



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

التعبير الجيني عن الهستونات H2 و H3 و H4 عند
الليشمانية المدارية

Gene Expression of Histones H2, H3, H4
in Leishmania tropica

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في

التشخيص المخبري

إعداد: مروة نذير الحبش

إشراف: أ. د. محمد معروف

٢٣

العام (١٤٣٧ هـ / ٢٠١٦ م)

الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

قرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا رقم /٨١٤/ المتخذ

بالجلسة رقم /١٠/ تاريخ ٢٨/١/٢٠١٦

اطلع مجلس البحث العلمي والدراسات العليا على قرار مجلس كلية الصيدلة رقم /١٦٩/ تاريخ ٢٠١٦/١/١٣
وبعد الرجوع إلى اللائحة التنفيذية لقانون تنظيم الجامعات الصادرة بالمرسوم /٢٥٠/ لعام ٢٠٠٦ .

قرار مجلس جامعة دمشق رقم /١٢٧٦/ ص.م تاريخ ٢٠١٤/٣/١٨ بشأن الموافقة على تسجيل رسالة الطالبة
قرار مجلس جامعة دمشق رقم /٢٩٠٥/ ص تاريخ ٢٠١٥/٧/١٢ بشأن الموافقة على تعديل عنوان رسالة الطالبة
وبنتيجة المذاكرة قرر مجلس البحث العلمي والدراسات العليا :

الموافقة على تأليف لجنة الحكم على رسالة الماجستير في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة التي أعدها الطالبة مروة
الخبش بعنوان : ((التعبير الجيني عن المستونات H2.H3.H4 عند الليشمانية المدارية)) بكلية الصيدلة من السادة
الأساتذة :

د. محمد معروف	الأستاذ في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة	كلية الصيدلة
جامعة دمشق	الاختصاص: الطفيليات والفطريات	عضواً مشرفاً
د. شادن حداد	الأستاذ المساعد في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة	كلية الصيدلة
جامعة دمشق	الاختصاص: الكيمياء الحيوية الجزيئية	عضواً
د. نزار عيسى	المدرّس في قسم علم الحياة الحيوانية	كلية العلوم
جامعة دمشق	الاختصاص: مناعة	عضواً

وذلك وفق ما هو وارد في قرار مجلس الكلية آنف الذكر،،،

ملاحظة: يرجى إرسال نسخة عن الإعلان الخاص بتحديد موعد المناقشة فور صدوره إلى مكتب نائب رئيس الجامعة لشؤون
البحث العلمي والدراسات العليا.

استغرق هذا البحث مدة عامين تقريباً لاتمامه من عام ٢٠١٤ حتى عام ٢٠١٦.

ولقد تم العمل في المخابر والمراكز والهيئات التالية:

- كلية الصيدلة
- مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانية
- هيئة التقانة الحيوية
- كلية العلوم

تاريخ مناقشة الرسالة: ٢٠١٦/٤/٦

أسماء أعضاء لجنة الحكم برئاسة الدكتور محمد معروف

الفاحص الأول الدكتورة شادن حداد

الفاحص الثاني الدكتور نزار عيسى



الإهداء

أهدي هذا العمل إلى أعلى مافي الوجود ومصدر قوتي والدي

إلى نور حياتي والدتي

إلى سندي وحببتي هدى

إلى أحبائي إخوتي

إلى وطني الغالي سورية

كلمة شكر

درب شاق هونت صعوبته مساعدة أناس أفاضل وزملاء أعزاء.....

- ❖ جزيل الشكر لعمادة كلية الصيدلة ممثلة بالأستاذ الدكتور عبد الحكيم نتوف وللنائبين للشؤون العلمية والادارية الأستاذ الدكتور مصطفى العموري والأستاذة الدكتورة جمانة الصالح لاتاحة الفرصة للقيام بهذا البحث.
- ❖ جزيل الشكر لكادر قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة ممثلاً برئيس القسم الأستاذ الدكتور مروان البحتري.
- ❖ الشكر الكبير لأستاذي الدكتور محمد معروف على كل ما بذله وقدمه من وقت وجهد ودعم لنجاحي بهذا البحث.
- ❖ الشكر الكبير للأستاذة الدكتورة شادن حداد مديرة مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانية على كل التسهيلات المقدمة لانجاز هذا البحث وتقبيمه.
- ❖ فائق الشكر والامتنان للأستاذ الدكتور نزار عيسى على تكريمه بتقييم هذا البحث واغنائه بنصائحه القيمة.
- ❖ جزيل الشكر للدكتور شادي سكرية لكل التسهيلات التي قدمها لانجاز هذا البحث
- ❖ جزيل الشكر للدكتورة رنا حبيب والدكتور سامر محمود لكل التسهيلات التي قدماها لانجاز هذا البحث
- ❖ جزيل الشكر للدكتور مجد الجمالي لنصائحه القيمة
- ❖ جزيل الشكر لزملائي في مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانية د.حسان الخوري، د.ريما الدنيا، أميرة، د.نبهة، علاء، خزامي، رزان ، فؤاد، محمد، نور، شذى، عليا ، عبير، منال
- ❖ جزيل الشكر لزملائي في كلية العلوم: دينا ، نور حمودة ، مريم

لمحة عن الباحث

ولدت في ١٩٨٩/١/٥

حصلت على الشهادة الثانوية عام ٢٠٠٦ وبدرجة قدرها ٢٦٠/٢٥١

حصلت على شهادة البكالوريوس في الصيدلة عام ٢٠١١

شاركت في الاشراف العملي على العديد من الجوانب التطبيقية والعملية في كلية الصيدلة

تصريح

الاسم الكامل: مروة نذير الحبش

مكان و تاريخ الولادة: دمشق ١٩٨٩/١/٥

عنوان البحث باللغة العربية: التعبير الجيني عن الهستونات H2.H3.H4 عند الليشمانية
المدارية

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

لم يتم قبض أي مبلغ مادي أو مكافأة عينية سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام
بعمل يمس جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها.
أتعهد بأنني لم أقل الا الحق و لم أخف شيئاً تحت طائلة المعاقبة والمحاسبة القانونية وعليه
أوقع.

مروة نذير الحبش

التاريخ

٢٠١٦/٤/١٠

قائمة المحتويات List of contents

٧ قائمة الأشكال
١٠ قائمة الجداول
١١ قائمة الاختصارات
١٧ I- المقدمة
١٧ ١- الخصائص العامة لطيفي الليشمانية
١٧ ١-١- بنية الطيفي
١٨ ١-١- شكل الليشمانية
١٨ ١-١-٢- شكل المشيقة
١٩ ٢-١- تصنيف الطيفي
٢١ ٣-١- العامل الناقل
٢٢ ٤-١- المستودع
٢٣ ٥-١- دورة حياة الطيفي
٢٤ ٢- الوبائيات والفيزيولوجيا المرضية
٢٤ ١-٢- انتشار داء الليشمانية
٢٥ ٢-٢- التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات
٢٥ ١-٢-٢- داء الليشمانيات الجلدي
٢٦ ٢-٢-٢- داء الليشمانيات الحشوي
٢٧ ٣-٢-٢- داء الليشمانيات الجلدي المخاطي
٢٨ ٣- جينوم الليشمانية
٢٨ ١-٣- الدنا النووي
٢٨ ٣-١-١- انتشار الدنا
٢٩ ٣-١-٢- معالجة الرنا الرسول
٣١ ٣-٢- دنا منشأ الحركة
٣٣ ٤- الاستجابة المناعية تجاه طفيليات الليشمانية
٣٣ ١-٤- البنية المستضدية لطفيليات الليشمانية
٣٣ ٤-١-١- المستضدات المفرزة والسطحية لطيفي الليشمانية
٣٦ ٤-١-٢- المستضدات غير المفرزة (داخل الخلية)
٣٦ ٤-٢- الاستجابة المناعية في داء الليشمانيات الجلدي الفأري
٤٠ ٤-٣- الاستجابة المناعية لدى الإنسان تجاه طفيل الليشمانية
٤٥ ٥- لقاحات الليشمانية
٤٥ ٥-١- القواعد المتبعة في تسجيل اللقاحات

٤٦ ٢-٥- مواصفات اللقاح المثالي
٤٧ ٣-٥- تطور لقاحات الليشمانية
٤٧ ٤-٥- لقاحات الليشمانية الحية
٤٨ ٥-٥- لقاحات الجيل الأول
٤٨ ١-٥-٥- طفيليات ليشمانية كاملة مقتولة
٥١ ٢-٥-٥- أجزاء من الطفيلي
٥٣ ٦-٥- لقاحات الجيل الثاني
٥٣ ١-٦-٥- اللقاحات الحية المضعفة
٥٥ ٢-٦-٥- التلقيح باستخدام مستضدات مأشوبة لطفيليات الليشمانية
٥٧ ٣-٦-٥- لقاحات تستخدم فيروسات أو جراثيم مأشوبة كحوامل ناقلة
٥٨ ٧-٥- لقاحات الجيل الثالث "لقاح الدنا"
٦٠ ٨-٥- لقاحات تعتمد على المستضدات الموجودة في لعاب الفاصدة
٦٠ ٩-٥- المواد المساعدة
٦١ ٦- الجينات المستهدفة لتصنيعها كلقاح دنا في دراستنا
٦٤ ١-٦- تفسير القدرة الاستمناعية لمستضدات Panantigens
٦٦ ٢-٦- جين H2A
٦٦ ١-٢-٦- لمحة عامة عن جين H2A
٦٧ ٢-٢-٦- وجود الجين في أنواع وحيدات الخلية الأخرى
٦٧ ٣-٦- جين H2B
٦٧ ١-٣-٦- لمحة عامة عن جين H2B
٦٧ ٢-٣-٦- وجود الجين لدى وحيدات الخلية الأخرى
٦٨ ٤-٦- جين H3
٦٨ ١-٤-٦- لمحة عامة عن جين H3
٦٨ ٢-٤-٦- وجود الجين لدى وحيدات الخلية الأخرى
٦٩ ٥-٦- جين H4
٦٩ ١-٥-٦- لمحة عامة عن جين H4
٦٩ ٢-٥-٦- وجود الجين لدى وحيدات الخلية الأخرى
 ٦-٦- الدراسات المطبقة على جينات هيستونات اللب النووي أو البروتينات المشفرة
٦٩ من قبلها في تحضير لقاحات ضد الليشمانية
٧٢ II- هدف البحث Aim of study
٧٣ III- المواد والطرائق
٧٤ ١- إثبات وجود الجينات المختارة ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا....

٧٥	١-١- اختيار البلاسميد وتصميم المشاريع النوعية للجينات المختارة واختيار إنزيمات الاقتطاع المناسبة باستخدام تطبيقات المعلوماتية الحيوية.....
٧٥	١-١-١- البلاسميد المستخدم في الدراسة.....
٧٦	٢-١-١- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لكل جين.....
٧٧	أ- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لجين H2A.....
٧٩	ب- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لجين H2B.....
٨١	ج- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لجين H3.....
٨٢	د- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لجين H4.....
	٢-١- تضخيم الجينات المختارة باستخدام المشاريع النوعية لكل جين على مستوى
٨٤	الدنا والدنا المتمم.....
٨٤	١-٢-١- استخلاص الدنا من طفيليات الليشمانية.....
٨٤	أ- تحضير الدارئات المستخدمة في الاستخلاص.....
٨٥	ب- بروتوكول عزل الدنا.....
٨٦	٢-٢-١- استخلاص الرنا RNA من طفيليات الليشمانية.....
٨٦	أ- تحضير المحاليل والدارئات المستخدمة بالعزل.....
٨٧	ب- بروتوكول الاستخلاص.....
٨٩	٣-٢-١- اصطناع الدنا المتمم cDNA.....
٨٩	أ- مكونات عديدة الاصطناع.....
٩٠	ب- بروتوكول الاصطناع.....
٩٠	٤-٢-١- تضخيم الدنا والدنا المتمم للجينات بالتفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR.....
٩٠	أ- تفاعل PCR لتضخيم جين H2A.....
٩٢	ب- تفاعل PCR لتضخيم جين H2B.....
٩٤	ج- تفاعل PCR لتضخيم جين H3.....
٩٥	د- تفاعل PCR لتضخيم جين H4.....
٩٦	٣-١- الرحلان الكهربائي لنواتج تضخيم الجينات.....
٩٦	١-٣-١- تحضير محاليل ودارئات الرحلان.....
٩٦	أ- تحضير دائرة Tris Borate EDTA buffer.....
٩٧	ب- تحضير هلامة الأغاروز.....
٩٨	٢- تنقية نواتج تضخيم الجينات.....
٩٨	٣- تحضير اللقاح من كل جين من الجينات المختارة.....
٩٨	١-٣- التأكد من فعالية إنزيمات الاقتطاع بهضم البلاسميد بإنزيم اقتطاع واحد.....
٩٩	٢-٣- التهضيم الثنائي للبلاسميد والجينات.....

١٠٠	٣-٣- الرحلان الكهربائي للبلاسميدات المهضمة ثنائياً
١٠٠	٣-٤- تنقية نواتج الهضم الثنائي للجينات والبلاسميدات
١٠١	٣-٥- قياس تركيز الجينات والبلاسميدات المهضمة بعد التنقية
١٠١	٣-٦- ربط الجين بالبلاسميد Ligation
١٠٣	٣-٧- الاستحالة Transformation
١٠٣	٣-٧-١- تهيئة الجراثيم E coli TOP 10
١٠٣	أ- تحضير الأوساط اللازمة لنمو الجراثيم
١٠٣	ب- بروتوكول تهيئة جراثيم E.coli TOP 10
١٠٤	٣-٧-٢- تفاعل الاستحالة Transformation
١٠٥	٤- تفاعل PCR لكشف الجينات ضمن البلاسميد أو المستعمرات
١٠٦	٤-١- تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H2A
١٠٦	٤-٢- تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H2B
١٠٧	٤-٣- تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H3
١٠٧	٤-٤- تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H4
	٤-٥- تفاعل PCR للمستعمرات النامية التي تحتوي جراثيم خضعت لعملية الاستحالة لإدخال بلاسميدات لا تحتوي على جينات
١٠٧	٥- الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR للمستعمرات النامية التي تحتوي جراثيم خضعت لعملية الاستحالة
١٠٧	٦- استخلاص البلاسميد المأشوب من جراثيم E.coli Top 10 التي أظهر تطبيق تفاعل PCR على مستعمراتها وجود الجينات فيها
١٠٨	٦-١- طريقة استخلاص البلاسميد المؤشب يدوياً
١٠٨	٦-١-١- تحضير محاليل الاستخلاص
١٠٨	٦-١-٢- بروتوكول الاستخلاص
	٦-٢- استخلاص البلاسميد من جراثيم E.coli Top 10 بواسطة عتيدة
١٠٩	GF-1 plasmid DNA extraction
١٠٩	أ- بروتوكول الاستخلاص
١١٠	٦-٣- الرحلان الكهربائي للبلاسميد المستخلص من جراثيم Ecoli Top 10
	٧- هضم البلاسميدات المستخلصة والمفترض إحتوائها على الجينات للتأكد من وجود الجينات فيها
١١١	٨- تفاعل السلسلة للجينات المثبت وجودها ضمن البلاسميد
١١٢	٩- تكثير البلاسميد الحاوي على جين H2A والبلاسميد الحاوي على جين H4
١١٤	IV- النتائج

١١٤	١- توصيف سلالة الليشمانية المستخدمة في دراستنا
	٢- إثبات وجود الجينات المختارة ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا.....
١١٥	١-٢ وجود جين H2A
١١٥	١-١-٢ مقارنة تطابق تسلسل جين H2A لدى أنواع الليشمانية الأخرى.....
١١٦	٢-١-٢ نسبة تطابق تسلسل جين H2A مع الجينوم البشري
١١٦	٢-٢ إثبات وجود جين H2B
١١٦	١-٢-٢ مقارنة تطابق تسلسل جين H2B لدى أنواع الليشمانية الأخرى
١١٧	١-٢-٢ نسبة تطابق تسلسل جين H2B مع الجينوم البشري
١١٧	٣-٢ اثبات وجود جين H3.....
١١٧	١-٣-٢ مقارنة تطابق تسلسل جين H3 لدى أنواع الليشمانية الأخرى.....
١١٨	٢-٣-٢ نسبة تطابق تسلسل جين H3 مع الجينوم البشري
١١٨	٤-٢ اثبات وجود جين H4.....
١١٨	١-٤-٢ تطابق تسلسل جين H4 لدى أنواع الليشمانية الأخرى
١١٩	٢-٤-٢ نسبة تطابق تسلسل جين H4 مع الجينوم البشري
١١٩	٣- تصميم المشارع.....
١١٩	١-٣-١ التسلسلات النهائية لمشارع جين H2A
١٢٠	٢-٣-١ التسلسلات النهائية لمشارع جين H2B
١٢١	٣-٣-١ التسلسلات النهائية لمشارع جين H3
١٢١	٤-٣-١ التسلسلات النهائية لمشارع جين H4
١٢١	٤- تضخيم الجينات المختارة باستخدام المشارع النوعية المصممة
١٢١	١-٤-١ استخلاص الدنا DNA
١٢٢	٢-٤-١ التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR لتضخيم الجينات المختارة
١٢٤	٥- التعبير عن الجينات المختارة.....
١٢٤	١-٥-١ استخلاص الرنا RNA من طفيليات الليشمانية المدارية
١٢٥	٢-٥-١ اصطناع الدنا المتمم cDNA
١٢٥	٣-٥-١ تضخيم الدنا المتمم للجينات المختارة
١٢٦	٦- تحضير اللقاح باستخدام كل جين من الجينات المختارة.....
١٢٦	١-٦-١ تفاعل الهضم Digestion
١٢٦	١-١-٦-١ التأكد من فعالية إنزيمات الاقتران وضبط شروط تفاعل التهضيم.....
١٢٧	٢-١-٦-١ التهضيم التثائي للبلاسميدات والجينات.....
١٢٨	٢-٦-١ ربط البلاسميد بالجينات المختارة

١٢٨ Transformation	٣-٦- تفاعل الاستحالة
١٢٩	٦-٤- اختيار المستعمرات النامية الحاوية على البلاسميد المأشوب
١٢٩	٦-٤-١- تحري وجود الجينات ضمن المستعمرات النامية
		٦-٤-٢- التأكد من وجود الشكل النموذجي للبلاسميد المغلق في المستعمرات
١٣١	الحاوية على الجينات المدروسة
		٦-٤-٣- التأكد من وجود الجينات ضمن البلاسميد في المستعمرات الحاوية على
١٣٢	الجينات H2A أو H2B أو H3 أو H4
١٣٤	٦-٤-٤- مقارنة نتائج الاستخلاص اليدوي مع نتائج الاستخلاص بعتيدة استخلاص البلاسميد
١٣٥	٦-٥-١- سلسلة الجينات ضمن البلاسميد
١٣٥	٦-٥-١- نتائج سلسلة جين H2A
		أ- مقارنة تسلسل الدنا المتمم لجين H2A لدى سلالة الليشمانية المدارية
١٣٦	المستخدمة في دراستنا مع تسلسلاتها في أنواع الليشمانية الأخرى
		ب- مقارنة تسلسل الحموض الأمينية للهيستون H2A المشفر من
١٣٧	جين "L.tropica, H2A" مع أنواع الليشمانية الأخرى
١٣٩	ج- نسبة تطابق تسلسل جين H2A الناتج عن السلسلة مع الجينوم البشري
١٤٠	٦-٥-٢- نتائج سلسلة جين H4
		أ- مقارنة تسلسل الدنا المتمم لجين H4 لدى سلالة الليشمانية المدارية
١٤١	المستخدمة في دراستنا مع تسلسلاتها في أنواع الليشمانية الأخرى
		ب- مقارنة تسلسل الحموض الأمينية للهيستون H4 لدى سلالتنا مع
١٤٢	أنواع الليشمانية الأخرى
١٤٣	ج- نسبة تطابق تسلسل جين H4 الناتج عن السلسلة مع الجينوم البشري
١٤٤	V- المناقشة Discussion
١٤٨	VI- الاستنتاجات Conclusion
١٤٨	VII- المقترحات والتوصيات
١٤٩	VIII- الملخص باللغتين العربية والإنكليزية
١٥٢	IX- المراجع
١٧٤	X- الملحق

