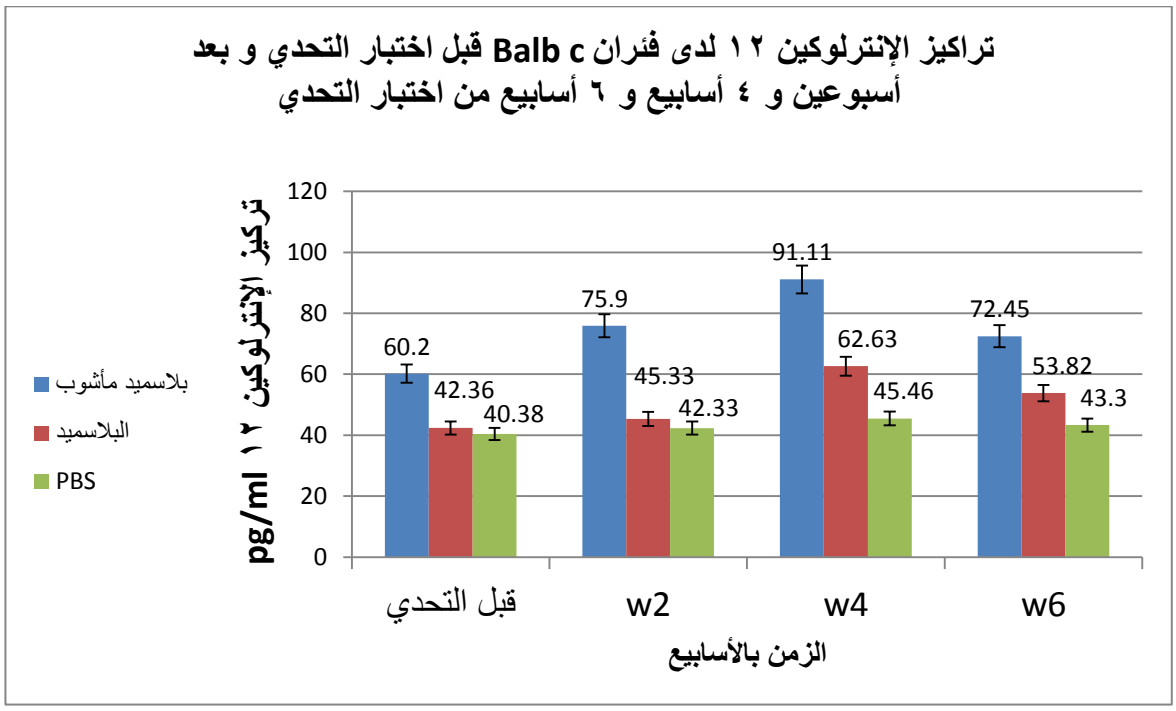
يلخص الجدول التالي نتائج مقايسة الإنترلكين 12 عند مجموعات الفئران المدروسة بعد اختبار التحدي بأسبوعين و أربع أسابيع و ستة أسابيع.

الجدول (18) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 12 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة بعد أسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع من اختبار التحدي

	بعد أسبوعين من اختبار التحدي			بعد أربعة أسابيع من اختبار التحدي			بعد ستة أسابيع من اختبار التحدي		
	بلاسميد مأشوب	**بلاسميد**	**PBS**	**بلاسميد مأشوب**	**بلاسميد**	**PBS**	**بلاسميد مأشوب**	**بلاسميد**	**PBS**
الفأر 1	75.5	45.1	44.1	90.7	60.4	45.5	70.2	55.6	43.1
الفأر 2	72.4	44.2	40.6	94.6	60.9	46.8	72.6	52.1	43.9
الفأر 3	77.8	40.7	42.2	91.4	63.2	46.1	73.4	50.7	44.6
الفأر 4	79.6	47.3	42.7	89.3	67.1	45.8	74.8	50.9	42.8
الفأر 5	78.4	46.9	41.3	89.5	62.7	44.5	71.4	56.3	45.1
الفأر 6	71.7	47.8	43.1	91.2	61.5	44.1	72.3	54.1	40.3
المتوسط الحسابي	75.9	45.33	42.33	91.11	62.63	45.46	72.45	53.28	43.3
SD	3.27	2.65	0.81	1.84	2.90	2.13	*1.58*	1.45	1.63

لاحظنا أن تركيز الإنترلوكين 12 كان الأعلى في الأسبوع الرابع و ارتفع بمقدار مرتين عن تركيزه لدى الشاهد و بمقدار 1.45 عن تركيزه لدى المجموعة المحقونة بالبلاسميد في نفس الأسبوع، كما نلاحظ ارتفاع تركيزه بعد إجراء اختبار التحدي عن مرحلة قبل إجراء اختبار التحدي .