قائمة الأشكال

- الشكل ١. البنية التفصيلية لليشمانات (أ) وشكلها النموذجي في البالعات (ب)، ضمن لطاخة لخزعة مأخوذة من إصابة جلدية بالليشمانية المدارية، بعد تلوينها بملون غيمزا حيث يشير السهم إلى أحد الأشكال غير المتحركة النموذجية التي تمتاز بوجود النواة ومنشأ الحركة..... ١٨
- الشكل ٢. البنية التفصيلية للمشيقات (أ)، وشكلها النموذجي في مستنبت زرع بعد تلوينها بملون غيمزا (ب) وتجمعها لتشكيل الشكل الوردي (ج)..... ١٩
- الشكل ٣. تصنيف أنواع الليشمانية وفقاً لمنظمة الصحة العالمية ٢٠١٠..... ١٩
- الشكل ٤. (أ) صورة لذبابة الرمل (ب) ورسم توضيحي لها لدورة حياة الطفيلي داخلها..... ٢٢
- الشكل ٥. دورة حياة طفيليات الليشمانية..... ٢٤
- الشكل ٦. انتشار داء الليشمانيات الجلدي في العالم..... ٢٦
- الشكل ٧. المظاهر السريرية لداء الليشمانية: (أ) الحشوية، (ب) المخاطية الجلدية، (ج) الجلدية..... ٢٧
- الشكل ٨. تنظيم جينات صبغيات طفيليات الليشمانية..... ٢٩
- الشكل ٩. منطقة جين الإكسون الصغير mini-exon gene في الليشمانية..... ٣٠
- الشكل ١٠. عملية التضفير الانتقالي للحصول على الرنا الرسول الناضج mRNA، تشمل إضافة القبة المتمثلة بقائد التضفير، والتدليل بإضافة عديد الأدينين..... ٣١
- الشكل ١١. دنا منشأ الحركة في الزجاج (I) حيث يظهر كيفية تداخل الأقراص في الفراغ، وفي العضوية (II) ويظهر كيفية تكس الأقراص..... ٣٢
- الشكل ١٢. مظهر الحلقات الصغيرة تحت المجهر الإلكتروني..... ٣٢
- الشكل ١٣. تمايز الخلايا التائية غير المتمرسة Th0، ترمز DC للخلايا التغصنية و STAT لعوامل الانتساخ..... ٣٧
- الشكل ١٤. السيتوكينات والخلايا التي تتدخل في الاستجابة المناعية عند الإصابة بداء الليشمانية الجلدي الفأري..... ٤٠
- الشكل ١٥. نموذج افتراضي للقدرة الاستمناعية لمستضدات Panantigens خلال الإصابة بداء الليشمانيات..... ٦٥
- الشكل ١٦. بنية لب الجسيم النووي..... ٦٦
- الشكل ١٧. بنية البلاسميد PCI..... ٧٦
- الشكل ١٨. منطقة تسلسلات التعرف لإنزيمات الاقتراع ضمن البلاسميد PCI..... ٧٧
- الشكل ١٩. الدائرة الملائمة لإنزيمي الاقتراع ECORIXBAI التي تؤمن فعالية هضم ١٠٠%..... ٧٨

- الشكل ٢٠. الدائرة الملائمة لإنزيمي الاقترع XBAI\SALI التي يؤمن فعالية هضم ١٠٠%. ٨٢
- الشكل ٢١. منحني تكاثر المشيقات لسلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا..... ١١٤
- الشكل ٢٢. رحلان الدنا الجينومي لطفيليات الليشمانية المدارية..... ١٢٢
- الشكل ٢٣. رحلان ناتج تضخيم الجينات باستخدام المشارع النوعية لكل جين..... ١٢٣
- الشكل ٢٤. رحلان الرنا والدنا لطفيليات الليشمانية المدارية..... ١٢٤
- الشكل ٢٥. رحلان ناتج تضخيم الدنا المتمم للجينات المختارة باستخدام المشارع النوعية لكل جين..... ١٢٦
- الشكل ٢٦. نمط رحلان البلاسميدات المهضمة بإنزيم اقترع واحد..... ١٢٧
- الشكل ٢٧. نمط رحلان البلاسميدات المهضمة بإنزيمي اقترع معاً وبنفس الوقت..... ١٢٨
- الشكل ٢٨. نمو مستعمرات جراثيم الإشريكية الكولونية Top10 الحاوية على بلاسميد مأشوب على وسط LB أغار يحتوي على الأمبيسلين..... ١٢٩
- الشكل ٢٩-٣٠. نمط رحلان نتائج تفاعل PCR لتضخيم الجينات المدروسة في المستعمرات الجرثومية..... ١٣٠-
- الشكل ٣١. نمط رحلان البلاسميد المستخلص من المستعمرات الحاوية التي بين تفاعل PCR احتوائها على الجينات المدروسة..... ١٣١
- الشكل ٣٢. نمط رحلان البلاسميدات، المهضمة وغير المهضمة، المؤشبة بالجينات والمستخلصة من المستعمرات التي بين تفاعل PCR احتوائها على احد الجينات المدروسة H2A أو H2B أو H4 أو H3..... ١٣٤
- الشكل ٣٣. نمط رحلان البلاسميدات المؤشبة المستخلصة يدوياً او بواسطة عتيدة GF-1 Plasmid DNA Extraction من شركة vivantis..... ١٣٥
- الشكل ٣٤. (أ) تسلسل جين H2A لدى سلالة الليشمانية المدارية (L.tropica, H2A) في صورة عن معلومات تسجيل تسلسل الجين "L.tropica, H2A" في Gene bank..... ١٣٦
- الشكل ٣٥. ترصيف تسلسل الدنا المتمم لجين H2A لدى سلالتنا "L.tropica, H2A" والليشمانية الكبيرة، والطفلية، والدونوفانية، والميكسيكية، والبرازيلية..... ١٣٧
- الشكل ٣٦. تطابق كل من تسلسل الدنا المتمم للجين H2A وتسلسل الحموض الأمينية للبروتين الذي تشفره لدى كل من الليشمانية المدارية، والكبيرة، والطفلية، والدونوفانية، والميكسيكية، والبرازيلية..... ١٣٨
- الشكل ٣٧. تطابق تسلسل البروتين H2A عند كل من الليشمانية المدارية، والكبيرة، والطفلية، والدونوفانية، والميكسيكية والبرازيلية..... ١٣٩

- الشكل ٣٨. عدم تطابق تسلسل الجين "L.tropica, H2A" مع تسلسل الجينوم البشري، باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi ١٤٠
- الشكل ٣٩. (أ) تسلسل جين H4 tropica الناتج عن تفاعل السلسلة
 (ب) معلومات تسجيل تسلسل الجين في Gene bank ١٤٠
- الشكل ٤٠. تطابق تسلسل الدنا المتمم لجين H4 في دراستنا عند الليشمانية المدارية مع تسلسل الدنا المتمم لهذا الجين عند باقي أنواع الليشمانية الكبيرة، الطفلية، الدونوفانية، الميكسيكية والبرازيلية..... ١٤١
- الشكل ٤١. تطابق تسلسل الجين H4 في سلالة الليشمانية المدارية التي أجرينا البحث عليها مع تسلسل الجين ضمن أنواع الليشمانية الأخرى الكبيرة، الطفلية، الدونوفانية، الميكسيكية والبرازيلية وتطابق تسلسل البروتين المشفر من قبل هذا الجين مع البروتينات المشفرة من قبل باقي الأنواع..... ١٤٢
- الشكل ٤٢. تطابق تسلسل البروتين H4 مع تسلسلاته في الليشمانية الكبيرة، الطفلية، الدونوفانية، المكسيكية والبرازيلية..... ١٤٣
- الشكل ٤٣. عدم تطابق جين H4 عند الليشمانية المدارية مع الجينوم البشري. حيث يظهر عدم وجود تطابق بين تسلسل جين H4 عند الليشمانية المدارية و تسلسل الجينوم البشري بعد إجراء تطبيق Blast على موقع ncbi..... ١٤٣

قائمة الجداول

- الجدول ١. أنواع طفيليات جنس الليشمانية والمتلازمات السريرية الرئيسية التي تسببها..... ٢٠
- الجدول ٢. مكونات مزيج تفاعل PCR..... ٩٢
- الجدول ٣. البرنامج الحراري المعتمد لتفاعل PCR لتضخيم الجينات..... ٩٢
- الجدول ٤. الكواشف المطلوبة لتفاعل التهضيم وحجومها..... ٩٨
- الجدول ٥. الكواشف المطلوبة لتهضيم البلاسميد والجينات المختلفة وحجومها..... ٩٩
- الجدول ٦. الكواشف المستخدمة في تفاعل الربط وحجومها..... ١٠٢
- الجدول ٧. حجوم الكواشف الداخلة في تفاعل PCR..... ١٠٦
- الجدول ٨. الكواشف المطلوبة لتفاعل التهضيم وحجومها..... ١١١
- الجدول ٩. تسلسلات المشاريع النهائية المصممة لتضخيم الجينات المدروسة..... ١٢٠

قائمة الاختصارات

- APCs: Antigen presenting cell. خلية مقدمة للمستضد.
- Alum: aluminium hydroxide. هيدروكسيد الألومنيوم.
- ALM: Autoclaved leishmania major. ليشمانية كبيرة موصدة.
- BCG: Bacille Calmette–Guerin. عُصَيَاتُ كَالْمَيْتِ غَيْرَان.
- Bp: Base pair. زوج أساس.
- cDNA: Complementary DNA. الدنا المتمم.
- CL: Cutaneous leishmaniasis. داء الليشمانيات الجلدي.
- CR: Cell receptor. مستقبلية خلية.
- CPG-ODN: cytosine phosphothate guanosine oligodeoxy nucleotide.
- CPA: Cysteine proteinase A. بروتيناز السيستئين A.
- DC: dendritic cell. خلية تغصنية.
- DTH: Delayed type Hypersensitivity. فَرَطُ التَّحَسُّسِ مِنَ النَّمَطِ الْأَجَلِ.
- dhfr-ts: dihydrofolate reductase thymidylate synthase. مختزلة الثنائي هيدرو الثيميديلات سنثاز.
- DNA: Deoxyribonucleic acid. الحمض الريبسي النووي منقوص الأوكسجين.
- DTT: Dithiothreitol.
- dNTP: Deoxynucleotide.
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
- FML: Fucose mannose ligand. لجين مانوز فوكوز.
- GDP-mannose: Guanosine diphosphate mannose. ثنائي فسفات غوانوزين المانوز.
- Gp63: Leishmania surface protease. بروتيناز الليشمانية السطحي.

GIPLS: Glycoinositol phospholipids.

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HSV-1: Herpes simplex virus 1. الفيرسة الحلئية البسيطة ١

HaspB1: Hydrophilic acylated surface protein B1.

H2A: Histone 2A. هيسٲون

H2B: Histone 2B.

H3: Histone 3.

H4: Histone 4.

HCL: Hydrochloric acid. حمض كلور الماء

HRP: Horseradish peroxidase. بيروكسيداز فجل الخيل

IL-12: Interleukine 12. إنٲرلوكين ١٢

IL-18: Interleukine 18. إنٲرلوكين ١٨

IL-4: Interleukine 4. إنٲرلوكين ٤

IL-5: Interleukine 5. إنٲرلوكين ٥

IL-10: Interleukine 10. إنٲرلوكين ١٠

IFN- γ : Interferon- γ . إنٲرفيون غاما

IL-6: Interleukine 6. إنٲرلوكين ٦

IgG: Immunoglobulin Gamma. غلوبولين مناعي غاما

KMP11: kinetoplastid protein

Kb: Kilo base. كيلو قاعدة

KLM: killed Leishmania major. ليشمانية كبيرة مقتولة

kcal: kilo calorie. كيلو كالوري

- KCl: Potassium chloride. كلوريد البوتاسيوم
- LPG: lipophosphoglycan. فوسفو غليكان الشحمي.
- L. major: Leishmania major. الليشمانية الكبيرة
- L. tropica: Leishmania tropica. الليشمانية المدارية
- L. aethiopic: Leishmania aethiopic. الليشمانية الأثيوبية
- L. infantum: Leishmania infantum. الليشمانية الطفلية
- L. venezuelensis: Leishmania venezuelensis. الليشمانية الفنزويلية
- L. pifanoi: Leishmania pifanoi. الليشمانية البفانوية
- L. braziliensis: Leishmania braziliensis. الليشمانية البرازيلية
- L. panamensis: Leishmania panamensis. الليشمانية البنامية
- L. guyanensis: Leishmania guyanensis. الليشمانية الغيانية
- L. peruviana: Leishmania peruviana. الليشمانية البيروفية
- L. amazonensis: Leishmania amazonensis. الليشمانية الأمازونية
- L. donovani: Leishmania donovani. الليشمانية الدونوفانية
- L. chagasi: Leishmania chagasi. الليشمانية الشاغاسية
- LZ: Leishmanization. اللشمنة
- LST: leishmanin skin test. اختبار الليشمانية الجلدي
- Lag: Leishmania donovani promastigote membrane antigens.
- LACK: Leishmania homolog of receptors for Activated C Kinase.
- LmSTI1: L. major homolog of the eukaryotic stress-inducible protein-1
- Leish-111f: Leishmania-derived recombinant polyprotein.

LeIF: elongation initiation factor.

LB: Luria-Bertani.

MCL: Mucocutaneous leishmaniasis. داء اللّيشمانيّاتِ المُخاطِبيّ الجُلديّ.

mRNA: Messenger Ribonucleic acid. الحمض الريبّي النووي المرّسال.

MIP-1b: macrophage inflammatory protein1b. بروتين بلعمي التهابي.

Mac-1: macrophage-1 antigen. ١. مستضد بلعمي

MHC: Major histocompatibility complex. معقد التوافق النسيجي الكبير.

MHC-I: Major histocompatibility complex type I. ١. معقد التوافق النسيجي الكبير نمط ١.

MHCII: Major histocompatibility complex typeII. ٢. معقد التوافق النسيجي الكبير نمط ٢.

MISA: Montanide ISA 720.

MPL-SE: monophosphoryl lipid MPL – squalene.

mM: Millimolar. ميلي مول.

M: Molar. مول.

MgCl₂: Magnesium chloride. كلوريد المغنزيوم.

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. فسفات ثنائي نوكليوثيد الأدينين و النيكوتيناميد

NO: Nitric Oxide. أكسيد النتريك

non-PC: non-phosphatidylcholine.

NH36: Nucleoside hydrolase 36. ٣٦. هيدرولاز نوكليوزيد

ORF: open reading frame.

PCR: Polymerase chain reaction. التفاعل التسلسلي للبوليميراز.

PGCs: polycistronic gene clusters. عناقيد متعددة الجينات.

PKDL: post Kala-azar dermal leishmaniasis. داء اللّيشمانيّات الجُدّي التّالي للكلّازار

PSA-2: Leishmania promastigote surface antigen-2. المستضد السطحي لمشيقات اللّيشمانية

PpGs: proteophosphoglycan. بروتيو فسفو غليكان

PS CpG: nuclease-resistant phosphorothioate CpG oligodeoxynucleotides.

PO CpG: nuclease-sensitive phosphodiester CpG ODNs

PSA2: Leishmania promastigote surface antigen-2.

PBS: Phosphate-buffered saline. دائرة فسفات ملحّية

ROS: reactive oxygen species.

SAP: secreted acid phosphatase. أنزيم فسفاتاز الحمضية المفرز

SAS: Splice acceptor Site. موقع متقبّل التضفير

SL: Spliced leader. قيادي التضفير

SEAGs: Leishmania major culture-derived soluble exogenous.

sLAg: soluble Leishmania major antigen. مستضد ذواب للّيشمانية الكبيرة

SV40: Simian virus 40. الفيروس القردي ٤٠

SP15: salivary protein 15. بروتين لعابي ١٥

SDS: sodium dodecyl sulfate. سلفات دوديسيل الصوديوم

ssDNA: single-stranded DNA. دنا وحيد الطاق

TNF α : Tumor necrosis factor alpha. عامل نخر الورم ألفا

TGF- β : Transforming growth factor beta. عامل نمو محول بيتا

TCR: T cell receptor. مستقبلة الخلايا التائية

Treg: Regulatory T cell. الخلية التائية المنظمة

TSA: thiol specific antioxidant.

TLR: Toll like receptor.

Th1: T helper cells type 1. ١ خلايا تائية مساعدة نمط

Th2: T helper cells type 2. ٢ خلايا تائية مساعدة نمط

TE: Tris EDTA.

TRYP: Tryparedoxin peroxidase.

TBE: Tris Borate EDTA

TMB: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine.

UV: Ultra violet. فوق بنفسجي

VL: Visceral leishaniasis. داء الليشمانيات الحشوي.

VE: Vaccine efficacy. نجاعة اللقاح

WHO: World Health Organization. منظمة الصحة العالمية

مكل: ميكروليتر

I- المقدمة Introduction

تعرف أدواء الليشمانيات Leishmaniasis بأنها مجموعة من الآفات التي تصيب الجلد والأغشية المخاطية والأحشاء وتسببها طفيليات من شعبة الحيوانات الأوالي protozoa من جنس الليشمانية Leishmania. تنتقل طفيليات الليشمانية إلى الإنسان بواسطة ذبابة الرمل (١). يمتلك الطفيلي شكلان المشيقة Promastigote، وهو شكل خارج خلوي يتضاعف في المعى المتوسط للناقل وفي الأوساط الزرععية، والليشمانة amastigote وهو شكل داخل خلوي يعيش ويتضاعف ضمن بالعات العديد من الثدييات بما فيها الإنسان (٢). يصيب داء الليشمانيات حوالي ١٢ مليون شخص في العالم في المناطق المدارية وتحت المدارية، ويؤدي سنوياً إلى موت ٥٠ ألف منهم. تسجل سنوياً حوالي ٢ مليون حالة سريرية جديدة، ٥,٠ مليون إصابة بداء الليشمانيات الحشوي و ١,٥ مليون إصابة بداء الليشمانيات الجلدي (٣).

تتراوح شدة الإصابة بداء الليشمانيات بين آفات جلدية سليمة العواقب إلى عداوى جهازية خطيرة وقاتلة. ترتبط مقاومة المضيف للعدوى باستجابة مناعية من نمط الخلايا التائية المساعدة Th1 تؤدي إلى تفعيل البالعات وقتل الطفيليات بداخلها بألية تعتمد على تشكيل أكسيد النترريك. بينما يرتبط تطور العدوى عادة باستجابة مناعية من نمط الخلايا التائية المساعدة Th2 تؤدي إلى تفعيل المناعة الخلطية (٤).

يعتمد ضبط العدوى حالياً على المعالجة الكيميائية للمصابين، لها مساوئ عديدة فهي سامة وباهظة الثمن وترتبط مع معدلات نكس ومقاومة عالية، ومكافحة الناقل أو المستودع وهو أمر صعب التحقيق عملياً في البلدان الفقيرة أو النامية بسبب التكلفة الباهظة وعدم إمكانية الاستمرار والمتابعة. وبالتالي يعتبر التلقيح الأمل الأفضل لمكافحة كافة أشكال المرض ويشكل تطوير لقاح مضاد لليشمانية آمن وناجع ومنخفض التكلفة، أولوية صحية عالمية هامة جداً (٤).

١- الخصائص العامة لطفيلي الليشمانية

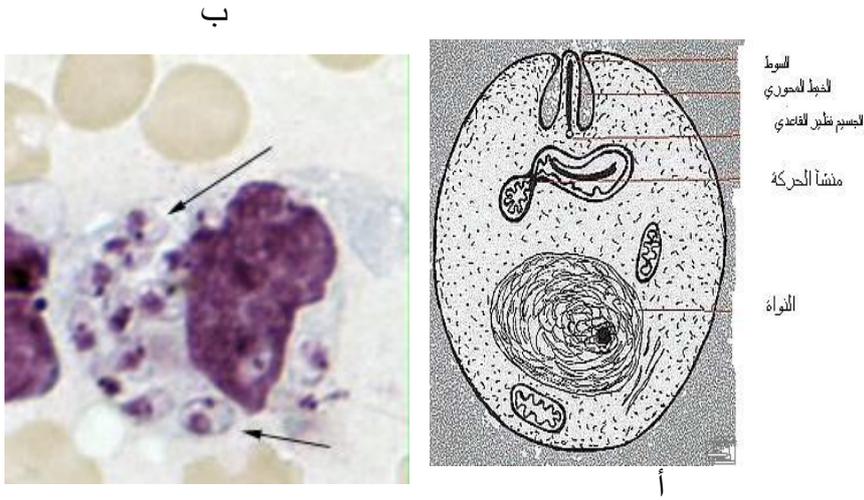
١-١- بنية الطفيلي Structure of Leishmania

طفيليات الليشمانية وحيدات خلية حقيقية النواة تحتوي على نواة وجسيم متقدري

وحيد وعضيات داخل خلوية تتضمن منشأ الحركة kinetoplast، يحوي منشأ الحركة بدوره على الدنا المتقدري، والسوط Flagella (٥). تمتلك طفيليات الليشمانية شكلين مختلفين الليشمانات والمشيقات.

١-١-١- شكل الليشمانة Amastigote

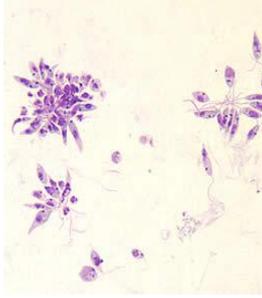
شكل دائري إلى بيضوي يوجد في خلايا الجملة الشبكية البطانية reticuloendothelial cells عند الثدييات بما فيها الإنسان. يظهر تلوين الليشمانات بملون غيمزا وجود نواة كبيرة بلون بنفسجي غامق، ومنشأ الحركة kinetoplast يتلون باللون البنفسجي ويأخذ شكل نقطة كبيرة. يربط خيط دقيق منشأ الحركة بالجسيم نظير القاعدي dot-like basal body الذي ينشأ منه خيط محوري axoneme يمتد باتجاه الناحية الأمامية للطفيلي. تتراوح الأبعاد ما بين ٢-٦ ميكرون (٦).



الشكل ١. البنية التفصيلية لليشمانات (أ) وشكلها النموذجي في البالعات (ب)، ضمن لطاخة لخزعة مأخوذة من إصابة جلدية بالليشمانية المدارية، بعد تلوينها بملون غيمزا حيث يشير السهم إلى أحد الأشكال غير المتحركة النموذجية التي تمتاز بوجود النواة ومنشأ الحركة. الشكل (أ) مقتبس من (٧) الشكل (ب) مقتبس من (٨).

١-١-٢- شكل المشيقة Promastigote

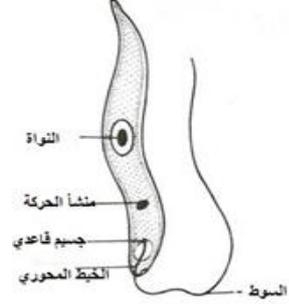
تمتاز المشيقات بكونها أشكال متطاولة توجد في المستنبتات الزرعية وذبابة الرمل



ج



ب

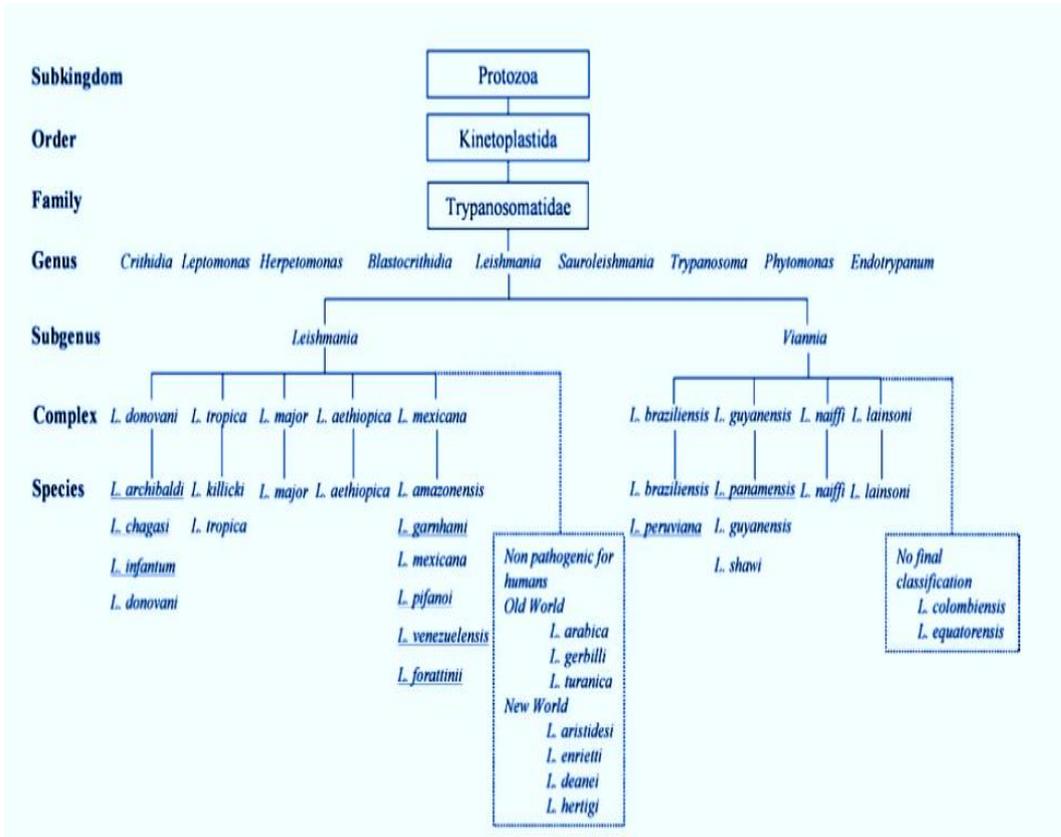


أ

الشكل ٢. البنية التفصيلية للمشيقات (أ) (٩)، وشكلها النموذجي في مستنبت زرع بعد تلويئها بملون غيمزا (ب) (٩) وتجمعها لتشكيل الشكل الوردى (ج) (١٠).

وتتراوح أبعادها بين 1.5-3.5 ميكرون عرضاً و20-15 ميكرون طولاً. تمتلك هذه الأشكال، كما يوضح الشكل ٢ سوطاً حراً وحيداً بطول 15-28 ميكرون يسمح لها بالحركة. تتجمع الأشكال المتحركة الهرمة مع بعضها لتؤلف الشكل الوردى ويسمى Rosette (٦).

٢-١- تصنيف الطفيلي Taxonomy of Leishmania



الشكل ٣. تصنيف أنواع الليشمانية وفقاً لمنظمة الصحة العالمية 2010 (١٢).

الجدول ١. أنواع طفيليات جنس الليشمانية والمتلازمات السريرية الرئيسة التي تسببها (١٣).

الأشكال السريرية لداء الليشمانية	الأنواع الطفيلية SPECIES
الداء الليشمانيات الجلدي في العالم القديم	<p>معقد الليشمانية الكبرى L. major Complex</p> <p>الليشمانية الكبرى L. major</p> <p>معقد الليشمانية المدارية L. tropica Complex</p> <p>الليشمانية المدارية L. tropica</p> <p>معقد الليشمانية الأثيوبية L. aeThiopica Complex</p> <p>الليشمانية الأثيوبية L. aeThiopica</p> <p>الليشمانية الطفلية L. infantum</p>
- في العالم الجديد	<p>معقد الليشمانية المكسيكية L. mexicana Complex</p> <p>الليشمانية المكسيكية L. mexicana</p> <p>الليشمانية الأمازونية L. amazonensis</p> <p>الليشمانية الفنزويلية L. venezuelensis</p> <p>الليشمانية البيفانوية L. pifanoi</p> <p>معقد الليشمانية البرازيلية L. braziliensis Complex</p> <p>الليشمانية البرازيلية L. braziliensis</p> <p>الليشمانية البانامية L. panamensis</p> <p>الليشمانية الغانية L. guyanensis</p> <p>الليشمانية البيروفية L. Peruviana</p>
داء ليشمانيات جلدي منتشر في العالم القديم	<p>الليشمانية الأثيوبية L. aethiopica</p> <p>الليشمانية الأمازونية L. amazonensis</p>
- في العالم الجديد	
داء ليشمانيات جلدي ناكس	الليشمانية المدارية L. tropica
- داء ليشمانيات جلدي تالي للكالأزار	الليشمانية الطفلية L. infantum
داء ليشمانيات جلدي مخاطي في العالم القديم	الليشمانية الأثيوبية (حالات استثنائية) L. aethioica
- في العالم الجديد	معقد الليشمانية البرازيلية L. braziliensis Complex
داء ليشمانيات حشوي في العالم القديم	معقد الليشمانية الدونوفانية L. donovani Complex
- في العالم الجديد	<p>الليشمانية الدونوفانية L. donovani</p> <p>الليشمانية الطفلية L. infantum</p> <p>الليشمانية الشاغاسية L. chagasi</p>

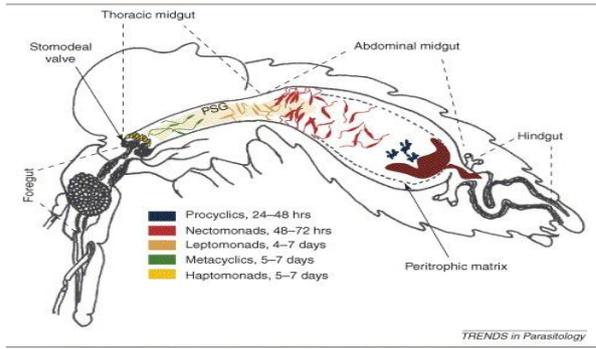
تتنتمي الأنواع المختلفة من هذه الطفيليات إلى جنس الليشمانيا *Leishmania*، فصيلة المتقيبات *Trypanosomatidae*، رتبة ذوات منشأ الحركة *Kinetoplastida*، صف السوائط الحيوانية *Zoomastigophora*، تحت شعبة السوائط *Mastigophora*، شعبة السوائط اللحمية *Sarcomastigophora*، تحت مملكة وحيدات الخلية (الأوالي) *Protozoa*، مملكة الأولانيات *Protista* (١١) وبيبين الشكل ٣ التصنيف السابق.

٣-١- العامل الناقل *Vector*

تعد أنثى ذبابة الرمل *Sandfly*، الشكل ٤، الناقل الرئيسي لطفيلي الليشمانيا. تنتمي هذه الحشرات إلى رتبة ثنائيات الأجنحة *Diptera*، عائلة البعوضيات فراشية الظهر *Psychodidae*، تحت عائلة الفواصد *Phlebotominae*، وجنس الفواصد *Phlebotomus* وجنس *sergentomyia* في العالم القديم، وجنس *Lutzomyia* في العالم الجديد. وقد أشار *Alexander* في عام 2000 إلى أن تحت عائلة الفواصد تضم ما يقارب 500 نوعاً تعود إلى جنسي *Phlebotomus* و *Lutzomyia* وأن 10% منها فقط لها القدرة على نقل الإصابة بالليشمانيا (١٤).

يصاب الإنسان بداء الليشمانيا نتيجة لدغة أنثى ذبابة الرمل التي لا تنشط في ضوء النهار بل تنشط في المساء حيث تبدأ باللدغ بعد غروب الشمس (١٥). تتغذى ذبابة الرمل على دم أتوياء من ذوات الدم البارد والحار مثل الإنسان والقطط والكلاب والقوارض والماشية والخفافيش والطيور والسحالي. تأخذ ذبابة الرمل طفيليات الليشمانيا مع الدم ويتطور عندها الطفيلي، وتصبح بالتالي قادرة على نقل الطفيلي بعد ٧-١٠ أيام (١٥).

بالإضافة لدورها كعامل ناقل في دورة حياة الطفيلي يعتقد بأنها تلعب دوراً في الآلية الإمراضية للداء، حيث يتم خلال حقن الطفيلي، حقن مكونات الغدة اللعابية لأنثى الذبابة ضمن المجرى الدموي والتي وجد أن لها تأثيرات مضادة للتخثر وموسعة للأوعية الدموية ومضادة لتجمع الصفائح ومعدلة للمناعة ومضادة للإلتهاب وبالتالي يعتقد أن هذه التأثيرات تلعب دوراً مهماً في إمراضية داء الليشمانيا (١٦).



ب

أ

الشكل ٤. (أ) صورة لذبابة الرمل (١٧) (ب) ورسم توضيحي لها لدورة حياة الطفيلي داخلها (١٨).

٤-١- المستودع Reservoir

تعد القوارض والكلاب أهم مستودعات طفيليات 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، كالكليبات والقوارض Rodents، دور المستودع حيث يعتبر فأر الرمل السمين *Psammomys obesus* المستودع الرئيس لليشمانية الكبرى *L.major* في الشرق الأوسط (٦). تنتشر هذه البؤر في الشرق الأوسط وأواسط آسيا وبعض مناطق أمريكا اللاتينية. تنتشر الإصابات في هذه المناطق عند الحيوانات فقط ولا نجد سوى بعض الإصابات الفردية بين السكان (١٩).

- 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 (٦).

- بؤر ثالثة: يلعب فيها الإنسان دور المستودع الرئيس للطفيلي. أكثر الطفيليات شيوعاً في هذه البؤر هي طفيليات الليشمانية المدارية *L.tropica* (٦).

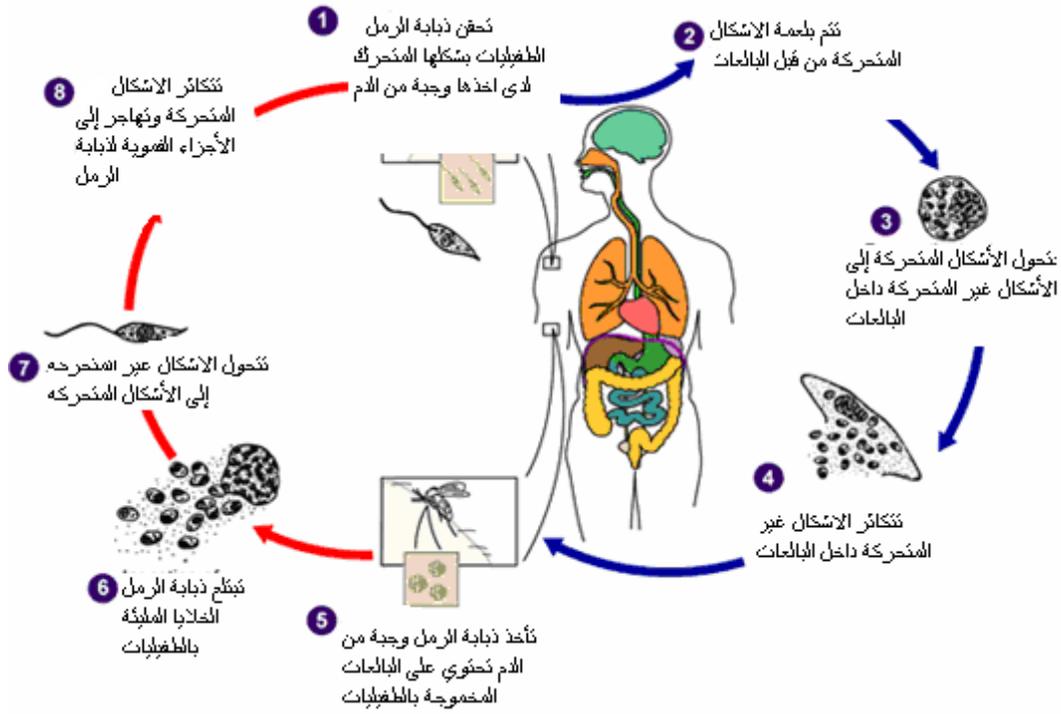
٥-١- دورة حياة الطفيلي

تضم دورة حياة طفيلي الليشمانية الليشمانات التي تتطفل على المضيف الفقاري والمشيقات التي تتطفل على المضيف اللاقاري أي ذبابة الرمل. تبدأ دورة حياة الطفيلي عندما تلدغ ذبابة الرمل إنساناً مصاباً أو أحد الحيوانات الثديية المصابة بداء الليشمانية ويوضح الشكل ٥ دورة حياة هذه الطفيليات. بما أن الحشرة الناقلة تتغذى على الدّم فإنها تبتلع الكريات البيض الوحيدة monocytes والبالعات Macrophages الحاوية على الطفيليات.

تخرج الليشمانات من الخلايا البالعة في المعى المتوسط لذبابة الرمل، وتتحوّل خلال عدة ساعات إلى مشيقات. تلتصق المشيقات بجدار المعى وتتضاعف بالانشطار الثنائي الطولي، هذا ولا ينقسم السوط إلى سوطين بل ينشأ سوط آخر ينجم عن تطوّر الخيط المحوري الناتج من منشأ الحركة، حيث ينمو باتجاه الخارج معطياً سوطاً جديداً (٢٠) (٢١). تهاجر المشيقات إلى البلعوم الأمامي للفاصدة، بعد 4-5 أيام فتسده ثمّ 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 تقيؤها 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 حائلة للخلايا. كما تتم بلعمة المشيقات الأخرى من قبل الخلايا البالعة في جلد الثوي. تتحوّل المشيقات داخل البالعات إلى أشكال غير متحركة تتكاثر ضمنها حتى تصل إلى أعداد كبيرة مما يؤدي إلى انفجار البالعات وتحرر المشيقات منها وبلعمتها من قبل بالعات أخرى وبالتالي إصابة هذه البالعات وهكذا (٢٠) (٢١).

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 (٢٠) (٢١).



الشكل ٥. دورة حياة طفيليات الليشمانية (٢٠).

يحدث في داء الليشمانيات الجلدي تكاثر موضعي فقط للطفيليات حيث تقتصر الإصابات بالليشمانية المدارية والمكسيكية على إصابة الخلايا الشبكية البطانية في الجلد. تشفى الإصابات الجلدية عادة من تلقاء نفسها دون الحاجة لأي علاج. أما في الداء الحشوي والجلدي المخاطي فتنتشر الطفيليات من الجلد، عبر الدم، لتغزو مناطق أخرى من الجسم حيث تنتقل طفيليات الليشمانية البرازيلية مثلاً بعد غزوها الخلايا الشبكية البطانية في الجلد إلى الأغشية المخاطية للأنف والفم والبلعوم مؤدية إلى تشوهات خطيرة يمكن أن تؤدي إلى موت المريض (٢٠) (٢١).

٢- الوبائيات والفيزيولوجيا المرضية

٢-١- انتشار داء الليشمانية

داء الليشمانية مرض متوطن في ٨٨ دولة حيث يوجد أكثر من ٣٥٠ مليون شخص معرضين لخطر الإصابة. تقدر إحصاءات منظمة الصحة العالمية حدوث مليوني حالة إصابة كل عام، ٠,٥ مليون إصابة بداء الليشمانية الحشوي و١,٥ مليون إصابة بداء الليشمانية الجلدي. يسبب داء الليشمانية الحشوي ٠,٥ مليون حالة سنويا أي بمعدل إصابة

يفوق ما تسببه بقية الأمراض الطفيلية الأخرى ويفوقه في ذلك داء الملاريا. في الحقيقة يصنف داء الليشمانيات في المرتبة التاسعة عالمياً بين الأمراض المعدية (٢٢).

تحدث أكثر من ٩٠% من حالات داء الليشمانية الحشوية في العالم في ٦ دول تشمل الهند، وبنغلادش، السودان، وجنوب السودان، وأثيوبيا، والبرازيل. يمتاز داء الليشمانيات الجلدي بانتشار أوسع وتحدث ثلث الحالات في أمريكا، وحوض البحر الأبيض المتوسط، وآسيا الغربية: من الشرق الأوسط إلى آسيا المركزية. يسجل في عشرة بلدان فقط العدد الأكبر من الإصابة الجلدية وتشمل هذه البلدان كل من أفغانستان، والجزائر، وكولومبيا، والبرازيل، وإيران، وسورية، وأثيوبيا، وجنوب السودان، وكوستاريكا، والبيرو. وتشكل حالات داء الليشمانيات الجلدي المشخصة فيها ما يقارب ٧٠-٧٥% من الحالات المشخصة في العالم (٢٣).