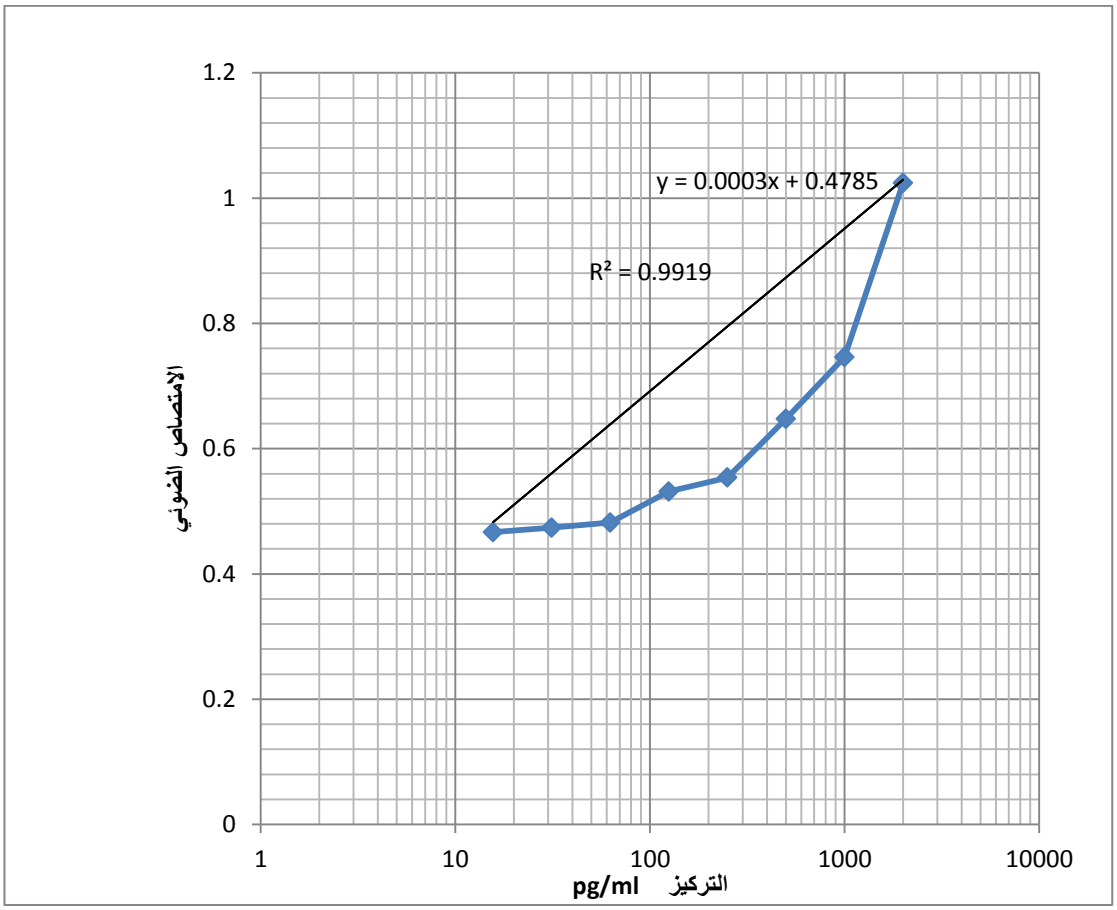
يلخص الشكل التالي متوسطات تراكيز الإنترلوكين 12 لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي و بعد اختبار التحدي بأسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع.



الشكل (43) تراكيز الإنترلوكين 12 لدى فئران Balb c قبل اختبار التحدي و بعد أسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع من اختبار التحدي

3-15-5 نتائج مقايسة الإنترلوكين 4 (IL4)

قمنا بمقايسة الإنترلوكين4 في مصول جميع الفئران و مقارنة متوسطات مستوياته بين مجموعات الدراسة و ذلك بقصد دراسة قدرة اللقاح على تحفيز استجابة مناعية خلوية من نمط Th1. تم إجراء مقايستين لكل عينة مصل مأخوذة من كل فأر و تم حساب وسطي المقايستين و من ثم حساب تركيز الإنترلوكين 4 (IL4) من خلال الخط البياني الذي يربط بين قيم الامتصاص الضوئي للسلسلة العيارية التي قمنا بتحضيرها بدءاً من العياري المرفق بعتيدة مقايسة الإنترلوكين 4 (IL4).



الشكل (44) الخط البياني المرسوم بالاعتماد على تراكيز السلسلة العيارية لعتيدة الإنترلوكين 4

أ- نتائج تراكيز الإنترلوكين 4 لدى الفئران قبل إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 4 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أسبوعين من إعطاء الجرعة الداعمة من اللقاح و كان متوسط تركيز IL4 لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 28.96 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة باللقاح 18.21pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 22.8 pg/ml. يلخص الجدول التالي نتائج المقايسة بعد الجرعة الداعمة من البلاسميد المأشوب.

الجدول (19) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 4 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي

التركيز pg/ml	بلاسميد مأشوب	بلاسميد	PBS
الفأر 1	18.4	21.7	29.4
الفأر **2**	16.7	22.6	28.4
الفأر 3	16.9	20.5	29.6
الفأر 4	17.5	24.1	27.8
الفأر 5	20.5	25.5	30.1
الفأر 6	19.3	22.4	28.5
المتوسط	18.21±1.48	22.8±1.77	28.96±0.86

هذا و تشير نتائجنا إلى أن تراكيز الإنترلوكين 4 عند الفئران المحقونة باللقاح أخفض منها عند مجموعة الفئران الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.00000007 و كانت نتائج الإنترلوكين 12 عند الفئران المحقونة بالبلاسميد أخفض منها في الفئران الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000009 و كانت قيمة النتائج عند الفئران المحقونة باللقاح أخفض من قيمتها عند الفئران المحقونة بالبلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0007 .