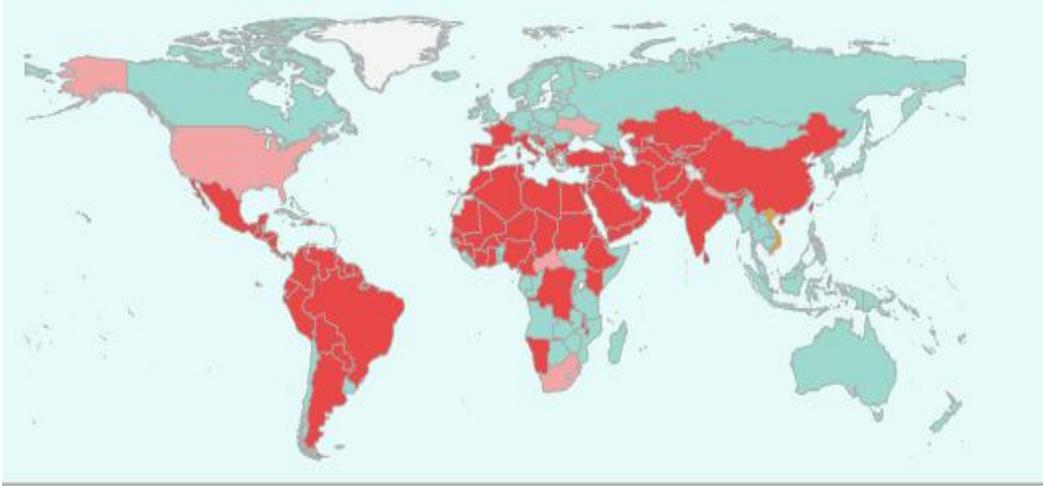
أصبح داء الليشمانيات من المشكلات الصحية الهامة في القطر وخاصة في السنوات الأخيرة حيث شهد القطر ارتفاعاً كبيراً بعدد الإصابات المسجلة في عدة محافظات مثل دمشق وريفها، حلب، وإدلب، والرققة، وحمص، وحماة، والحسكة، والساحل السوري. في الحقيقة، بعد أن وصل عدد الإصابات إلى ذروته عام ٢٠٠٣ وسجلت ٢٨٨٨١ إصابة تراجع إلى ١٧٧٠٩ إصابة عام ٢٠٠٧ ثم ما لبث أن عاد للإرتفاع ليسجل أكبر عدد من الإصابات عام ٢٠١١ حيث بلغ ٥٨١٥٦ إصابة مما يستدعي قرع جرس الإنذار حيث أصبحت سورية في مقدمة دول شرق المتوسط التي تعاني من انتشار الليشمانية (٢١).

٢-٢- التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات

٢-٢-١- داء الليشمانيات الجلدي (Cutaneous leishmaniasis (CL

ينجم داء الليشمانيات الجلدي عن الإصابة بالليشمانية المدراية *L. tropica* والليشمانية الأثيوبية *L. aethiopica* والليشمانية الكبرى *L. major* في العالم القديم، وعن الإصابة بالليشمانية المكسيكية *L. Mexicana* والليشمانية البرازيلية *L. braziliensis* والليشمانية الغوانية *L. guyanensis* والليشمانية الأمازونية *L. amazonensis* في العالم الحديث. تشكل الليشمانية الجلدية الشكل الأكثر شيوعاً في العالم لداء الليشمانية حيث يمثل ٧٠-٧٥% من الحالات المسجلة. يمكن للداء الجلدي أن يكون صعب العلاج وأن يستمر لفترة طويلة (٢١).

يتميز داء الليشمانيات الجلدي بآفات جلدية تقرحية تحتوي العديد من الطفيليات وتتفاوت المظاهر السريرية للداء باختلاف الأنواع المسببة (٢١). تتوضع الآفات على المناطق المكشوفة من الجلد كالوجه واليدين والساعدين والساقين والقدمين، ويرتبط توضعها بتقاليد اللباس في المنطقة التي ينتشر فيها الطفيلي (٢٤). تبدأ الآفة بحطاطة صغيرة حاكة قليلاً تظهر مكان لدغة الذبابة ثم تتوسع لتشكل قرحة ذات حواف صلبة محمرة. يمكن أن تبقى هذه الآفة جافة نسبياً مع قشرة مركزية وتدعى بالشكل الجاف وتتجم عن الإصابة بالليشمانية المدارية *L. tropica*، أو قد تكون الآفة نازة لمواد قيحية وتدعى بالشكل الرطب وتتجم عن الإصابة بالليشمانية الكبرى *L. major* (٢٥).



الشكل ٦. انتشار داء الليشمانيات الجلدي في العالم (٢٦).

٢-٢-٢- داء الليشمانيات الحشوي (VL) Visceral leishmaniasis

يعرف أيضا بداء كالازار Kala-azar وينجم عن الإصابة بالليشمانية الدونوفانية *L. donovani* والليشمانية الطفلية *L. infantum* في العالم القديم، وعن الإصابة بالليشمانية الشاغاسية *L. chagasi* في العالم الحديث. تفضل هذه الطفيليات مهاجمة البالعات الموجودة في الأحشاء وعادة ما توجد في الطحال والكبد ونقي العظام.

يعاني المصابون من حمى منخفضة طويلة الأمد، وانخفاض في الوزن، وضخامة في الكبد والطحال، وبترافق ذلك مع انخفاض شامل بعدد الكريات وفرط غاماغلوبولين

الدم. تؤدي الحالات غير المعالجة إلى الموت حتماً (٢١). يمكن أن تظهر عند بعض الأشخاص أعراض اصطلاح على تسميتها داء الليشمانيات الجلدي التالي لداء كالازار post Kala-azar dermal leishmaniosis PKDL حيث يظهر بعد الشفاء من داء الليشمانيات الحشوي بعدة سنوات طفح جلدي، وحطاطات تنتشر لتشمل مناطق واسعة من الجسم (٢٧).

٢-٢-٣- داء الليشمانيات الجلدي المخاطي Mucocutaneous leishmaniasis (MCL)

يعرف بأسماء مختلفة مثل داء الليشمانيات الأمريكي American Leishmaniasis، أو قرحة شيكلرو Chiclero ulcer. ينجم في العالم الحديث عن الإصابة بالليشمانية البرازيلية L.brazileinsis والليشمانية البانامية L. panamensis. يمكن لهذه الطفيليات أن تنتشر عبر المجرى الدموي أو اللمفاوي لتصل إلى الأنسجة المخاطية في الفم والجهاز التنفسي العلوي. تحدث ٩٠% من الحالات في بوليفيا، والبرازيل، والبيرو (٢١).

يمكن أن يظهر داء الليشمانيات المخاطي الجلدي بعد فترة تتراوح بين عدة أشهر إلى عدة سنوات من ظهور وتطور الآفات الجلدية، وبالتالي تعكس الإصابة تطور مزمن لأفة جلدية لم تشف بالشكل المطلوب. هذا ولا تزال الآلية الإمرضية غير واضحة تماماً ويعتقد أن تلعب العوامل الوراثية دوراً مهماً في تطور المرض. يتميز هذا الداء بتآكل الأنسجة الرخوة والغضروفية وقد يؤدي إهمال المعالجة إلى تشوهات خطيرة يمكن أن تؤدي إلى موت المريض (٢١).



أ ب ج

الشكل ٧. المظاهر السريرية لداء الليشمانية: (أ) الحشوية، (ب) المخاطية الجلدية، (ج) الجلدية (٢٨)

٣- جينوم الليشمانية

يتألف جينوم الليشمانية من نوعين من الدنا : دنا نووي ودنا منشأ الحركة.

٣-١- الدنا النووي

يملك جينوم الليشمانية في صيغته الفردانية haploid ٣٢٨١٦٦٧٨ زوج أساس منظمة في ٣٦ صبغي. يحوي الجينوم ٩١١ جين للرنا، و ٣٩ جين كاذبة-pseudo-genes، و ٨٢٧٢ جين معلومة مسؤولة عن ترميز البروتين (٢٩).

إن طفيليات الليشمانية مضاعفة الصيغة الصبغية diploid لكن يوجد بعض الصبغيات مختلة الصيغة الصبغية aneuploid. جينوم الليشمانية غني جداً بأسس السيتوزين والغوانين حيث تشكل ٦٣% من الأسس (١٥).

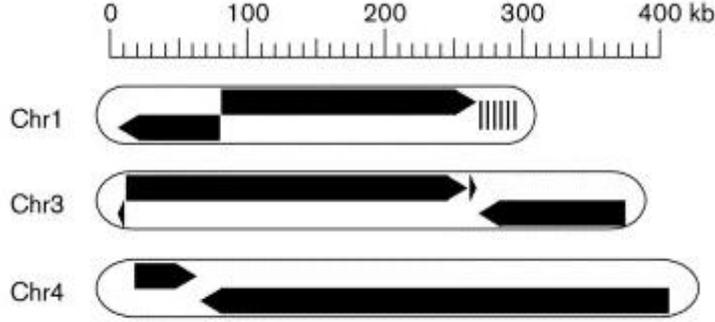
يتوزع جينوم أنواع جنس الليشمانية في العالم القديم في ٣٦ صبغياً يتراوح حجمها ما بين ٢٠٠-٤٠٠ kb. أما أنواع العالم الحديث فتملك ٣٤ أو ٣٥ صبغياً وذلك نتيجة لالتحام الصبغيين ٨+٢٩ والصبغيين ٢٠+٣٦ في أنواع الليشمانية المكسيكية L.mexicana، والتحام الصبغيين ٣٤+٢٠ في أنواع الليشمانية البرازيلية L.braziliensis (٣٠).

٣-١-١- انتساخ الدنا DNA Transcription

يحدث الانتساخ في الليشمانية بشكل انتساخ متعدد الجينات polycistronic أي ينتسخ من خلاله بنفس الوقت قطعة كبيرة من الصبغي التي تحوي عدة قطع، وتدعى هذه القطع عناقيد متعددة الجينات polycistronic gene clusters "PGCs" (٣١). تحتوي كل قطعة من قطع الدنا السابقة على عشرات إلى مئات من الجينات المرزمة للبروتين، والتي تكون مصطفة بشكل تسلسلي على نفس طاق الدنا.

لوحظ هذا التنظيم غير الاعتيادي للجينات لأول مرة، في الصبغي رقم ١ لطفيليات الليشمانية الكبرى L.major والذي يحتوي على ٨٥ جين منظمة في عنقودين متعددي الجينات PGCs يحوي العنقود الأول ٣٢ جين موجودة في الطاق السفلي من الصبغي ويحوي العنقود الثاني ٥٣ جين موجودة في الطاق العلوي من الصبغي. يتم انتساخ هذين

العنقودين بشكل متباعد باتجاه القسم الطرفي للصبغي telomere لإعطاء الرنا الرسول mRNA.



الشكل ٨. تنظيم جينات صبغيات طفيليات الليشمانية. يشير الخط الغامق إلى عناقيد الجينات الموجودة على الصبغيات ١ و٣ و٤. يحوي الصبغي ١ على عنقودين من الجينات يتم انتساخهما بشكل متباعد، ويحتوي الصبغين ٣ و٤ على عنقودين من الجينات يتم انتساخها بشكل متقارب (٣٢).

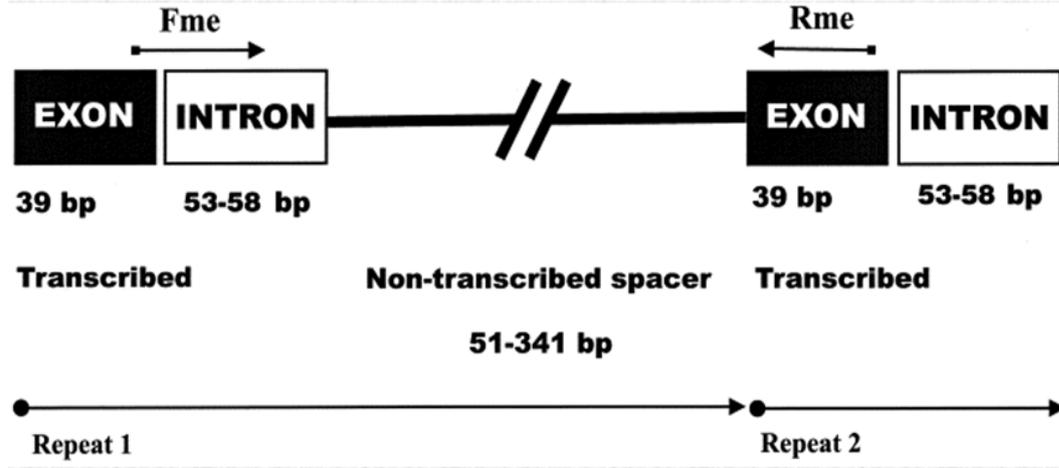
أما بالنسبة للصبغي رقم ٣ فيحتوي العنقود الأول على جين واحدة في النهاية اليسرى من الصبغي تنتسخ باتجاه القسم الطرفي، و٦٤ جين تنتسخ بعكس اتجاه القسم الطرفي. يحتوي العنقود الثاني ٢٩ جين في الاتجاه الأيمن تنتسخ أيضاً بعكس اتجاه القسم الطرفي ليكون انتساخهما بشكل متقارب. وكذلك الأمر يشبه تنظيم الصبغي رقم ٤ أيضاً تنظيم الصبغي رقم ٣ من خلال احتوائه على عنقودين من الجينات، عنقود أيسر مؤلف من ٢٠ جين وعنقود أيمن مؤلف من ٨٦ جين وذلك كما يوضح الشكل ٨. وبهذا تنتظم جميع الجينات الموجودة على الصبغيات بشكل عناقيد متعدد الجينات PGCs (٣٠) (٣١).

٣-١-٢- معالجة الرنا الرسول

كما ذكرنا سابقاً يكون الانتساخ في المثقبيات من خلال انتساخ لمجموعة من الجينات التي تجمعت بشكل عناقيد متعدد الجينات، وذلك بخلاف ما يحدث لدى أحياء حقيقيات النوى الأخرى التي يحدث لديها انتساخ لكل جين بشكل منفصل monocistronic. تحتوي معظم صبغيات المثقبيات على الأقل تجمعين للجينات يتم نسخهما بشكل متعاكس اما باتجاه telomere أو بعكس اتجاه من telomere. ترمز بشكل عام الجينات، الموجودة ضمن تجمع الجينات، الى بروتينات لاعلاقة لها مع بعضها

من حيث الوظيفة وهذا ما يختلف عن كيفية عمل operon في البكتريا والحلبيات nematodes حيث تكون البروتينات مرتبطة بالوظيفة.

يملك دنا ذوات منشأ الحركة تسلسلاً لقائد التضفير SL، Spliced leader، يسمى بالإكسون الصغير mini-exon والذي يتألف من ٣٩ نكليوتيد ويتم انتساخه من جين SL RNA gene (٣٣).



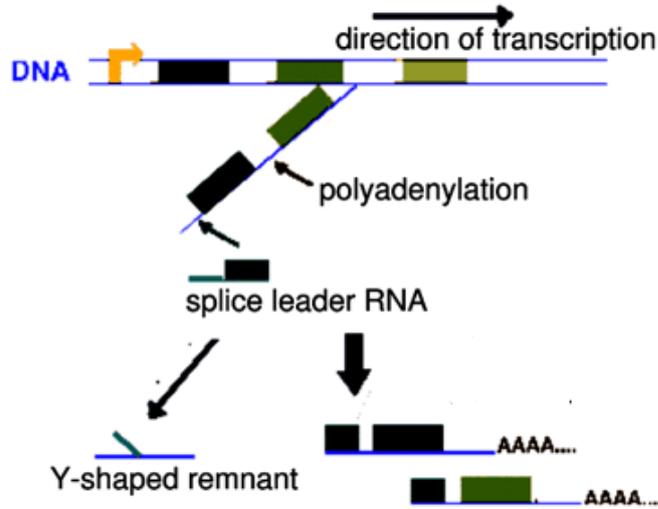
الشكل ٩. منطقة جين الإكسون الصغير mini-exon gene في الليشمانية. يتألف كل مكرر من إكسون مصان مكون من ٣٩ زوج أساس، وإنترون مصان مكون من ٥٣-٥٨ زوج أساس، ومسافة غير منتسخة متغيرة بشدة مكون من ٣٩ زوج أساس ٥١-٣٤١ زوج أساس يختلف طولها بين أنواع ليشمانية العالم الحديث. ويشير السهمان إلى موقع المشرع Fme (المشرع الأمامي) و Rme (المشرع العكسي) (٣٤).

يحتوي الجينوم على ١٠٠-٢٠٠ نسخة من جين الإكسون الصغير وتوجد هذه النسخ على كرموزوم واحد بشكل مكررات مصفوفة tandemly repeat حيث يتألف كل مكرر من ٣ مناطق رئيسية:

- منطقة منتسخة مصانة بشكل كبير ترمز إكسون يتألف من ٣٩ نكليوتيد.
- إنترون مصان ولكن بشكل أقل من الإكسون مكون من ٥٥-١٠١ زوج أساس.
- مسافة غير منتسخة متغيرة بشدة يختلف طولها حسب الجنس والنوع وهي التي يتم تضخيمها بال-PCR من أجل تشخيص الليشمانية، وتتألف من ٥١-١٣٥٠ زوج أساس (٣٥).

ينتج الرنا الرسول النووي الناضج من خضوع طليعة النسخ الأولية إلى عمليتين هما التضفير الإنتقالي trans-splicing والتذييل بواسطة إضافة الأدينين Poly A. يعكس التضفير الإنتقالي إضافة قلنسوة، عبارة عن إكسون صغير miniexon مؤلف من ٣٩ نيكلوئيد يسمى بقائد التضفير الإنتقالي Spliced leader SL الى النهاية 5' من الرنا الرسول. يحدث التضفير بواسطة تفاعلي أسترة transesterfication وذلك على غرار ما يحدث في التضفير المقرون cis-splicing، ولكن يختلفان في المرحلة الوسيطة حيث يتم ظهور شكل Y بدلا من شكل الحبل الذي ينتهي بعروة.

يتكون موقع استقبال التضفير Splice acceptor Site، SAS، من ثنائي نيكلوئيد مكون من أدينين وغوانين مسبق بعلامة أو مسار من عديد البريمدين يقع قبل كل جين صعداً Upstream وهذا المسار "أو علامة البريمدين" مسؤول أيضاً عن توجيه التذييل بعديد الأدينين للجين المجاورة. تكون عملية التضفير والتذييل مترابطتان مع بعضها البعض (٣٦).

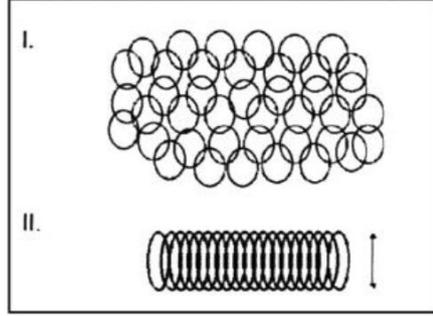


الشكل ١٠. عملية التضفير الانتقالي للحصول على الرنا الرسول الناضج mRNA، تشمل إضافة القبعة المتمثلة بقائد التضفير، والتذييل بإضافة عديد الأدينين (٣٥).