ب- نتائج تركيز الإنترلوكين 4 لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 4 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أسبوعين من إعطاء الجرعة الداعمة من اللقاح و كان متوسط تركيز IL4 لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 30.43 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة باللقاح 18.06 pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 22.1 pg/ml. و قد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة باللقاح أخفض من تركيزه لدى فئران المجموعة الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.00000002 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أخفض من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000002 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة باللقاح أخفض من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0001.

ج- نتائج تركيز الإنترلوكين 4 لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد أربعة أسابيع من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 4 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد أربعة أسابيع من إعطاء الجرعة الداعمة من اللقاح و كان متوسط تركيز IL4 لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 34.28 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة باللقاح 21.6 pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 25 pg/ml و قد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة باللقاح أخفض من تركيزه لدى فئران المجموعة الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000003 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أخفض من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.00000007 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة باللقاح أخفض من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.01.

د- نتائج تركيز الإنترلوكين 4 لدى مصول فئران مجموعات الدراسة بعد ستة أسابيع من إجراء اختبار التحدي

قيست تراكيز الإنترلوكين 4 لدى مجموعات الفئران المدروسة بعد ستة أسابيع من إعطاء الجرعة الداعمة من اللقاح و كان متوسط تركيز IL4 لدى المجموعة الشاهدة مساوياً لـ 31.03 pg/ml أما لدى الفئران المحقونة باللقاح 18.71pg/ml و لدى الفئران المحقونة بالبلاسميد 23.96 pg/ml و قد كان تركيزه في مصول الفئران المحقونة باللقاح أخفض من تركيزه لدى فئران المجموعة الشاهدة بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0000000009 و تركيزه في مصول فئران مجموعة البلاسميد أخفض من تركيزه في فئران المجموعة الشاهدة و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.000005 و تركيزه في مصول المجموعة المحقونة باللقاح أخفض من تركيزه لدى مصول مجموعة البلاسميد و بفارق يعتد به إحصائياً حيث بلغت قيمة p 0.0005.

يلخص الجدول التالي نتائج مقايسة الإنترلوكين 4 عند مجموعات الفئران المدروسة بعد اختبار التحدي بأسبوعين و أربع أسابيع و ستة أسابيع.

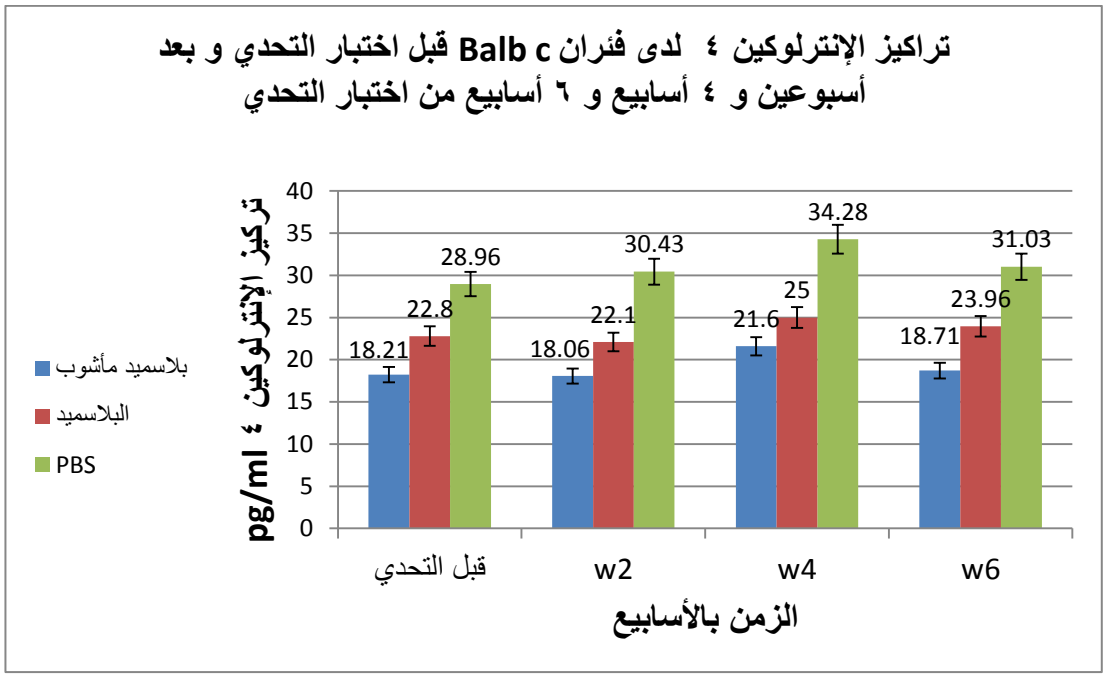
الجدول (20) قيم المتوسط الحسابي للإنترلوكين 4 و الانحراف المعياري لدى مجموعات الدراسة بعد أسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع من اختبار التحدي

	بعد أسبوعين من اختبار التحدي	بعد أربعة أسابيع من اختبار التحدي	بعد ستة أسابيع من اختبار التحدي