٣-٢- دنا منشأ الحركة

يمثل الدنا المتقدي في ذوات منشأ الحركة kinetoplastida ويشكل ١٠-٢٠% من الدنا الكلي. يكون دنا منشأ الحركة على شكل شبكة من دنا حلقي متسلسل يقسم

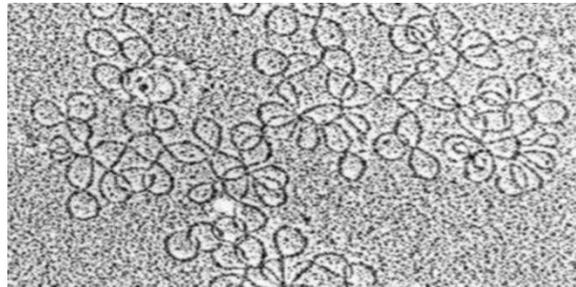
إلى صفتين: حلقات كبيرة maxcircle متجانسة، وحلقات صغيرة minicircles متغيرة. يتراوح عدد الحلقات الكبيرة بين ٢٥-٥٠ نسخة بطول 20kb تقريباً، وتتألف من أجزاء متشابهة ذات تركيب ثابت في كل أنواع الليشمانية. يبلغ عدد الحلقات الصغيرة حوالي 10000 نسخة تقريباً وتتألف من أجزاء مصانة، وأجزاء متغيرة يختلف تركيبها بين أنواع الليشمانية ويبلغ طولها 0.8 kb تقريباً (٣٧).



الشكل ١١. دنا منشأ الحركة في الزجاج (II) حيث يظهر كيفية تداخل الأقراص في الفراغ، وفي العضوية (II) ويظهر كيفية تكديس الأقراص (٣٨).

تكون الحلقات الكبيرة في الدنا المتقديري مسؤولة عن تشفير بروتينات الميتوكوندريا، غالباً أنزيمات تدخل في الحلقة التنفسية للطفيلي وتسمح بإنتاج الطاقة، وقد أثبت دورها في تحرير ثملات اليوراسيل إلى نكليوتيدات الرنا الرسول mRNA. أما الحلقات الصغيرة فترمز الرنا القائد المسؤول عن تحرير الرنا الرسول (٣٩).

تملك الحلقات الصغيرة عند طفيليات الليشمانية سمات تجعلها مسابير جزيئية مثالية لأنها توجد بعدد كبير من النسخ في دنا منشأ الحركة، وتحتوي مجالاً مصاناً بطول ١٢٠ زوج أساس تقريباً موجود في كل النسخ (٣٩).



الشكل ١٢. مظهر الحلقات الصغيرة تحت المجهر الإلكتروني (٤٠).

٤- الاستجابة المناعية تجاه طفيليات الليشمانية

٤-١- البنية المستضدية لطفيليات الليشمانية

يمكن تفسير فوعة طفيليات الليشمانية بوجود مجموعتين من مستضدات الطفيلي وهي المستضدات المفرزة أو السطحية، والمستضدات داخل الخلية. تفرز الطفيليات ضمن المضيف مجموعة من الأنزيمات الحالة للبروتين (proteases) وجزيئات أخرى تؤثر على الجهاز المناعي للمضيف، من خلايا وسيتوكينات، مما يسهل تطور العدوى. كما تمتلك هذه الطفيليات مستضدات داخل خلوية غير مفرزة، بروتينات أعضاء في عائلات بروتينية مصانة بشكل كبير، تساهم في الباثولوجيا المناعية المزمنة التي نلاحظها في داء الليشمانية. يوحي ما سبق أن الجزيئات السطحية والمفرزة قد تكون مهمة في تأسيس العدوى وحماية الطفيلي من الاستجابات المناعية الأولية للمضيف، ويمكن أن تكون الجزيئات داخل الخلية مسؤولة عن النمط الظاهري للمرض phenotype (٤١).

٤-١-١- المستضدات المفرزة والسطحية لطفيلي الليشمانية

يعتبر التنوع المستضدي للبروتينات السطحية بين أنواع طفيليات الليشمانية أمراً مسلماً به ويمكن أن يعود لتنوع سلالات الليشمانية المختلفة، وتنوع أنواع ذبابة الرمل، وتنوع المواقع الجغرافية والبلدان التي ينتشر فيها الطفيلي، وتنوع الثوي المستودع، وتنوع إلفة الأنواع المختلفة للتوضع في أعضاء معينة من الجسم. وبالتالي تختلف المستضدات والبنية المستضدية باختلاف أنواع طفيليات الليشمانية فتكون بعض المستضدات مشتركة بين الأنواع المختلفة وبعضها خاصة بأحد الأنواع أو بتحت أحد الأنواع (٤٢).

ومن أهم المستضدات السطحية

أ. الليبوفوسفوغليكان Lipophosphoglican

يعتبر الليبوفوسفوغليكان LPG من أهم الجزيئات السطحية وخاصة عند الليشمانية الكبرى *L. major* والليشمانية الدونوفانية *L. donovani*. تظهر هذه الجزيئات عند الأنواع المختلفة من الليشمانية، وفي المراحل المختلفة من دورة الحياة، اختلاف بنيوي يلعب دوراً هاماً جداً في بقاء وتطور أشكال داء الليشمانية عند كل من المضيف والناقل (٤٣).

بعد دخول المشيقيات إلى المضيف يتم استهدافها من قبل جهازه المناعي، وتمثل مكونات المصل مثل جهاز المتممة التحدي الأول للطفيلي بعد وصوله إلى المجرى الدموي. تكون المشيقيات procyclic شديدة الحساسية لتأثير المتممة على عكس المشيقيات metacyclic التي تستطيع أن تتجنب الانحلال المتواسط بالمتممة. يعود هذا الاختلاف الملحوظ إلى جزيئة الليبو فوسفو غليكان المؤلفة من وحدات متكررة من ثنائيات سكريد وفوسفات، ترتبط على سطح الطفيلي بواسطة مثبت anchor غليكوزيل فوسفاتيديل اينوزيتول. تكون جزيئة LPG أطول في مشيقيات metacyclic مما يمنع ارتباط وحيدات C5b-C9 الخاصة بنظام المتممة ويحمي هذه المشيقيات من التأثير الحال. هذا ولا يقتصر دور LPG على مقاومة المتممة إنما يلعب دوراً أيضاً في الارتباط بالخلايا الظهارية في المعى المتوسط في ذبابة الرمل والعديد من الوظائف الأخرى (٤١).

ب. Gp63

بروتين سكري، بروتياز سطحي، سائد وزنه الجزيئي ٦٣ كيلو دالتون يوجد لدى معظم أنواع الليشمانية. يعتبر من أكثر البروتينات وفرة على سطح الطفيلي، لكنه أقل ب ١٠ أضعاف من LPG. يلعب هذا البروتين دوراً في آليات انتشار الطفيلي والهروب من المناعة.

يوجد هذا البروتين في الشكل المشيقي على سطح الطفيليات تحت غطاء الـ LPG ولوحظ أنه يلعب دوراً في تكاثر مشيقيات الليشمانية دونوفانية، وفي مقاومة المتممة عند الليشمانية الكبرى والأمازونية. يحسن ارتباط Gp63 إلى مستقبلات الفيبرونيكتين دخول الطفيلي إلى البالعات، ويلعب Gp63 دوراً في بيتداز داخلي له القدرة على تخريب الغلوبولينات المناعية وعوامل المتممة والبروتينات الحالة. يعمل Gp63 بشكل مثالي بدرجة باهاء ٤، وبالتالي يظهر دوره الحال ضمن طور الليشمانات (٤٣).

ج. GIPLS غلكواينوزيتول فوسفوليبيد

بروتين منخفض الوزن الجزيئي تم توصيفه عند كل من الليشمانية الكبرى والليشمانية دونوفانية حيث يوجد في كلا الشكلين المشيقي والليشمانية. يوجد على سطح الطفيلي وكميته أكبر ب ١٠ مرات من LPG، إلا أنه مثل Gp63 يوجد تحت غطاء LPG. يلعب دوراً في حماية الطفيلي لأنه يعدل التعبير عن أنزيم nitric oxide

synThetase في بالعات الخلايا الفأرية. توجد اختلافات جوهريّة في بنية هذا البروتين بين أنواع وسلالات الليشمانية ومراحل تطور هذه الطفيليات (٤٤).

د. GP46/M2/PSA-2

بروتين سكري معقد مكون من ثلاثة بولي بيبتيديات متميزة تتوضع على غشاء الشكل المشيقي وتثبت عليه بواسطة غليكواينوزيتول فوسفوليبيد. يتم التعبير عنه في كافة أنواع الليشمانية باستثناء الليشمانية البرازيلية. يتم التعبير عن GP46 بشكل أكبر في طور الليشمانات مقارنة بمشقيات الليشمانية التي تستقر بشكل مبدئي في المعى المتوسط للجهاز الهضمي لذبابة الرمل. هذا وتستقر أنواع من معقد الليشمانية البرازيلية في المعى الخلفي للجهاز الهضمي للذبابة مما يقترح امتلاك هذا البروتين لدور في توضع الطفيلي ضمن الناقل (٤٥).

ومن المستضدات المفترزة عند طفيليات الليشمانية نذكر الفوسفاتاز الحامضية وهي مجموعة من أنزيمات الحلمة التي يعتقد بأنها تساهم في مقاومة الطفيلي للقتل بواسطة المضيف، وفي الآلية الإمراضية للطفيلي، وتغذية الطفيلي. تم اكتشاف فعالية للفوسفاتاز الحامضية المفترزة (SAP) في السائل الطافي لمستنبتات عدة أنواع من الليشمانية مثل الليشمانية دونوفانية، والليشمانية الطفلية، والليشمانية الشاغاسية، والليشمانية الأثيوبية، والليشمانية المدارية، والليشمانية البانامية، والليشمانية الأمازونية، ولكن لم تكتشف فعالية واضحة عند كل من الليشمانية الكبيرة و الليشمانية L.tarentolae (٤٦).

بينت دراسة هندية امتلاك مشقيات وليشمانات الليشمانية الكبيرة لجليكوبروتين يشبه الموسين Mucin like glycoprotein مرتبط على سطح كلا الشكلين الليشمانى والمشيقي ويسمى "ppgs" proteophosphoglycan وهو عبارة عن بروتين مفرز (٤٧).

من البروتينات الأخرى المثيرة للاهتمام نذكر السيستئين بروتياز الذي ترتبط بتطور المرض عند الإصابة بالليشمانية المكسيكية. يمكن أن نلاحظ فعالية لهذه الأنزيمات إما على سطح الطفيلي، أو داخل البالعات حيث تقوم هذه البروتينات بتنشيط السيتوكين IL-12 وتلعب دوراً في تثبيط جزيئات معقد التوافق النسيجي في البالعات. ولا بد من الإشارة إلى وجود بروتينات مفرزة أخرى تملك خواصاً استمناعية (٤٨).

٤-١-٢- المستضدات غير المفرزة (داخل الخلية)

تفترح دراسات المناعة الخلوية أن هناك تحرراً ثابتاً لهذه المستضدات خلال الخمج، تتولد هذه المستضدات من الطفيليات إما بتحطيم الليشمانات داخل الخلية بواسطة البالعات المفعلة، أو تحطيم الليشمانات التي تتحرر من البالعات، أو من الإنحلال العفوي للليشمانات داخل الخلايا المصابة (٤١).

من البروتينات داخل الخلية والمولدة للمناعة نذكر بروتينات الصدمة الحرارية والبروتينات الريبوزومية والهيستونات. يطلق على هذه البروتينات المصانة بشكل كبير والقدرة على إحداث رد فعل مناعي قوي اسم Panantigens حيث تحفز هذه البروتينات إنتاج مستويات مرتفعة من الأضداد (٤١).

٤-٢- الاستجابة المناعية في داء الليشمانيات الجلدي الفأري

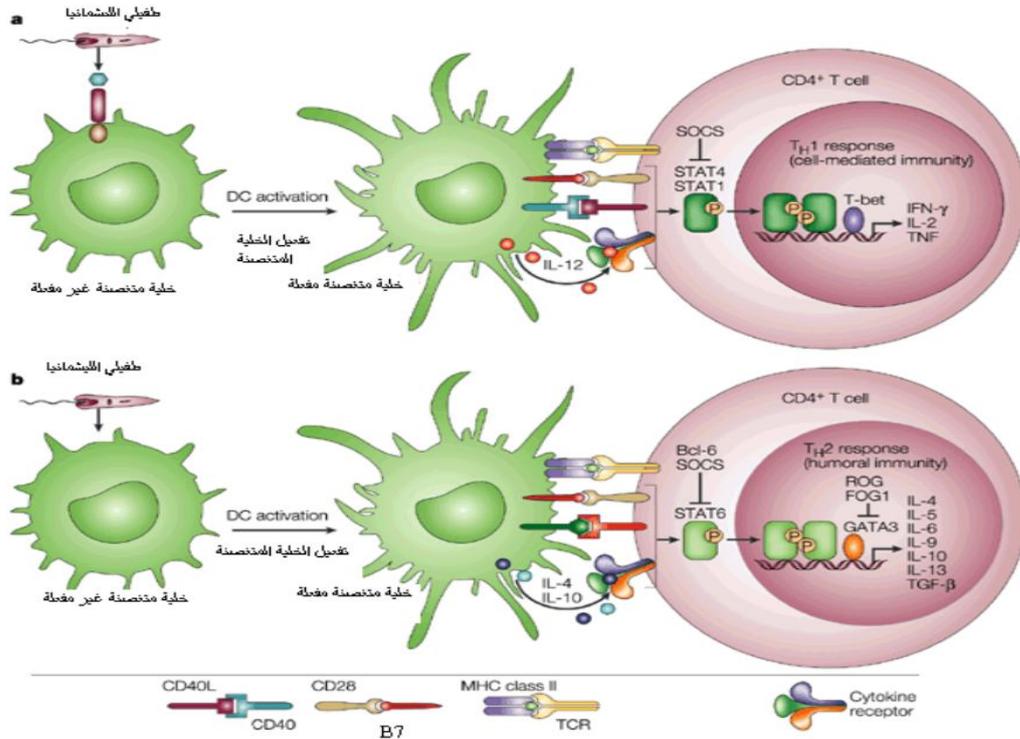
استخدمت عدة نماذج حيوانية، مثل القرود والكلاب والهامستر، لدراسة هذه الاستجابة في داء الليشمانيات الحشوي والجلدي. لكن كلفتها ونقص الكواشف اللازمة أعاق استخدام هذه النماذج الحيوانية، وأدى إلى استبدالها بفئران التجربة التي تحقق الشروط المثلى لدراسة الاستجابة المناعية ودراسة العلاقة بين المضيف والطفيلي (٤٩).

٤-٢-١- الاستجابة الخلوية ونمط اللمفوكينات المتولدة

بما أن طفيليات الليشمانية تعيش داخل الخلايا يفترض أن تكون الاستجابة المناعية الخلوية غير فعالة تجاهها، وهذا ما أكدته تجارب عديدة أظهرت أن تطور المرض لا يتبدل في الحيوانات التي تم استنفاذ الخلايا البائية منها. أظهرت التجارب تطور الإصابة بداء الليشمانيات لدى الفئران التي استؤصلت منها غدة التوتة، بشكل مماثل للفئران الشاهدة، مما يبرهن أن المناعة تجاه الليشمانية تنظمها الخلايا التائية (٥٠).

أثبتت الدراسات وجود تحت مجموعتين من اللمفاويات التائية TCD4+ المساعدة تسميان الخلايا التائية المساعدة من النمط الأول Th1، والخلايا التائية المساعدة من النمط الثاني Th2. تمارس هذه الخلايا وظائف مختلفة تتمثل بإنتاجها لسيتوكينات مختلفة. تفرز الخلايا Th1 الانترفيرون غاما IFN- γ ، وعامل النخر الورمي TNF α ، والانترلوكين IL-12 التي تسهم وخاصة IFN- γ في تحريض البالعات على قتل الطفيلي عبر تشكيل

أوكسيد النتریک NO. أما الخلايا Th2 فنتج مجموعة من السيتوكينات تشمل IL-4، IL-5، وIL-10، وIL-13 التي تثبط تشكيل NO المسؤول عن قتل الطفيليات داخل البالعات وبالتالي تمنع التخلص من الطفيلي (٥١) (٥٢).



الشكل ١٣. تمايز الخلايا التائية غير المتمرسة Th0، ترمز DC للخلايا التغصنية و STAT لعوامل الانتساح. تمتلك الخلايا المقدمة للمستضد المستضدات التالية CD40، والبروتين B7، والمعقد MHCII التي ترتبط على التوالي مع المستقبلات الموافقة التالية CD40L، وCD28، وTCR الموجودة على الخلايا التائية (٥٢).

تشفى الفئران المقاومة، مثل C57BL/6، بشكل عفوي بعد تطور الإصابة الجلدية وتطور لديها مقاومة لإصابة جديدة. تتطور الإصابة عند الفئران الحساسة، مثل BALB/C، ولا تشفى عفويًا. يظهر تحليل الرنا الرسول mRNA المأخوذ من الغدد اللمفية للفئران المصابة أن الفئران الحساسة تعبر عن الرنا الرسول mRNA الذي يرمز للأنترلوكينين IL-4 وIL-10، بينما تعبر الفئران المقاومة عن الرنا الرسول mRNA الذي يرمز للـ IFN-γ وIL-12 (٥٣) (٥٤) (٥٥).

بينت الدراسات وجود علاقة بين نمط اللمفوكينات المنتجة ومقاومة داء الليشمانيات حيث تؤدي مثلاً معالجة الفئران الحساسة بالأضداد وحيدة النسيلة للانترلوكين IL-4، بعد حقنها بطفيليات الليشمانيات الكبرى، إلى تحفيز تطور خلايا من النمط Th1 والشفاء. كما أدت معالجة الفئران المقاومة وراثياً المحقونة بطفيليات الليشمانيات الكبرى أيضاً، بالأضداد وحيدة النسيلة لكل من IFN- γ و IL-12، إلى تطور الخلايا Th2 وتحويلها لفئران حساسة للإصابة. وبالتالي يعتبر IL-4 هام لتطور الخلايا Th2، بينما يعتبر IFN- γ أو IL-12 ضروريان لتطور الخلايا Th1 (٥٦). لا تزال آليات تمايز كل من Th1 عند الفئران المقاومة و Th2 عند الفئران الحساسة غير مفهومة تماماً، وقد تعود إلى فرق في نمط السيتوكينات المفترزة نتيجة التماس مع المستضد، أو اختلاف نمط الخلايا المقدمة للمستضد، أو اختلاف المستضد بحد ذاته (٥٧).

❖ دور IL-12 و IFN- γ و TNF α و IL-18 :

يعتبر IL-12 من أهم السيتوكينات المفترزة في المراحل المبكرة من الإصابة (٥٨) حيث يفرز من قبل الخلايا المقدمة للمستضد، مثل البالعات الكبيرة والخلايا التغصنية (٥٩) ، وهو ضروري لتوجيه الاستجابة المناعية إلى استجابة من نمط Th1. هذا وبينت الدراسات أن الانترلوكين IL-18 له دور مكمل لل IL-12، حيث تتعزز المقاومة عند الفئران BALB/C المعالجة بتراكيز منخفضة من IL-12 عند حقنها ب IL-18 (٦٠).

تعتمد المناعة الفعالة ضد الليشمانيات على إنتاج IL-12 لأنه يحرض إنتاج IFN- γ من الخلايا NK والخلايا التائية T، حيث يلعب IL-12 بدوره دوراً أساسياً في المناعة الفعالة. بينت التجارب في الزجاج *in vitro* التأثير التآزري لكل من IFN- γ و TNF α ، على تحريض البالعات لإنتاج جذور حرة نثرية قاتلة للطفيلي (٦١) (٦٢) (٦٣). كما يلعب IFN- γ في الأوساط الحية *in vivo* دوراً هاماً في قتل الطفيلي حيث يتوسط إنتاج NO و NO2 في البالعات مما يدعم عملية القتل والتخلص من الطفيلي (٦٤).