	بلاسميد مأشوب	بلاسميد	PBS	بلاسميد مأشوب	بلاسميد	PBS	بلاسميد مأشوب	بلاسميد	PBS
الفأر 1	16.7	23.8	28	18.1	25.7	35.1	17.6	26.7	32.7
الفأر 2	17.5	22.1	29.6	20.1	23.9	33.9	17.9	22.7	31.9
الفأر 3	18.4	20.9	32.8	21.6	24.5	34.8	18.7	23.4	30.1
الفأر 4	17.9	21.7	31.5	24.8	27.8	35.8	20.4	25.9	31.8
الفأر 5	18.4	20.7	30.6	23.6	24.8	31.9	17.9	21.4	29.4
الفأر 6	19.5	23.4	30.1	21.4	23.3	34.2	19.8	23.7	30.3
المتوسط الحسابي	18.06	22.1	30.43	21.6	25	34.28	18.71	23.96	31.03
SD	0.94	1.27	1.64	2.39	1.59	1.34	1.147	1.98	1.28

حيث لاحظنا أن متوسط تركيز الإنترلوكين 4 في كل من الأسبوعين الثاني و السادس بعد إجراء اختبار التحدي كان قريباً من متوسط تركيزه قبل إجراء اختبار التحدي في مجموعات الدراسة لكنه ارتفع في الأسبوع الرابع من بعد إجراء اختبار التحدي. لكن متوسط تركيزه عند مجموعة الفئران المحقونة باللقاح كان أخفض من تركيزه لدى المجموعتين الباقيتين في جميع مراحل الدراسة.

يلخص الشكل التالي متوسطات تراكيز الإنترلوكين 4 لدى مجموعات الدراسة قبل اختبار التحدي و بعد اختبار التحدي بأسبوعين و أربعة أسابيع و ستة أسابيع.



الشكل (46) تراكيز الإنترلوكين 4 لدى فئران Balb c قبل اختبار التحدي و بعد أسبوعين و 4 أسابيع و 6 أسابيع من اختبار التحدي

6- المناقشة Discussion

يعد داء الليشمانيات مسبباً كبيراً للإمراضية و للوفيات حول العالم. و بالتالي فإن الحصول على لقاح فعال يملك القدرة للسيطرة على هذا الداء يعد ضرورة ملحة. و بالرغم من الجهود الكبيرة المبذولة في هذا المجال و لكن حتى الآن لا يوجد لقاح مرخص متوافر (76)، باستثناء لقاحي The Leishmune الذي يحتوي على مستضد FML المجفد مع السابونين، و he Leish-Tec المؤلف من مستضد A2 مع السابونين، والمتوافرين في البرازيل لداء الليشمانيات الكلبي canine leishmaniasis (77). إن التلقيح بالدنا DNA هو استراتيجية جديدة نسبياً والتي تعد واعدة خاصة عند تطبيقها على العوامل الممرضة داخل الخلوية حيث أنها تحفز استجابة مناعية خلوية و التي تعد ضرورية للقضاء على العدوى clear infection. حيث يشكّل التمنيع ببلاسميد يرمز لمستضدات طفيليات الليشمانية أسلوباً واعداً للتلقيح ضد داء الليشمانيات كونه يحرّض كلاً من الاستجابتين المناعيتين الخلوية و الخلطية وتولد مناعة طويلة الأمد. كما يملك خواص مساعدة داخلية المنشأ (76). فالبلاسميدات المشتقة من الدنا الجرثومي هي محرض طبيعي للمناعة لأنها تحتوي على CpG motifs والتي وجد أنها تحرض التعبير عن السيتوكينات من النمط Th1، وتعزز استجابة الخلايا التائية $CD8^+$. وتعتبر هذه الخاصة ذات استخدام هام في لقاحات الليشمانية لأن هذه motifs سوف تضمن تحريض الاستجابة المناعية الخلوية التي تؤمّن الحماية ضد الطفيليات (78).

و على ضوء المميزات العديدة للقاحات الدنا والتي تتفوق على باقي استراتيجيات التلقيح الأخرى فإن لقاح الدنا يعد السبيل الأفضل لكل من العلاج والوقاية من طفيليات الليشمانية. إذ تقدم لقاحات الدنا الكثير من المميزات على باقي استراتيجيات التلقيح كما أن العديد من المظاهر جعلت منها بديلاً جاذباً، كأمانها، وبساطة، ورخص تحضيرها بكميات كبيرة، وثباتها في الحرارة مما يسهل نقلها وحفظها. كما أنها أرخص نظراً لعدم الحاجة لـ cold chain distribution (فك التبريد ضمن سلسلة متدرجة من درجات الحرارة). كما أنه بالإمكان تصميم الاستجابات المناعية الناتجة عن التمنيع بلقاح الدنا

من خلال إجراء التعديلات على الناقل vector، وإدخال مورثات السيتوكينات كعوامل مساعدة (76).

أشارت معظم الدراسات إلى أن نتيجة العدوى بطفيليات الليشمانية تعتمد على تنظيم التوازن بين الخلايا التائية الفعالة من النمط Th1 و Th2. وبالتالي فإن تفعيل كل من الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ والخلايا التائية السامة $CD8^+$ ضروري لتأمين الحماية اللازمة (79).