❖ دور IL-4 و IL-13 :

يلعب IL-4 دوراً سلبياً في تكوين مناعة فعالة ضد الليشمانيات لأنه يمنع التأثيرات الجيدة لل IFN- γ مثل تنشيط البالعات وتعزيز إنتاج الأضداد من قبل الخلايا للمفاوية B (٦٥). تؤدي معالجة الفئران الحساسة بأضداد IL-4 عند بداية الخمج بطفيليات الليشمانيات

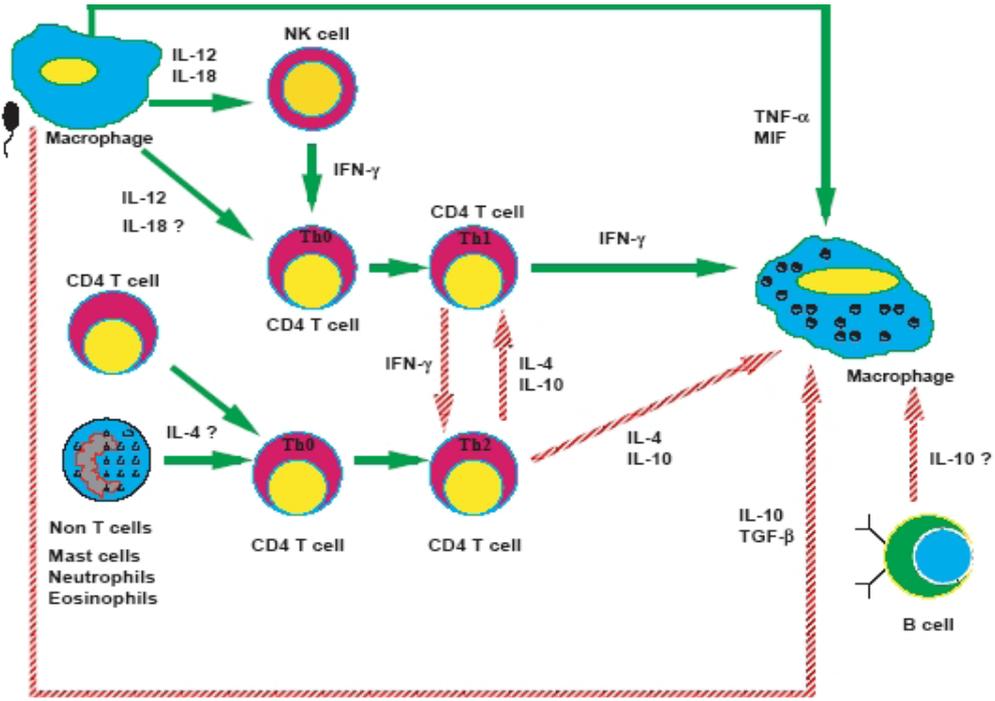
الكبرى، إلى تثبيط الاستجابة Th2 عندها مما يسمح بتطور استجابة Th1 وبالتالي تصبح الفئران مقاومة للخمج. يؤكد ما سبق أن IL-4 يعمل كموجه للاستجابة المناعية إلى استجابة من نمط Th2، وهو تأثير معاكس لعمل IL-12 الذي يؤدي إلى تطور استجابة من النمط Th1 (٦٦) (٦٧). كذلك يبدو أن IL-4 يؤدي إلى التراجع عن التعبير عن IL-12 و IFN- γ وعن مستقبل IL-12 وكذلك يثبط إنتاج NO ضمن البالعات (٦٠)، ويؤكد ماسبق شفاء فئران BALB/C المخموجة بالليشمائية الكبرى عند معالجتها بأضداد IL-4 (٥٥).

يلعب الانترلوكين IL-13 دوراً بديلاً عن IL-4 في توجيه الاستجابة المناعية نحو نمط Th2 (٦٨). حيث يؤدي إحداث طفرة، تؤدي إلى زيادة التعبير عن IL-13 عند فئران C57BL/6 المقاومة والمخموجة بطفيليات الليشمائية الكبرى، إلى تثبيط التعبير عن IL-12 وعن IFN- γ وتحول الفئران إلى فئران حساسة حتى في حال غياب التعبير عن IL-4 (٦١).

❖ دور IL-6 و IL-10 و TGF- β :

بينت الدراسات امتلاك خلايا CD4+ دوراً واضحاً في المناعة الأولية، مما يسمح للفئران C57BL/6 بمقاومة الإصابة عند إخماجها بطفيليات الليشمائية الكبرى. هذا وتفرض البالعات مجموعة من السيتوكينات، مثل IL-6 و IL-10 و TGF- β ، التي تقلل من فعالية البالعات في قتل الليشمائية وتنقص التعبير عن IL-12 مما يؤدي إلى تفاقم الإصابة (٥٩).

في جميع الحالات لا يمكن للفئران التخلص من الطفيلي بشكل كامل حتى المقاومة منها حيث يبقى الطفيلي موجوداً بشكل كامن (٦٢) (٦٨). بينت الدراسات الدور المهم ل IL-10 في بقاء الطفيلي كامناً، حيث تماثل الفئران المعوزة ل IL-10 بمفرده إلى الشفاء بشكل كامل من دون أن يتبقى لديها أي طفيلي حي. يتم إفراز IL-10 من البالعات الكبيرة، والخلايا المنظمة CD25 Treg، والخلايا المساعدة CD4 (٦٨).



الشكل ١٤. السيتوكينات والخلايا التي تتدخل في الاستجابة المناعية عند الإصابة بداء الليشمانيات الجلدي الفأري (٦٠).

٣-٤- الاستجابة المناعية لدى الإنسان تجاه طفيلي الليشمانيات

تتعرض المشيقات منذ لحظة دخولها إلى المضيف نتيجة لدغة الذبابة، للقتل نتيجة آلية انحلالية تتوسطها بروتينات المتممة. لكن تبين امتلاك لعاب ذبابة الرمل على عدة بروتينات تسمح للمشيقات بمقاومة الظروف الموجودة حيث تزيد من سرعة حضور الخلايا البلعمية phagocytes إلى موضع اللدغ وتنشط فعالية المواد التي تفرزها هذه الخلايا (٦٩).

تتم بلعمة المشيقات، التي لم تتخرب من قبل العدلات neutrophils، بشكل نوعي بواسطة مستقبلات تعرف النمط pattern recognition receptors. تعتبر العدلات من أول الخلايا المناعية التي تهاجر إلى مكان العدوى حيث تمتلك نصف عمر قصير يتراوح بين ٦-١٠ ساعات ثم تتعرض عفويًا للاستماتة spontaneous apoptosis. تساهم جزيئات LPG بتنشيط عملية الاستماتة وبقاء العدلات الحاوية على الطفيليات حية لمدة يومين. يسمح تحول المشيقات إلى ليشمانيات بوقف تأثير عملية الهبة التنفسية

respiratory burst مما يضمن بقاؤها حية داخل العدلات (٧٠). بعد ذلك تتعرض العدلات المخموجة للاستماتة وتفرز بروتين MIP-1b ، macrophage inflammatory protein 1b، الذي يجذب البالعات إلى مكان العدوى لتقوم ببلعمة العدلات المخموجة المستموتة. تتم بلعمة البالعات للعدلات بدون وساطة مستقبلات على سطح البالعات، مما يؤمن دخول صامت silent entry للطفيلي إلى داخل البالعات. تؤدي بلعمة العدلات المخموجة إلى زيادة إنتاج السيتوكينات المضادة للإلتهاب، مثل TGF- β و IL-10، التي تقلل من قدرة البالعات على قتل الطفيلي وتتنقص تعبير البالعات عن IL-12 و TNF-a مما يعطي فرصة لليشمانات بالتضاعف داخل البالعات (٧١).

أما بالنسبة للمشيقات التي لم تتم بلعمتها من قبل العدلات فتتم بلعمتها عن طريق تفعيل السبيل البديل لبروتينات المتممة. يبدأ هذا السبيل بتثبيت المكون الثالث C 3 على سطح الطفيلي، يرتبط مع جزيئة GP63 وجزيئة LPG، ثم ينشط C 3 إلى مركبين يرتبطان مع مركبان موجودان على سطح البالعات، المركب C3b الذي يرتبط مع مستقبله CR1 والمركب C3bi الذي يرتبط مع مستقبله CR3 (٧٢).

يعد هذا المستقبل CR3 أحد مكونات المعقد Mac-1، macrophage-1 antigen، الذي يتألف بشكل أساسي من CD 18، و CD11b. وتشير الدراسات إلى عدم قدرة الأضداد وحيدة النسيلة المضادة لمستقبل CR3 على تثبيط ارتباط الطفيليات بالبالعات بشكل كامل، مما يشير إلى امتلاك البالعات لمستقبلات أخرى للطفيلي ما زالت غير معروفة. أكدت دراسات عديدة ارتباط طفيليات الليشمانية مع عدة مستقبلات معروضة على سطح البالعات ومنها مستقبل fc receptor، ومستقبل mannose-fucose receptor، ومستقبل CR1 receptor، ومستقبل lectin-like receptor، ومستقبل fibronectin receptor (٦٠).

بعد أن ترتبط المشيقات بمستقبلات متعددة على سطح الخلايا البالعة تدخل إليها بالبلعمة Endocytosis. وبالتالي يصبح الطفيلي ضمن فجوة هاضمة تسمى اليبلوع Phagosome حيث يكون محاطاً بجزء من الغشاء البلازمي للخلية البالعة. بعد ذلك تندمج اليحاليل Lysosomes مع هذا اليبلوع مشكلة يباليع يحلوية Phagolysosomes. يتطلب بقاء المشيقات حية داخلها وجوب أن تتحول إلى

ليشمانات، وأن تخضع لتغيرات في الشكل وتغيرات استقلابية تسمح بالتكيف مع الوسط الحمضي داخل الفجوة، ولتغيرات في التركيب الكيميائي لعشاء الخلية (٧٣). تسمى هذه المرحلة من العدوى بالطور الصامت phasesilent وتدوم بين ٤-٥ أسابيع بعد العدوى وتتميز بعدم ظهور الإصابة الجلدية (٧٤).

تتكاثر الليشمانات داخل البالعات حيث تصل إلى أعداد كبيرة مما يؤدي إلى انفجار البالعات وتحرر الليشمانات منها والتي تقوم بدورها بإخماج بالعات أخرى. في الحقيقة لا تتوفر الكثير من المعلومات المتعلقة بآلية دخول الليشمانات إلى البالعات مع أنها مرحلة مسؤولة عن الأمراض (٧٥).

أكدت دراسة أن استخدام أضداد مستقبل CR3 يؤدي إلى تثبيط بلعمة الليشمانات من قبل البالعات في الفئران BALB/c الممخوجة بالليشمانية الكبرى (٧٦). كما أدى إخماج فئران BALB/c معدلة وراثياً تعاني من عوز الخلايا البائية B، وفئران تفتقر للسلسلة γ للمستقبل Fc، بليشمانات طفيليات الليشمانية المكسيكية إلى تطور آفات جلدية ولكن بشكل ضعيف جداً مما يؤكد أهمية كل من المستقبل Fc والمستقبل CR3 في بلعمة الليشمانات وحدوث الخمج (٧٧).

بعد انفجار البالعات وتحرر الليشمانات منها تتدفق أعداد أكثر من البالعات والخلايا الالتهابية مثل العدلات والحمضات والخلايا البدنية إلى مكان العدوى وتزداد السيتوكينات قبل الالتهابية proinflammatory cytokines التي تفرزها البالعات الممخوجة مثل TNF- α . تفعل السيتوكينات السابقة البالعات لقتل الطفيلي وذلك من خلال تحريضها على إنتاج أكسيد النترريك NO في البالعات وزيادة فعالية إنزيم NADPH oxidase وبالتالي إنتاج المزيد من الوسائط الأوكسجينية الفعالة " ROS " reactive oxygen species. تؤدي هذه الوسائط الفعالة، NO و ROS، إلى قتل وتخريب طفيليات الليشمانية التي تمت بلعمتها.

في حين تمتلك البالعات آلية دفاعية متعددة ضد الأجسام الغريبة داخلها، تمتلك طفيليات الليشمانية أيضاً استراتيجيات دفاعية تمكنها من مقاومة تلك الآليات والعيش في محيط عدائي جداً ضمن البيولوج – اليحلولي في البالعات. كما يتمكن الطفيلي من المحافظة على قيمة pH معتدلة لوسطه الداخلي وقد يعود ذلك إلى وجود مضخات بروتون proton

pumps على غشاء الطفيلي في كلا الطرفين، تعمل على ضخ البروتونات خارج الطفيلي. تتحول المشيقات التي تمت بلعمتها إلى الليشمانات حيث يترافق هذا التحول مع ذهاب جزيئات LPG من سطح المشيقات إلى سطح البالعات المخموجة. يترافق ما سبق مع تثبيط جزيئات LPG للهبة التنفسية وتفاعل الحلمة التي تقوم بها أنزيمات الليزوزوم وذلك من خلال مخلبة الكالسيوم، وتثبيط فعالية أنزيم البروتين كيناز C. يعتمد بقاء الليشمانات على قيد الحياة داخل البالعات على التوازن بين كفاءة الاستجابة المناعية للإصابة من جهة وقدرة الطفيليات على مقاومة التأثير القاتل للأحياء الدقيقة microbiocidal داخل البالعات اليحلولية في البالعات (٧٨)(٧٩).

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

تلعب البالعات والخلايا التغصنية، وهي من الخلايا المقدمة للمستضد، دور صلة الوصل بين المناعة الخلقية والمناعة التلاؤمية. كما تلعب دوراً هاماً في التعرف على المشيقات المحقونة نتيجة لدغة 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 الملائمة (٨٠). تتواكب هذه الهجرة مع نضج الخلايا المقدمة للمستضد ويترافق ذلك مع دخول جزيئات معقد التوافق النسيجي من الصنف الثاني MHCII بالنسبة للبالعات ، وجزيئات معقد التوافق النسيجي من الصنف الأول والثاني بالنسبة للخلايا التغصنية إلى البياليع الحاوية على الليشمانات.

يرتبط المعقد MHC مع الببتيدات الناتجة عن تخريب الليشمانات، نتيجة تأثير الأنزيمات الحالة، فتتشكل جزيئات المعقد المرتبطة بالببتيدات والتي تنتقل نحو الغشاء الخارجي للخلايا المقدمة للمستضد. يؤدي انتشار الجزيئات السابقة على سطح الخلايا المقدمة للمستضد إلى تنبيه مباشر للخلايا التائية وذلك نتيجة امتلاك الخلايا التائية لمستقبلات TCR تستطيع أن تتعرف على المعقد ببتيدي-MHC وبالتالي الإرتباط معها (٨١). يؤدي تعرف المستقبلات TCR للخلايا التائية على المعقد ببتيدي-MHC

الموجود على سطح الخلايا المقدمة للمستضد، إلى حدوث استجابة مناعية تبدأ عندما تُظهر الخلايا المقدمة للمستضد إشارات 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 وهو مستقبل غشائي نوعي على سطح اللمفاويات التائية. يعتبر ارتباط مستقبل الخلية التائية TCR مع المعقد ببنتيد - MHC، وارتباط الجزيء B7 مع المستقبل ضرورياً لكي تظهر الخلايا التائية الاستجابة المثلى (٨٢). يمكن أن يؤدي غياب الإشارة B7 المساعدة إلى عجز الخلية التائية عن الإستجابة للمستضد. يؤدي استقبال الخلية التائية السانجة للإشارة المزدوجة إلى تفعيلها، وبالتالي تتمايز 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 السيتوكينات وفقاً لنوعها. تقسم الخلايا التائية المساعدة إلى تحت مجموعتين الخلايا Th1 والخلايا Th2، تمارسان وظائف مختلفة نتيجة إنتاجهما لسيتوكينات مختلفة. يحرض IL-4 المنتج من قبل الخلايا التغصنية الخلايا التائية من نمط Th 2 على إفراز مجموعة من السيتوكينات، تشمل IL-4 و IL-5 و IL-10 و IL-13، التي تثبط تشكيل NO المسؤول عن قتل الطفيليات داخل البالعات وبالتالي تمنع قتل الطفيليات والتخلص منها. يحرض IL-12، المنتج من قبل الخلايا التغصنية، الخلايا التائية من نمط Th1 على إفراز IFN- γ و IL-2 و TNF α حيث تسهم السيتوكينات السابقة وخاصة الانترفيرون غاما في تحريض البالعات على قتل الطفيلي عبر تشكيل NO. يتم أيضاً تحريض إفراز الخلايا التائية للسيتوكينين IL-2 و IFN- γ نتيجة لتأثير IFN- γ المنتج من قبل الخلايا الطبيعية القاتلة NK والتي تسهم أيضاً بزيادة التعبير عن مستقبلات IL-12 على سطح الخلايا التائية الفعالة (٥٧) (٨٣)

تجول الخلايا التائية الذاكرة المركزية في النسيج اللمفية لتستجيب بسرعة في حال تعرض الجسم للعامل الممرض مرة أخرى. وكذلك الأمر بالنسبة للخلايا البائية الذاكرة فيتم تنشيطها في العقد اللمفية، بعد ارتباطها بالخلايا التائية والخلايا التغصنية، لتهاجر بعدها إلى مكان العدوى وتتمايز إلى الخلايا البلاسمية لتنتج الأضداد (٨٤). تتعرض الخلايا التغصنية بعد قيامها بتفعيل اللمفاويات، الخلايا التائية CD+4 والخلايا التائية السامة CD+8

والخلايا البائية، للاستماتة (٨٥). تتفاقم الإصابة الجلدية في هذه المرحلة من العدوى حيث تظهر في مكان العدوى الخلايا البائية CD+19 والغلوبولينات المناعية IgG والخلايا التائية المساعدة CD+4 والسامة CD+8 (٨٦).

تعتبر الغلوبولينات المناعية IgG ضرورية لتهيئة الطفيلي والارتباط مع المستقبل Fc الموجود على سطح البالعات والخلايا التغصنية. فقد أدى إخماج فئران C57BL/6 تعاني من عوز الخلايا البائية وتفترق إلى السلسلة غاما للمستقبل Fc، بطفيليات الليشمانية الكبرى، إلى نقص في أعداد الخلايا التغصنية المصابة بالطفيلي في مكان العدوى، ونقص في إنتاج IFN- γ من الخلايا التائية، وتحول الفئران من فئران مقاومة إلى فئران حساسة للإصابة. يؤكد ما سبق أهمية IgG في بلعمة الخلايا التغصنية للطفيلي وتطور مناعة فعالة ضد طفيلي الليشمانية (٨٧).

تترافق حالات الشفاء من الإصابة الجلدية مع غلبة الخلايا المنتجة لـ IFN- γ بينما تترافق حالات عدم الشفاء مع غلبة الخلايا المنتجة لـ IL-5 و IL-4. أما بالنسبة للطور المزمن من الإصابة فقد لوحظ استجابة مختلفة تنجم عن التأثير المشترك لكل من خلايا Th1 و Th2 وتترافق مع زيادة في إنتاج 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 TNF- β و IL-1. وقد تبين أن IL-10 يلعب دوراً هاماً في بقاء الطفيلي في حالة كمون، ويعتبر بقاء الطفيلي بشكل كامن في الخلايا التغصنية هاماً جداً لاستمرار بقاء الخلايا التائية الذاكرة. تماثلت الفئران المعوزة لـ IL-10 بمفرده، أو المعوزة لكل من IL-4 و IL-1، إلى الشفاء بشكل كامل من الطفيلي ولم يبقى لديها أي طفيلي حي، كما تم التخلص من كامل الطفيليات عند الفئران C57BL/6 المعالجة أثناء الطور المزمن بأضداد مستقبل IL-10 (٨٨).

٥- لقاحات الليشمانية

٥-١- القواعد المتبعة في تسجيل اللقاحات

يتطلب اعتماد أي لقاح، وفقاً لتوصيات منظمة الصحة العالمية WHO، أن يجتاز مراحل تجارب الطور الأول والثاني والثالث والرابع.

- تجارب الطور الأول

تهدف إلى تقييم الأمان والقدرة الاستمناعية للقاح من خلال المقارنة بين المجموعة الملقحة والمجموعة الشاهدة.

- تجارب الطور الثاني

تسمح بالتحقق من قدرة اللقاح على تأمين الحماية ضد إصابة مفتعلة.