تعتمد الاستجابة المناعية ضد طفيليات الليشمانية بشكل كبير على تفعيل الاستجابة المناعية الخلوية، وإفراز IFNγ و IL-12 المشتق من الخلايا التغصنية، والتي تلعب دوراً جوهرياً في هذه العملية (78).

تقسم الخلايا التائية إلى تحت مجموعتين و ذلك بناء على السيتوكينات المنتجة من خلايا Th1 و Th2. يؤدي IL-12 المنتج من الخلايا التغصنية إلى تفعيل الخلايا من النمط Th1 لتفرز كل من IFN-γ و IL-12 و TNF-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 تفعيل 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 و بالتالي تثبط قدرة البالعات على قتل الطفيليات و التخلص منها، و يؤدي تحريضها إلى تفعيل الخلايا البائية لإفراز أضداد من نمط IgM و IgE و IgG4 وIgG1. وبالتالي ترتبط الاستجابة المناعية الفعالة تجاه طفيليات الليشمانية على تفعيل خلايا من النمط Th1 مما يؤدي إلى مناعة وقائية، و يؤدي تفعيل خلايا من النمط Th2 إلى ظهور الإصابة و التظاهرات المرضية. و بالتالي يتطلب فعالية اللقاح وجوب تحديد نمط الاستجابة المناعية Th1 أو Th2 (79).

تتجه الأبحاث حالياً نحو إمكانية تصنيع لقاح شامل ضد طفيليات الليشمانية Pan-Leishmania vaccine ، وذلك من خلال معرفة المستضدات المشتركة التي يمكن أن

تكون هدفاً لهذا اللقاح. حيث أنه من المتوقع أن يكون فعالاً ضد أكثر من نوع من الطفيلي، وبالتالي سيكون خياراً مثالياً لحماية الأفراد في المناطق التي ينتشر فيها أكثر من شكل سريري لداء الليشمانيات (80). ولذلك فقد قمنا في هذا البحث بدراسة إمكانية استخدام بعض المورثات المستخدمة في تصنيف الليشمانية التي تتميز بأنها موجودة لدى جميع أنواع هذا الطفيلي، ومصانة إلى حد كبير بين هذه الأنواع، ولها أهمية كبيرة في حياة الطفيلي، كالجين المرمز للوحدة الصغيرة للرنا الريباسي 18S، والجين المرمز للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة- حيث تحتوي هذه المنطقة على منشأ التضاعف للحلقة الصغيرة في الليشمانية - كلقاح دنا، ودراسة القدرة الاستمناعية للبلاسميد المرمز لجين 18S لدى فئران BALBc.

قمنا في دراستنا بقياس تراكيز السيتوكينات IFNγ و IL-12 و IL-4 في مصول الفئران المدروسة لتحديد نمط الاستجابة المناعية التي ولّدها التمنيع بالبلاسميد المؤشب المرمز للمنطقة المحصورة بين التتاليين 1267-1463 في جين 18S، حيث أنّ IFNγ هو المسؤول عن شفاء الإصابة الجلدية و IL-12 هو المسؤول الأساسي عن تمايز الخلايا التائية الساذجة و تحولها إلى خلايا تائية فعالة من النمط Th1، وبالتالي تزويد الفئران بالمقاومة للإصابة ، وIL-4 هو المتهم الأول بتطور هذه الإصابات. كما قمنا بدراسة تطور الإصابة بعد إجراء اختبار التحدي، وترافق تطور الإصابة مع مستوى تراكيز السيتوكينات.

أظهرت نتائجنا ارتفاعاً يعتد به إحصائياً في تركيز IFNγ و IL-12 في مصول الفئران الممنعة بالبلاسميد المؤشب وذلك بالمقارنة مع المجموعة المحقونة بالـ PBS، و المجموعة المحقونة بالبلاسميد قبل إجراء اختبار التحدي وبعد إجرائه على مدى ستة أسابيع. أما بالنسبة للإنترلوكين 4 (IL-4) فقد كان تركيزه لدى مجموعة الفئران المحقونة بالبلاسميد المؤشب أقل من تركيزه لدى المجموعتين المحقونتين بالبلاسميد و بالـ PBS في جميع مراحل الدراسة و بفارق يعتد به إحصائياً.

كما أظهرت دراستنا أن استخدام المنطقة من جين 18S والمحصورة بين التتاليين 1267-1463 كبلاسميد مأشوب عند فئران BALB/C أدى إلى حماية الفئران الممنعة

به من إصابة مترقية بطفيليات الليشمانية المدارية leishmania tropica، لكن هذه الإصابة لم تكن شافية بشكل تام.