- تجارب الطور الثالث

تسمح بتحديد فعالية اللقاح ضد إصابة طبيعية. حيث تطبق تجارب هذه الأطوار على حيوانات التجربة وهي الفأر ومن ثم القرد بالنسبة لليشمانيّة الجلدية والفأر ومن ثم الكلب بالنسبة لليشمانيّة الحشوية. وبعد ذلك تطبق بأطوارها الثلاثة على البشر حيث تجرى التجارب السابقة على عدد محدد من الأشخاص قد يصل عددهم إلى ألف شخص. فإذا تجاوز اللقاح هذه المراحل الثلاث بنجاح فإنه يمكن أن يُسجّل ويُصنّع ويستخدم في تجارب الطور الرابع (٨٩).

- تجارب الطور الرابع

يطبق على عدد أكبر من الأشخاص يتراوح بين ١٠٠٠٠٠-١٠٠٠٠٠٠ شخص. هذا ويستخدم مصطلح Vaccine efficacy "VE"، للتعبير عن فعالية اللقاح المدروس (٨٩).

٢-٥- مواصفات اللقاح المثالي

يجب أن يتمتع اللقاح المثالي لليشمانيّة بمجموعة من الصفات حيث يجب أن يكون آمناً، وأن يؤدي التلقيح بعدد قليل من الجرعات منه إلى تشكيل مناعة طويلة الأمد ضد معظم أنواع الليشمانيّة، وأن يكون خالياً من المنتجات الحيوانية التي عادة ما تستخدم في التصنيع، وأن يتوفر بأقل كلفة ممكنة.

يشكل الوصول إلى لقاح لداء الليشمانيات حالة مميزة وفريدة بالنسبة لأبحاث تطوير اللقاحات ويعود ذلك لسببين :

١. ينجم هذا الداء من أنواع مختلفة من طفيليات جنس الليشمانية التي تمتلك درجة كبيرة من التشابه وبالتالي يمكن أن يؤدي تطوير لقاح للوقاية من أحد الطفيليات إلى الوقاية من الإصابة بباقي أنواع طفيليات جنس الليشمانية.
٢. بالإضافة إلى امكانية أن يستخدم هذا اللقاح في الوقاية والمعالجة أيضاً (٨٩).

٣-٥- تطور لقاحات الليشمانية

أشارت الأدلة إلى ان معظم الأشخاص الذين تعرضوا مسبقاً للإصابة بالليشمانية كانوا مقاومين عند تعرضهم للإصابة مرة أخرى، مما أعطى مبرراً قوياً لتطوير لقاح لليشمانية. على الرغم من عدم توافر أي لقاح مرخص لأي نوع من داء الليشمانيات للاستخدام البشري، فإنه من الممكن نظرياً تطوير لقاح فعال تجاه عدة أنواع من هذا الداء. يتميز داء الليشمانيات، مقارنة مع بقية الامراض الطفيلية، بأنه يمكن للقاح ان يوفر الحماية والعلاج تجاه عدة أنواع من طفيليات الليشمانية. يمكن تقسيم عملية تطوير اللقاحات إلى خمسة مراحل: الإكتشاف، والمرحلة قبل السريرية، والمرحلة السريرية، والتسجيل، والتقييم بعد التسويق (٤).

٤-٥- لقاحات الليشمانية الحية (Live Leishmania vaccine (Leishmanization,)

LZ

من المتعارف عليه منذ العصور القديمة في غرب وجنوب غرب آسيا أن الشفاء من داء الليشمانيات الجلدي يعقبه مناعة قوية تجاه المرض لذلك كانوا يقومون بتلقيح الأطفال الأصحاء بنضحات من آفات نشطة في أماكن غير مكشوفة لإحداث آفة تشفى ذاتياً وبالتالي تولد حماية من الإصابة بالوجه أو مناطق أخرى مكشوفة من الجسم. دعيت هذه العملية فيما بعد بالشمنة LZ، Leishmanization، وهو الإجراء الذي يتم بواسطته تحريض عدوى أولية لدى أشخاص أصحاء عن طريق تلقيحهم بطفيليات ليشمانية حية مفعوة في مناطق غير مكشوفة من الجسم (٤). تعتبر الشمنة في الوقت الحاضر الإجراء التمنيحي الناجع تجاه داء الليشمانية الجلدي المحدث بالليشمانية الكبيرة Leishmania major عند الإنسان (١). تم الحصول على مشيقات الليشمانية الكبيرة بعد قيام العالمان Manceam و Nicole بتحضير وسط خاص يسمح بنمو الأشكال المتحركة لهذه الطفيليات.

بدأت أول حملة تلقيح باللشمنة في أوزبكستان عام 1967، حيث تم استخدام مزيج من المشيقات الحية والمقتولة للتقليل من الفوعة ولا يزال يستخدم هذا اللقاح في أوزبكستان. تم استخدام اللشمنة في إيران في الثمانينات وفي فلسطين المحتلة في السبعينيات للوقاية من داء الليشمانيات ولكنه لا يستخدم حالياً في أي منهما. تم إيقاف برنامج اللشمنة في فلسطين المحتلة بسبب فقدان قدرة الطفيليات المستخدمة على إحداث العدوى، نتيجة تكرار الزرع الثانوي Subculturing، وبسبب التثبيط المناعي الذي أدى إلى تناقص الاستجابة تجاه لقاحات الديفتريا والكزاز والسعال الديكي عند الأطفال الذين خضعوا للشمنة (١).

تم في إيران التوصل إلى نسبة وقاية ٨٠% في التجارب التمهيدية للشمنة وبالتالي تم تمنيع مليوني شخص أغلبهم من الجيش قبل انتقالهم إلى المناطق الموطونة بالليشمانية أثناء حرب العراق وإيران. لكن على الرغم من نجاعة برنامج التلقيح باللشمنة فقد تم إيقاف العمل به في إيران عام ١٩٨٦ وذلك بسبب بعض المضاعفات عند عدد قليل من الحالات كتطور آفات طويلة الأمد غير قابلة للشفاء (١).

حالياً يوجد لقاح وقائي واحد من طفيليات الليشمانية الحية وهو قيد الاستعمال في أوزبكستان. يتألف هذا اللقاح من مزيج من طفيليات، لنوع الليشمانية الكبيرة، حية مفوعة وطفيليات مقتولة. تم عزل الطفيلي من آفات نشطة لإنتاج اللقاح سنوياً لتخطي مشكلة خسارة الفوعة. قادت السلبيات التي ذكرناها أعلاه إلى التوجه نحو استخدام طفيليات ليشمانية مقتولة كلقاحات (٤).

٥-٥- لقاحات الجيل الأول

٥-٥-١- طفيليات ليشمانية كاملة مقتولة Whole killed parasites

شكلت الطفيليات المقتولة منذ ثلاثينات القرن الماضي أسلوباً فعالاً للحصول على لقاحات علاجية ووقائية. تظهر نتائج التلقيح على الكلاب أنه وبالرغم من المخاطر العديدة المتولدة عن هذه اللقاحات، إلا أنها تعد من أفضل استراتيجيات التلقيح. تمتاز هذه اللقاحات بثلاثة صفات أساسية :

- ١- تحرض استجابة مناعية متواسطة بالخلايا التائية من النمطين $CD4^+$ و $CD8^+$. حيث تتطلب هذه الاستجابة معالجة وتقديم كلا النوعين من المستضدات الداخلية والخارجية للطفيلي عن طريق جزيئات MHC-I و MHC-II .
 - ٢- ثبات تركيبها الحيوي وقدرتها المستضدية antigenicity.
 - ٣- ذات كلفة منخفضة وأمان أعلى بالمقارنة مع اللقاحات الحية.
- لكن هذه اللقاحات تمتلك بعض السلبيات أيضاً فهي لا تستطيع تحريض استجابة مناعية بالفعالية ذاتها التي تحرضها اللقاحات الحية، و بالتالي تحتاج إلى جرعات داعمة لتحريض استجابة مناعية معتد بها. كما تزيد هذه اللقاحات من خطورة حدوث التفاعلات التحسسية بسبب الكميات الكبيرة المحقونة من المستضد (٩٠).

هذا ونستعرض فيما يلي أهم تجارب التلقيح بطفيليات الليشمانية المقتولة. في عام ١٩٧٠ طور Mayrink وزملاؤه لقاحاً مقتولاً مكوناً من ٥ عزلات من الليشمانية تحتوي أربعة أنواع مختلفة. تم تبسيط هذا اللقاح فيما بعد واستخدم لقاح مفرد من الليشمانية الأمازونية حيث تم اختبار فعله الوقائي في كولومبيا والاكوادور واختبار دوره كمساعد للمعالجة الكيميائية في البرازيل. تمكن الباحثون السابقون من اثبات فعاليته بالتخفيف من جرعة الانتموان المطلوبة للشفاء وتسجيله كمساعد للمعالجة بالانتموان وليس كواق من الإصابة (٤).

في فنزويلا قدم Convit وفريق عمله نموذجهم المكون من طفيليات الليشمانية المكسيكية المقتولة بالحرارة والممزوجة مع لقاح BCG، Bacille Calmette-، Guerin، المستخدم في لقاح السل. كما يستخدم في فنزويلا مزيج، من لقاح BCG + وطفيليات الليشمانية المكسيكية المقتولة بالصاد الموصد، للمعالجة المناعية و/أو المعالجة المناعية الكيميائية حيث تبين أن اللقاح فعال في خفض جرعة الانتموان المطلوبة للشفاء. هذا وتستخدم حالياً في فنزويلا طفيليات الليشمانية المكسيكية المقتولة بالصاد الموصد لمعالجة الإصابة بالليشمانية الجلدية (٤).

تم في الإكوادور إعطاء جرعتين من لقاح يحوي طفيليات، الليشمانية الأمازونية والمكسيكية، الممزوجة مع لقاح BCG وحصلوا على وقاية بنسبة ٧٣%.

أجريت في كولومبيا تجارب لإعطاء لقاح Mayrink مع أو بدون BCG وتوصلوا إلى استخدامه بدون BCG، وذلك بسبب تشكل آفات موضعية في مكان الحقن عند استخدامه مع BCG، للانتقال إلى تجارب الفعالية.

استخدمت مشيقات الليشمانية الكبيرة المقتولة بالصاد الموصد، في إيران في المناطق غير الموطونة، وذلك بالمشاركة مع جرعة بسيطة من BCG تعادل عشر الجرعة المستخدمة في لقاح السل. وتبين أن المزيغ آمن ومقبول ويحرض الانقلاب المصلي LST عند ٣٨%، ويزيد بشكل ضعيف إنتاج IFN- γ . علماً أن استخدام المزيغ السابق في منطقة Bam في إيران، بؤر بشرية المصدر، أدى إلى تحريض LST عند ١٦.٥% فقط.

تم تلقيح قرود Indian langur بثلاث جرعات من مزيغ يتكون من طفيليات ليشمانية كبيرة مقتولة بالصاد الموصد ALM ولقاح BCG، وتم اختبار التحدي باستخدام طفيليات الليشمانية الدونوفانية، فكانت الفعالية أفضل من فعالية الجرعة الوحيدة وانخفض عدد الطفيليات مقارنة مع الجرعة الوحيدة لكن فعالية هذا اللقاح غير كافية وبحاجة لاستخدام مادة مساعدة أخرى. لزيادة القدرة التمنيعية للقاح السابق، BCG+ALM، تم ادمصاص ALM على alum "هيدروكسيد الألمنيوم" ثم مزج مع BCG قبل الحقن. سمح ما سبق بزيادة القدرة التمنيعية للمزيغ Alum-AML عند استخدامه بجرعة وحيدة. كما سمح حقن قرود Rhesus بلقاح BCG+ALM أو Alum-AML (طفيليات الليشمانية الكبيرة المقتولة بالصاد الموصد والمدمصة على هيدروكسيد الألمنيوم)، مع IL-12، بالحصول على رد فعل مناعي خلوي قوي ووقائي تجاه الليشمانية الجلدية. أدى حقن قرود Vervet بلقاح ALM + IL-12، إلى توليد رد فعل مناعي من نمط Th1 ولكنه فشل في وقايتها من الإصابة بالليشمانية الكبيرة (٤).

أدى حقن قرود Langur بلقاح يحوي BCG + alum-ALM إلى وقايتها من إصابة حشوية بالليشمانية الدونوفانية. هذا وأدى حقن الكلاب في إيران بجرعة وحيدة من لقاح BCG + alum-ALM إلى وقاية ٧٠% من الإصابة بالليشمانية الحشوية الكلبيية. أدى تلقيح متطوعين سودانيين من مناطق غير موطونة بجرعة وحيدة بالأدمة من لقاح BCG + alum-ALM، اختبرت جرعات تراوحت بين ١٠ و ١٠٠ و ٢٠٠ و ٤٠٠

ميكروغرام من بروتينات الليشمانية، إلى الحصول على أعلى نسبة انقلاب ب LST حتى الآن (١) (٤).

أدى حقن فئران BALB/c الحساسة للإصابة بلقاح مؤلفاً من مشيقات ليشمانية كبيرة مقتولة بالفورمالين alum + KLM مع BCG أو montanide ISA720(MISA)، إلى الحصول على استجابة مناعية وقائية هامة من نمط Th1 عند الفئران الممنعة سواء بلقاح "BCG+KLM" أو بلقاح "MISA+KLM" ولكن ظهرت آثار جانبية بعد التلقيح ب BCG.

في الآونة الأخيرة قيمت نتائج حقن الفئران بطفيليات ليشمانية دونوفانية مقتولة بتطبيقها على قرود Vervet حيث تم تلقيحها بطفيليات ليشمانية دونوفانية مقتولة بالأموج فوق الصوتية مع أو بدون alum-BCG أو monophosphoryl lipid A أو MISA 720. أعطى اللقاح السابق استجابة مناعية قوية من نمط Th1 بالمجموعات الممنعة ب "alum-BCG+Ag" أو ب "MISA+Ag" وكانت أقوى عند استعمال "MISA+Ag" لكن ظهرت آثار جانبية موضعية لدى استعمال BCG مما أثر سلباً على استخدامه كمادة مساعدة في لقاحات الليشمانية.

حالياً تجرى في السودان تجارب لتقييم مدى فعالية المعالجة المناعية الكيميائية تجاه PKDL حيث يتم استخدام أربعة جرعات من "alum-ALM +BCG" مع البنوتستام. أعطت هذه المعالجة نتائج مبدئية مشجعة ومعدل شفاء عال في المجموعة التي تلقت معالجة مشتركة مقارنة مع المجموعة التي تلقت معالجة كيميائية فقط (١) (٤).

٥-٥-٢- أجزاء من الطفيلي Fractionated Leishmania vaccine preparation

بينت الدراسات أن مستضد FML "fucose mannose ligand" الموجود على سطح الطفيلي طوال دورة حياته مولد قوي للمناعة لدى الفئران والأرانب وهو مستضد حساس يسمح بالتشخيص المصلي للإصابة بداء Kala-azar الكلي والبشري الناجم عن الليشمانية الطفلية. وبينت أن صيغة "FML-saponin"، آمنة ومستمنعة وتسمح بوقاية كل من الفئران BALB/c و Swiss albino mice والأقداد CB hamsters.

تم تقييم فعالية لقاح FML لدى الكلاب في منطقة برازيلية موطنه بالليشمانيّة الحشوية الكلبيّة والبشريّة حيث حيث سمح بوقاية ٩٢-٩٥% من الكلاب الملقحة تجاه الإصابة الطبيعيّة. حرض اللقاح "FML-Quillaja saponin" عند الكلاب وقاية عالية تجاه kala-azar الكلبي استمرت لمدة ثلاث سنوات ونصف بعد التلقيح (٤).

سمح حقن بريّوان الفئران BALB/c والأقداد CB hamsters بمستضدات الليشمانيّة الدونوفانيّة الذوابة lag المكبسلة في ليبوزومات مشحونة إيجابياً، كلقاح تجاه الإصابة بالليشمانيّة الدونوفانيّة، بوقايتها من العدوى بمشقيات الليشمانيّة الدونوفانيّة المفوعة. أظهرت الحيوانات الممنعة فرط تحسس متأخر DTH واضح وارتفاع بمستويات أضداد الليشمانيّة من نمط IgG، يمكن أن تكون المستويات العالية من IgG2a المتولدة بعد التمنيع السابق هي المسؤولة عن المستوى الوقائي العالي (٤).

سمح حقن فئران BALB/c بالمستضدات المفرزة المنحلة في مستنبت زرع الليشمانيّة الكبيرة SEAGs L. major culture-derived soluble exogenous "antigens" لوحدها، أو مع alum أو انترلوكين ١٢ المأشوب الفأري أو MISA 720، كلقاح تجاه الليشمانيّة الكبيرة بتحريض تكاثراً هاماً للخلايا التائية عند الفئران الممنعة بـ SEAGs لوحده بينما ترافق رد الفعل المناعي السابق في المجموعات التي تم إضافة مادة مساعدة للـ SEAGs مع انخفاض كبير بحجوم الآفة وانخفاض مئة مرة لعدد الطفيليات مقارنة مع المستضد لوحده.

حرض حقن بريّوان الفئران BALB/c والقداد بالمستضدات الذوابة لمشقيات الليشمانيّة الدونوفانيّة الذوابة sLAG المكبسلة في ليبوزومات non-PC، non-phosphatidylcholine، محضرة من لبيدات جراثيم الإيشريكية القولونية، رد فعل مناعي خلوي قوي "CD8+ CD4" أدى لحماية الحيوانات الممنعة من الإصابة بالليشمانيّة الحشوية ترافق مع استجابة خلطية قوية.

أدى حقن الفئران بمستضدات SLA منحلة ومنقاة لمشقيات الليشمانيّة الكبرى purified soluble L.major antigen ومكبسلة في ليبوزومات، مع العامل المساعد PS CpG " nuclelease-resistant phosphorothioate CpG " oligodeoxynucleotides " أو PO CpG " nuclelease-sensitive "

phosphodiester CpG ODNs"، كنموذج لقاح جيل أول تجاه داء الليشمانيات الجلدي الفئري بالحصول على معدل وقاية عال بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة وبدون اختلافات برد الفعل المناعي بين المجموعتين المحقونتين بـ PS CpG أو PO CpG. (٤).

٦-٥- لقاحات الجيل الثاني second generation vaccines

تتضمن لقاحات تستخدم :

- ✓ طفيليات حية مضعفة Live attenuated leishmania vaccines
- ✓ مستضدات مأشوبة لطفيليات الليشمانية recombinant antigens
- ✓ مستضدات منقاة لطفيليات الليشمانية Leishmania purified antigens
- ✓ فيروسات أو جراثيم مأشوبة recombinant viruses and bacteria
- كحوامل deliver vehicles لتسليم المستضد.

٦-٥-١ اللقاحات الحية المضعفة Live attenuated leishmania vaccines

يعتمد هذا النوع من اللقاحات على حقن أنواع حية من الليشمانية المعدلة جينياً من خلال تطفير جينات معينة. تم سابقاً الحصول على اللقاحات الحية المضعفة اعتماداً على حساسية هذه الطفيليات للحرارة، أو للتشعيع بأشعة غاما، أو للتطفير الكيميائي، أو باستنبات الطفيلي تحت ضغط أحد الصادات الحيوية كالجنتاميسين حيث تفقد هذه الإجراءات إلى الحصول على طفرات غير محددة جينياً من شأنها إزالة فوعة الطفيلي وإزالة فعاليته. أما حديثاً فيتم الحصول على الحية المضعفة بتعديل جينوم الليشمانية نفسه للحصول على طفيليات ذات طفرات بجينات معينة مرغوبة.

على الرغم من أنّ الطفيليات المضعفة جينياً تحافظ على فوعتها المضعفة عند حقنها للإنسان، إلا أنه يمكن أن يترافق استخدامها بعد تكرار زرعها مع استعادتها لفوعتها عند حقنها للإنسان. كما يمكن أن يحدث إعادة التفعيل عند الأشخاص مضعفي المناعة. (٩١).