بالنسبة لمجموعة الفئران المحقونة بالبلاسميد المأشوب فقد أدى التمنيع إلى ارتفاع تركيز IFNγ قبل إجراء اختبار التحدي، وبفارق يعتد به إحصائياً بالمقارنة مع المجموعة المحقونة بـ PBS، والمجموعة المحقونة بالبلاسميد PCI. وكانت نسبة الإنترفيرون غاما إلى الإنترلوكين 4 تساوي 1.31. أما بعد الإصابة بأسبوعين فقد أصبحت هذه النسبة مساوية 2.3 ثم 3.4 و 2.3 بعد الإصابة بأربعة و ستة أسابيع على التوالي. تشير هذه النسب إلى وجود استجابة مناعية خلوية مختلطة يغلب عليها استجابة من النمط Th1.وهذا ما يفسر انخفاض تطوّر الإصابة الجلدية عند هذه المجموعة بالمقارنة مع باقي مجموعات الدراسة. أظهرت دراسة أحمد العلي 2015 (87)،قدرة دواء الدوكسوروبيسين doxorubicin على الشفاء التام للإصابة الجلدية، حيث كانت نسبة تركيز الإنترفيرون غاما في الفئران المعالجة بالدوكسوروبيسين بالمقارنة مع فئران مجموعة الشاهد مساوية 12,6. بينما كانت هذه النسبة في الفئران المعالجة بالباكليتاكسيل Baclitaxel مساوية 4,6، و بالنسبة للفئران المعالجة بالداكتينومايسين dactinomycin مساوية 1,9، حيث لم تؤد كل من النسبتين السابقتين إلى شفاء تام للإصابة الجلدية (83). أما بالنسبة لدراستنا فقد كانت نسبة تركيز الإنترفيرون غاما لدى الفئران الممنعة بالبلاسميد المأشوب بالمقارنة مع فئران المجموعة الشاهدة مساوية 1,96، وبالتالي يمكن أن يفسر عدم الشفاء التام للإصابة الجلدية بعدم قدرة الكمية التي ولدتها الاستجابة المناعية من الإنترفيرون غاما على تحريض تشكيل كمية من NO كافية لقتل الطفيلي ضمن البالعات.

مجموعة الفئران المحقونة بالبلاسميد PCI كانت نسبة الإنترفيرون غاما إلى الإنترلوكين 4 قبل إجراء اختبار التحدي 1.09 .ثم أصبحت هذه النسبة مساوية 1.28 و1.5 و 1.3 بعد الإصابة بـ 2 و 4 و 6 أسابيع على التوالي. ويعزى ذلك إلى وجود CpG motifs ضمن هيكل البلاسميد والتي تعتبر محرضاً قوياً للنظام المناعي حيث تحرض إفراز كل من الإنترفيرون غاما و IL-12 (78). و قد ترافقت هذه النتائج مع

تطور إصابة جلدية في مكان الحقن بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي ثم بدأ حجم الإصابة الجلدية بالتزايد بعد 4 و 6 أسابيع،وبفارق لا يعتد به إحصائياً بالمقارنة مع المجموعة المحقونة بـ PBS،مما يدل على عدم سيطرة الإستجابة المناعية على تكاثر الطفيليات في مكان الحقن.

مجموعة الفئران المحقونة بـ PBS كانت نسبة الأنترفيرون غاما إلى الإنترلوكين 4 قبل اختبار التحدي 0.85 لتصبح مساوية 0.91 و 0.95 و 0.87 بعد الإصابة بـ 2 و 4 و 6 أسابيع. تشير هذه النسب إلى وجود استجابة مناعية خلوية مختلطة يغلب عليها استجابة من النمط Th2 و تتوافق هذه النتيجة مع اختيار نوع الفئران BALBc و هي فئران حساسة للإصابة بداء الليشمانيات. وبالتالي يعتبر ظهور استجابة مناعية من النمط Th2 أمراً طبيعياً في هذه الحالة. وقد ترافقت هذه النتائج مع تطور إصابة جلدية في مكان الحقن بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي ثم بدأ حجم الإصابة الجلدية بالتزايد بعد 4 و 6 أسابيع وهذا يتوافق مع الاستجابة المناعية من النمط Th2 المسؤولة عن تفاقم الإصابة في الفئران BALB/C ،ويترجم ذلك من خلال زيادة التورم في القدم المحقونة بالطفيليات.

7- الاستنتاج Conclusion

حرّض البلاسميد المأشوب المرمز لجزء من جين الرنا الريباسي 18S في الليشمانية المدارية و المحصور بين التتاليين 1267 و 1463 استجابة مناعية خلوية مختلطة تميل للنمط Th1 متمثلة بزيادة إفراز الإنترفيرون غاما والإنترلوكين 12 في الفئران الممنعة به، بفارق يعتد به إحصائياً عن المجموعتين المحقونتين بالبلاسميد والـ PBS. كما أدى إلى حماية هذه الفئران من إصابة مترقية بطفيليات الليشمانية المدارية leishmania tropica، إلا أنّ هذه الإصابة لم تختف و يعود ذلك لى انخفاض النسبة Th1/Th2.

8- المقترحات و التوصيات Suggestions and Recommendations

1- دراسة أجزاء أخرى من جين الرنا الريباسي 18S كهدف لتصنيع لقاح دنا للوقاية من الإصابة بالليشمانية المدارية .

2- دراسة القدرة الاستمناعية للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة في الليشمانية المدارية.

3- إجراء تفاعل السلسلة Sequencing لكل من جين 18S و الجين المرمز للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة للدنا المتقدري لدى سلالة الليشمانية المتواجدة مركز الدراسات البيولوجية و الوبائية لطفيليات الليشمانية.

9- الملخص باللغتين العربية و الإنكليزية

الملخص باللغة العربية

تعد سورية من المناطق الموبوءة بداء الليشمانيات الجلدي. ونظراً لعدم وجود دواء نوعي آمن و فعال، تكتسب الوقاية أهمية كبيرة للحد من انتشار هذا الداء. لهذا هدفت دراستنا إلى استقصاء إمكانية استخدام الجين المرمزة للوحدة الصغيرة للرنا الريباسي 18S والجين المرمزة للمنطقة المصانة من الحلقات الصغيرة لدنا منشأ الحركة في الليشمانية المدارية كلقاح دنا، وذلك من خلال تنسيل الجين المرمز للمنطقة المصانة و الجزء من جين 18S المحصور بين التتاليين 1267 و 1463 و تحضير بلاسميد مأشوب يرمز لكل منهما و دراسة الاستجابة المناعية الناتجة عن التمنيع بالبلاسميد المأشوب المرمز للجزء المنسل من الجين 18S للرنا الريباسي، وذلك بحقنه للفئران بجرعة أولى ثم جرعة داعمة بعد أسبوعين، ومقارنتها مع الاستجابة المناعية الناتجة عن حقن الفئران بالبلاسميد و الدارئة الفوسفاتية. تمت مقايسة السيتوكينات IFNγ و-IL 12 و4-IL في مصول الفئران المدروسة بعد أسبوعين من الجرعة الداعمة، بواسطة طريقة مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ذو الشطيرة. كما تم إجراء اختبار التحدي للفئران و ذلك بحقن 5 × 10^6 طفيلي و متابعة تطور الإصابة الجلدية ومقايسة تراكيز السيتوكينات IFNγ و12-IL و4-IL بعد 2 و 4 و 6 أسابيع. كان تركيز IFNγ و IL-12 في الفئران الممنعة بالبلاسميد المأشوب المرمز للجزء المنسل من الجين 18S أعلى منها بالمقارنة مع باقي مجموعات الدراسة. كما كان تركيز IL-4 في الفئران الممنعة بالبلاسميد المأشوب المرمز للجزء المنسل من الجين 18S قبل إجراء اختبار التحدي و بعد إجرائه أقل و بفارق يعتد به إحصائياً بالمقارنة مع باقي مجموعات الدراسة، مما يدل على توليد استجابة مناعية خلوية من النمط Th1. ظهرت الإصابة الجلدية في الفئران الممنعة بعد أسبوعين من إجراء اختبار التحدي و استمرت في

التطور بعد 4 أسابيع و 6 أسابيع لكن تطورها في مجموعة الفئران الممنعة بالبلاسميد المأشوب المرمز للجزء المنسل من الجين 18S كان أقل و بفارق يعتد به إحصائياً بالمقارنة مع باقي مجموعات الدراسة، مما يدل على تحريض البلاسميد المأشوب المرمز للجزء المنسل من الجين 18S لاستجابة مناعية خلوية من النمط Th1 و حمايته للفئران الممنعة به من تطور إصابة مترقية بطفيليات الليشمانية المدارية.

العنوان المختصر: رد الفعل المناعي في الفئران الممنعة بالبلاسميد المأشوب المرمز للجزء المنسل من الجين 18S. **الكلمات المفتاح:** داء الليشمانيات الجلدي، لقاح الدنا، جين 18S، الحلقات الصغيرة، المنطقة المصانة.

الملخص باللغة الإنكليزية

Syria is considered to be one of the endemic regions in cotaneous leishmaniasis. While there are not effective and safe medications, the prevention is very important to stop dispersing the disease. Our study aimed to determine the capacity of 18S gene and conserved rigion of minicircles of leishmania tropica as a DNA vaccine. The portion of 18S gene which is between 1267 and 1463 bp and the conserved region were cloned into PCI plasmid. The cellular immunity response of 18S plasmid was studied in BALB/C mice in comparation with other BALB/C mice injected with PCI plasmid and PBS.mice were injected two doses with 2 weeks as interval. IFNγ, IL-12 and IL-4 were assayed in sera of BALB/C mice after two weeks of the second dose of 18S plasmid by ELISA sandwiche. Challenge test was performed by injecting mice groups with 10^6 L.tropica metacyclic promastigote and IFNγ, IL-12 and IL-4 was assayed and followed up at two weeks intervals for 6 weeks. IFNγ and IL-12 consentrations were higher in 18S plasmid mice than in other mice, and IL-4 consentration was less in 18S plasmid mice comparable with other groups befor and after challenge test,indicating of Th1 response induction. Two weeks after challenge test, BALB/C mice showed a skine lesion in all groups, and these lesions developed during 4 and 6 weeks after challenge test, but BALB/C injected with 18S plasmid showed less development than other groups. This is indicating induction of Th1 response and preventing mice from developing a skine lesion of leishmania tropica.

Running title: immune response of 18S plasmid in BALB/C mice.

Keywords: cotaneous leishmaniasis, dna vaccine, 18S gene, minicircle, conserved region.

10- المراجع References

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

2. Hayani, K, Dandashli, A, Weisshaar, E. Cutaneous Leishmaniasis in Syria: Clinical Features, Current Status and the Effects of War. *Acta Dermato Venereologica*. 2015; 95(1):62-66.

3. Nasir S , Al-Shaqha W, Arezki A. Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8(10): e3208

4. Ul Bari A, and Ber Rahman S, Cutaneous leishmaniasis. an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. *JPAD*. 2008; 18: 42-8

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

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. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report the WHO expert committee 1990; Thchnical report series793.

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

9. Garnier T, Croft S L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis . Current Opinion in Investigational Drug 2002;3(4):1472-1478.

10. Kedzierskl Y, Handman E. Leishmania vaccines: progress and problem.*Parasitol*. 2006 ;133: 87–112.

11. 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.

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

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

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

15. 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.

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

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

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

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

20. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model ofLeishmania 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.

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

22. 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.

23. 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.

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

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

26. 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)1priming. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1260–1265.

27. 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.

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

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

30. 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

31. 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.

32. 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.

33. 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.

34. 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.

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

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

37. 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.

38. 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.

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

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

41. 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 IFNgamma/ LPS for the production of NO:correlation with iNOS mRNA and protein expression. 2006;26:682–688.

42. 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.

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

44. Khamesipour A, Rafati S, et al. Leishmaniasis vaccine candidates for
development: A globaloverview. *Indian Med Res*. 2006;123:423-438.

45. T Taheri, S Rafati. Leishmaniasis: recombinant DNA vaccination and different approaches for vaccine development. *Clin Investig*. 2013;3(11):1023-1044.

46. 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.

47. Misra A, Dube A, Srivastava B. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. *Vaccine*; 2001;19(14): 3485-3492.

48. Giunchelli R.C, Oliveira R , et al. Immunogenicity of a killed leishmania vaccine with a saponin adjuvant in dogs.*Vaccine*. 2007; 24 : 179-187.

49. Srivastava JK, Misra A, et al. Prophylactic potential of autoclaved Leishmania donovani with BCG against experimental visceral leishmaniasis. Parasitol. 2003;127(2):107-14.

50. Mahmoodi M, Khamesipour A, et al. Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with low dose of BCG. Clin Exp Immunol 2003; 134(2): 303–308.

51. 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.

52. 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.

53. 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.

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

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

56. 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.

57. 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.

58. 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.

59. 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.

60. 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.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

64. 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.

65. 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.

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

67. 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.

68. Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, and Vengerov YY, Structure of leishmania minicircle kinetoplast DNA classes, J Clin Microbiol. 1999; 37(5): 1656– 7.

69. Sholomai J .The Structure and Replication of Kintoplast DNA .*Current Molecular Medicine.* 2004;4 (6):623-647.

70. Schonian G,Kuhls K and Mauricio I L .Molecular approaches for a better understanding of the epideiology and population genetic of leishmania. *Parasitology* .2011;138(4):405-25.

71. Lukes J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R and Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*. 2002 Aug;1(4):495-502.

72. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, and Smith D, Nested-PCR based schizodeme method for identifying leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of leishmania tropica in Pakistan, J Clin Microbiol. 1998; 36(10): 2877–88.

73. A Kolesnicove, V Yu Yurchenko, G Shoenian. A new class of leishmania tropica minicircle mitochondrial DNA. *Molek Biol.* 1997;31(3):458-462.

74. Martínez-Calvillo S, Sunkin SM, Yan S, Fox M, Stuart K and Myler PJ. Genomic organization and functional characterization of the Leishmania major Friedlin ribosomal RNA gene locus*. Mol Biochem Parasitol*. 2001 Sep3;116(2):147-57

75. S Martínez-Calvillo, JC Vizuet-de-Rueda, LE Florencio-Martínez, Manning.Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol. 2010;2010:525241*.

76. N Dunning. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *bio horizons*. 2009;2(1):73–83. Leishmaniasis. *Vaccine*. 1999;17(9-10):1185–1179.

77. CB Fernandes, JT Magalhães, C de Jesus et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnoses. Vaccine 2014;32:1287–1295

78. S Mazumder, M Maji, A Das et al. Potency, Efficacy and Durability of DNA/DNA, DNA/Protein and Protein/Protein Based Vaccination Using gp63 Against Leishmania donovani in BALB/c Mice. *PLoS ONE*. 2011;6(2): e14644.

79. S Zelenay, F Elas, J Flo. Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol*. 2003;33(5): 1382-1393

80. N Dunning. Leishmania vaccines : from leishmanization to the era of DNA technology The Immune Response to Leishmania. *Biohorizons*. 2009;2(1):73-82.

81**.** BS Lakshmi, R Wang, R Madhubala**.** Leishmania genome analysis and high-throughput immunological screening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 2014;32(30):16-22.

82. S Gurunathan, D Sacks, D Brown et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers

protective immunity to mice infected with Leishmania major. *Jem*. 1997;186(7):1137-1147.

83. A AL-Ali, J Saleh, M Maarouf. Activities of some anticancer drugs against Leishmania tropica Causing Cutaneous Leishmaniasis. J. Chem. Pharm. Res. 2015;7(4):735-739.

84. http://www.who.int/topics/vaccines/en/

85. http://ispub.com/IJTWM/7/2/8789

86. http://nptel.ac.in/courses/102103017/pdf/lecture%2035.pdf

87. http://nptel.ac.in/courses/102103017/pdf/lecture%2036.pdf

88. http://www.omicsonline.org/2155-9597/2155-9597.S1.011_052.pdf