نشرت مجموعة هامة من التجارب التي استخدمت اللقاحات الحية المضعفة وسنستعرض فيما يلي أهمها. في أمريكا عام ١٩٩٥ استخدمت طفيليات الليشمانيّة الكبيرة التي حذف منها الجين المرمز لأنزيم dhfr-ts، dihydrofolate reductase، Thymidylate synthase، الضروري لاصطناع DNA ونجحت هذه الطفيليات المضعفة في توليد مناعة ضد الإصابة بالليشمانيّة الكبيرة المفوعة والليشمانيّة الأمازونية عند الفئران BALB/c وحفزت إنتاج أضداد نوعية دون إنتاج IFN γ . تمت تجربة هذا اللقاح ضد القروود في إيران عام ٢٠٠٦ وفي البرازيل عام ٢٠٠٢، لكنه فشل في حماية القروود من الإصابة بالليشمانيّة الكبيرة (٩٢).

في أمريكا عام ٢٠٠٤ استخدمت طفيليات الليشمانيّة الكبيرة التي حذفت منها جين LPg2 لبيوفوسفو غليكان -٢، المرمزة لإنزيم له دور في نقل GDP-mannose لجهاز غولجي، لتمنع الفئران. كمنعت هذه الطفيليات ضمن الفئران الممنعة بدون توليد المرض، ولكنها استطاعت توليد مناعة ضد الخمج حيث استطاعت هذه الطفيليات أن تولد مناعة عند الفئران عالية الحساسية ضد التحدي بالليشمانيّة الكبيرة بينما فشلت لوحدها في حماية فئران C57b1/6 ونجحت عند مشاركتها ب CPG كمادة مساعدة (٩٣). بينت دراسة أخرى في أمريكا عام ٢٠٠٤ أن هذه الطفيليات قد تستعيد فوعتها وقدرتها على توليد المرض في ظل غياب الجين ضمن آلية تعويضية ما زالت غير معروفة، مما يوحي بأن كمون الطفيلي ضمن المضيف لا يشكل صفة مرغوبة في اللقاحات المضعفة (٩٣).

من المقاربات الأخرى المستخدمة لإضعاف طفيلي الليشمانيّة هو إضافة جينات قاتلة suicidal cassette إلى الجينوم والتي ترمز لمواد سامة، كأحد الصادات الحيوية مثلاً، وبالتالي تصبح الطفيليات حساسة لهذه المادة وتموت عند تعرضها لها (٩٤). فتم مثلاً في إيران عام ٢٠٠٨ تحضير سلالة من طفيليات الليشمانيّة الكبيرة المطفرة بإدخال جينات قاتلة للطفيلي باستخدام تقنية استهداف الجين gene targeting technology حيث تم إدخال مورثتين، جين أنزيم Thymidine kinase المأخوذ من فيروس الحلا HSV-1 والتي يجعل الطفيليات حساسة لدواء ganciclovir، وجين أنزيم Sacchromycescerevisiae cytosine deaminase والتي تجعلها حساسة لدواء 5-fluorocytosine. أكدت الدراسات في الزجاج إمكانية قتل الطفيليات السابقة عند معالجتها بأحد الدوائين أو بالدوائين معاً حيث يكون تأثيرهما تآزرياً، هذا وبينت

الدراسات في الحي أن الطفيليات الطافرة السابقة تسبب حطاطات شديدة عند فئران BALB/c لكنها تشفى خلال أسبوعين من المعالجة بهذين الدوائين أو بأحدهما مما يسمح لهذه الفئران المعالجة أن تبدي مقاومة لمدة ٤ أشهر على الأقل ضد الإصابة مرة أخرى بطفيليات الليشمانية الكبيرة غير المطفرة (٩٤).

٥-٦-٢ التلقيح باستخدام مستضدات مأسوبية recombinant antigens لطفيليات الليشمانية

بدأ استخدام البروتينات المأسوبية والعمل عليها عام ١٩٩٠، حيث تم تحضير هذه المستضدات التي تتألف من بروتين مأسوب واحد أو من مجموعة من البروتينات المأسوبية. وغالباً ما استخدمت مع مواد مساعدة أو تم إيصالها بواسطة أحد أنواع الجراثيم. تم اختبار القدرة المولدة للمناعة للمستضدات السابقة وقدرتها على حماية الفئران، ولكن لم يصل سوى بعضها إلى مراحل التجارب على القرود لكشف قدرتها على الوقاية من الإصابة بالليشمانية الجلدية، أو التجارب على الكلاب لكشف قدرتها على الوقاية من الإصابة بالليشمانية الحشوية، ولم يصل أي منها لتجارب الطور الثالث عند الكلاب (٩٥). تمتاز هذه اللقاحات بكونها آمنة، ولا تتداخل مع المناعة الخلوية أو مع اللقاحات أخرى، وتعرض استجابة مناعية قوية. لكنها تمتلك مجموعة من السلبيات حيث تحتاج إلى مواد مساعدة لتعزيز قدرتها الاستمناعية وتحويل نمط الاستجابة المناعية إلى Th1 لأن البروتين لوحده كلقاح يحرض استجابة مناعية فقط من النمط Th2، ومكلفة، ويمكن أن تتلوث بالمواد الجرثومية، ونحتاج إلى حقن كميات كبيرة من المستضد لتأمين الاستجابة المناعية المطلوبة (٩٠). نشرت مجموعة هامة من التجارب التي استخدمت اللقاحات السابقة حيث أدى تمنيع القرود بالمستضد gp63 المأسوب، مع BCG كعامل مساعد، إلى توليد مناعة جزئية لديها. كما أدى تمنيع الفئران BALB/c في إيران عام ٢٠٠٧ بالمستضد gp63 المأسوب، مع العامل المساعد CPG-ODN "cytosine phosphatate" و guanosine- oligodeoxy nucleotide كعامل مساعد إلى زيادة الاستجابة المناعية وتأمين الحماية للفئران الممنعة ضد الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبيرة و ترافقت هذه الحماية مع مستويات عالية من IFN- γ و مستويات منخفضة من IL-4 وارتفاع نسبة الأضداد IgG2a/IgG1 (٩٦).

أدى تمنيع الفئران CBA في الولايات المتحدة الاميركية عام ١٩٩٣ بالجزء GP46/M2 المستخلص من طفيليات الليشمانية الأمازونية، وبوجود جراثيم الوديات الصغيرة *Corynebacterium parvum* كعامل مساعد، ثم إخمائها بالليشمانية الأمازونية إلى جعل فئران CBA مقاومة بشكل كامل للخمج. بينما أدى تطبيق ما سبق على الفئران BALB/c إلى اكتساب هذه الفئران لمناعة جزئية فقط، وترافقت مع تناقص أعداد الطفيليات في الآفات الجلدية وارتفاع نسبة الأضداد IgG2a/IGg1 (٩٧).

هذا ولم يحقق تمنيع فئران BALB/c في كندا عام ٢٠٠٣ بالمستضد LACK "Leishmania homolog of receptors for Activated C Kinase" كبروتين مأشوب لوحده الحماية ضد طفيليات الليشمانية الكبيرة لكن أدى حقنه مع rIL-12 كمادة مساعدة إلى تحريض حماية جزئية لدى الفئران الممنعة. علماً أن دراسة أخرى أظهرت قدرة LACK على تحريض استجابة مناعية وقائية واضحة تجاه الإصابة بطفيليات الليشمانية الأمازونية عند فئران BALB/c (٩٨).

سمح استخدام لقاح في أستراليا عام ١٩٩٥ مكون من مزيج من السيستئين بروتياز "CPA" A والسيستئين بروتياز B "CPB"، بالمشاركة مع مزيج العاملين المساعدين CpG-ODN و Montanide 720، بتحريض استجابة مناعية Th1 وبالتالي حماية الفئران BALB/C من الإصابة بالليشمانية الطفيلية (٤٥).

بينت دراسة بريطانية عام ٢٠٠٠ أن حقن الفئران BALB/C بالبروتين HaspB1، "Hydrophilic acylated surface protein B1" يولد مناعة لدى الفئران ويحميها من الإصابة بالليشمانية الدونوفانية (٩٩).

بينت دراسة سويسرية عام ٢٠٠٣ قدرة الهيستون H1، بالمشاركة مع العامل المساعد Montanide ISA 721، على حماية القرد من الإصابة الجلدية بالليشمانية الكبيرة (١٠٠).

أظهرت أخيراً دراسة إيرانية عام ٢٠٠٧ أن حقن الفئران BALB/C والقرد بلقاح مكون من البروتين Thiol specific antioxidant "TSA" والبروتين LmSTI1، مع كل من الإنترلوكين ١٢ وهلامة هيدروكسيد الألمنيوم كعاملين مساعدين، يحميها بشكل قوي من إصابة جلدية بالليشمانية الكبيرة. كما تمكن اللقاح Leish-111f

المكون من مجموعة من البروتينات المأشوبة من حماية الفئران من الإصابة بالليشمانية الجلدية والحشوية حيث يحتوي هذا اللقاح على البروتين TSA لليشمانية الكبيرة، وبروتين LmSTI1 لطفيليات الليشمانية الكبيرة "stress inducible protein-1"، وبروتين LeIF عامل التطاول لليشمانية البرازيلية "elongation initiation factor"، وذلك في صيغة واحدة مع العامل المساعد MPL-SE وهو مكون من لببب أحادي الفوسفوريل monophosphoryl lipid MPL والسكوالين squalene. لكن اللقاح السابق لم يستطع حماية الكلاب الملقحة به من الإصابة في تجارب الطور III (١٠١).

٣-٦-٥ لقاحات تستخدم فيروسات أو جراثيم مأشوبة et recombinant viruses et bacteria كحوامل ناقلة deliver vehicles

تعبر الفيروسات أو الجراثيم المأشوبة المستخدمة عن مستضدات الطفيلي بالإضافة لعملها كمواد مساعدة، حيث استخدمت مجموعة من الجراثيم والفيروسات وسنستعرض فيما يلي أهمها. بينت دراسة بريطانية عام ١٩٩٥ أن حقن الفئران بجراثيم سلمونيلا تيفيموريوم الطافرة *Salmonella thypymurium mutant*، أدخل إليها جين إنزيم البروتياز السطحي gp63 لطفيليات الليشمانية الكبيرة، يؤدي إلى حماية الفئران من الإصابة الجلدية بطفيليات الليشمانية الكبيرة (١٠٢). كما سمح إدخال جين إنزيم البروتياز السطحي gp63 لليشمانية الكبيرة ضمن جراثيم BCG وحقن الفئران بالجراثيم الطافرة السابقة إلى حماية الفئران من الإصابة الجلدية بطفيليات الليشمانية الكبيرة (١٠٣).

بينت دراسة كولومبية عام ٢٠٠١ أن حقن الفئران بطفيليات المقوسات الغوندية المضعفة بالحرارة، والمدخل لها جين مستضد البروتين السطحي membrane KMP11-kinetoplastid protein، يؤدي إلى حماية الفئران من الإصابة الجلدية بطفيليات الليشمانية الكبيرة (١٠٤).

بينت دراسة أمريكية عام ١٩٩٣ أن حقن فئران BALB\c بفيروس جدري البقر الطافر *vaccinia virus*، بإدخال جين تعبر عن البروتين السكري السطحي Gp46\M-2\PSA-2 لليشمانية الأمازونية، بالوقاية من الإصابة بالليشمانية الأمازونية (٩٣). كما استخدمت دراسة إسبانية عام ٢٠٠٢ فيروس جدري البقر أيضاً بعد إدخال الجين التي تعبر

عن المستضد LACK لليشمانية الطفلية، حيث أدى حقن الفئران بالجراثيم المطفرة السابقة إلى وقايتها من الإصابة بطفيليات الليشمانية الكبيرة (١٠٥).

٥-٧- لقاحات الجيل الثالث "لقاح الدنا"

تعرض لقاحات الدنا استجابة مناعية كاملة ضد المستضد الذي ترمز له، حيث تسمى أيضاً لقاحات الدنا العاري naked DNA vaccines. يشكل التمنيع باستخدام الدنا مقارنة واعدة وانقلاباً جديداً في مجال المعالجة والحماية من الأمراض الخمجية، حيث يتم إدخال الجينات المرزمة للبروتينات الهدف ضمن بلاسميد ثم يتم حقن الدنا بشكل مباشر ضمن الأدمة أو ضمن العضل. تلتقط الخلايا التغصنية المستضدات المفروزة من خلايا العضلات إلى الفراغات الخلوية للعضلة. يتم التعبير عن بروتينات جينات المستضدات المستخدمة بواسطة الخلايا حقيقية النوى الموجودة في هذا الموقع والتي تقوم بأخذ البلاسميد المرزوم للمستضدات الهدف. تستخدم لقاحات الدنا جزيئة دنا مفردة لجين مفردة أو مجموعة جينات ضمن بلاسميد يرمز لعدة مستضدات. تمتاز لقاحات الدنا بأنها طريقة تمنيع آمنة جداً لأنها لا تحتوي أية متعضيات ممرضة يمكن أن تستعيد فوعتها لاحقاً ضمن المضيف (٩٠). تلعب إضافة جين CpG دوراً هاماً في لقاحات الدنا. ترتبط تسلسلات الـ CpG غير الممتيلة المستخدمة كناقل non-methylated CpG sequences of bacteria، مع المستقبل TLR-9 الموجود على سطح الخلايا التغصنية وتعرض اصطناع الإنترلوكين ١٢ و ١٨ اللذان يحفزان الخلايا التائية الساذجة على التمايز إلى Th1 التي تولد بدورها مناعة متواسطة بالخلايا، وتحفز الخلايا T السامة، وتعرض كذلك الخلايا البائية B cells على اصطناع أصناف محددة من الأضداد مثل IgG2 في الفئران، ويلعب مجموع الخلايا السابقة بأكملها دوراً هاماً في توفير الحماية ضد الإصابة بطفيليات الليشمانية طبيعية الفوعة (٩٠).

تتميز لقاحات الدنا بخصائص متعددة تجعلها متميزة عن باقي اللقاحات فهي آمنة، وسهلة التصنيع ورخيصة الثمن، وثابتة بمختلف درجات الحرارة مما يجعل عملية النقل والتخزين سهلة ورخيصة، ويمكن تجميع جينات متعددة تعبر عن عدة مستضدات وبالتالي تشكيل مناعة ضد معظم أنواع الليشمانية، وتعرض استجابة مناعية خلوية من النمط Th1 (٩٠).

استخدمت دراسة أمريكية عام ١٩٩٨ فئران 3H/HE المقاومة وفئران BALB/c الحساسة، المصابة بالليشمانية الكبيرة، لدراسة فعالية لقاح دنا يرمز لمجموعة من الجينات لعلاج هذه الفئران. أكدت هذه الدراسة أن لقاحات الدنا، التي ترمز لكل من GP63 و LACK و PSA2 ، تلعب دوراً في علاج المرض لدى كل من الفئران المقاومة والحساسة (١٠٦) (١٠٧) (١٠٨).

بينت دراسة اسبانية عام ٢٠٠٧ فشل لقاح دنا، يحتوي عدة جينات تشفر لكل من KMII و TRYP و LACK و GP63 ، في حماية الكلاب من الإصابة بالليشمانية الطفلية. لا تتفق هذه الدراسة مع الفرضية القائلة بإمكانية الحصول على استجابة مناعية فعالة بشكل أكبر عند حقن أكثر من مستضد ضمن لقاح واحد، وبالتالي لا تؤمن بالضرورة لقاحات الدنا المرمزة لعدة مستضدات مناعة أفضل تجاه خمج الليشمانية (١٠٩).

استخدمت دراسة مكسيكية عام ٢٠٠٥ جين الهيدرولاز نيكليوزيد الذي يبلغ وزنه الجزيئي ٣٦ كيلو دالتون NH36-DNA، المكون الأساسي FML، كعامل يمنع مما سمح بتحريض استجابة Th1 قوية منعت الفئران ضد الليشمانية الشاغاسية والليشمانية المكسيكية وقد عزز استخدام فوسفات الألمنيوم كمادة مساعدة من الاستجابة المناعية (١١٠).

سمح تلقح الفئران الذهبية بالدنا المشفر للجزء النهائي N-terminal domaine للجين بروتين (ppgs) proteophosphoglycans ، من الليشمانية دونوفانية بحدوث وقاية عند ٨٠% من الفئران ونجاة جميع الفئران والحياة لمدة ٦ أشهر بعد التحدي بالليشمانية الطفلية. حيث لوحظ تحفيز إنتاج كميات كبيرة من الرنا الرسول mRNA الخاص بكل من أكسيد النترريك والانتريفيرون غاما والانتريلوكين ١٢، وانخفاض التعبير عن الرنا الرسول الخاص بالانتريلوكينات ٤ و ١٠ (١١١).

استخدمت دراسة بريطانية عام ١٩٩٠ جراثيم السلمونيلا التيفية الفأرية Salmonella typhimurium كناقل للجين المرمز لبروتين Gp63 حيث أدى اعطائها للفئران بالطريق الفموي، إلى تحفيز استجابة Th1 قوية من دون أن يسبب استجابة DTH قابلة للكشف. سمح حقن الفئران عضلياً بالجراثيم السابقة، استجابات ملحوظة وقوية ضد الإصابة بالليشمانية الكبيرة لكن لم ينج سوى ٣٠% من الفئران بعد اختبار التحدي

بالليشمانية الكبيرة (١١٢). هذا وسمح مزج جين Gp46 من الليشمانية الأمازونية مع مورثتي CPB و Gp63 من الليشمانية المكسيكية بزيادة معدل حماية فئران BALB/c من الإصابة بالليشمانية المكسيكية (١١٣).

وأخيراً سمح لقاح DNA مكون من مزيج بلاسميدات الهيستونات الأربعة H2A و H4 و H3 و H2B في أستراليا عام ٢٠١١، بحماية الفئران BALB/C من الإصابة بالليشمانية الكبيرة (١١٤).

لكن وبالرغم من ميزات لقاح الدنا أنفة الذكر فإنها لم تصل حتى اليوم إلى مرحلة تجارب الطور III.

٨-٥- لقاحات تعتمد على المستضدات الموجودة في لعاب الفاصدة **salivary antigens**

بينت الدراسات أن لعاب ذبابة الرمل يعزز شدة الإصابة بداء الليشمانيات، وبالتالي فقد تم تطوير لقاحات ضد العناصر الموجودة في لعاب الفاصدة أو ضد مستضدات في بلعوم الحشرة وذلك بهدف تخفيف حدة المرض وإنقاذ قدرة الطفيلي على التكاثر. استخدمت بروتينات الفاصدة الباباتاسية *Phlebotomus papatasi* لتلقيح فئران CBA/CaH-T6J mice حيث سمح حقنها بكل من البروتينين MAXADILAN والبروتين SP15 الموجودين في اللعاب، بجعلها مقاومة للإصابة بالليشمانية الكبرى (١١٥)(١١٦).

٩-٥- المواد المساعدة

يؤدي ارتباط الخلايا التائية الساذجة Th0 مع المعقد ببتيد MHCII والذي تعبر عنه الخلايا المقدمة للمستضد، في هذه المرحلة أي الارتباط السابق، إلى تحولها إلى خلايا Th1 أو Th2 مما يسمح بتحديد مسار ونتيجة الاستجابة المناعية. هذا ويعتقد أن المواد المساعدة تساهم في هذه المرحلة في توجيه الاستجابة المناعية نحو Th1 وهي النمط الفعال في حالة العوامل الممرضة داخل الخلية كطفيليات الليشمانية. يمكن أن نذكر من هذه العوامل المساعدة الأملاح المعدنية مثل فسفات الألمنيوم أو هيدروكسيد الألمنيوم أو السابونينات، أو عوامل مساعدة مشتقة من الجراثيم مثل ليبوفوسفوسكاريد

وليوفوسفوغليكان ومونوفوسفوريل ليبيد، أو عوامل استقلابية تشكل مستحلبات من نمط زيت في الماء مثل الموراميل دي ببتيد muramyldipeptid وعامل فروند الناقص، أو بوليميرات مثل بولوكسامير poloxamerMontanide (١١٧). هذا واستخدمت الجراثيم المضعفة أيضاً كمواد مساعدة في لقاحات الليشمانية مثل لقاح الBCG حيث وجد أنه يحرض استجابة Th1، ويعتقد أن ذلك يعود للتشابه بين جينات BCG وجينات الليشمانية، لكنه يحرض أيضاً تفاعلات المناعة الذاتية ولا يمكن استخدامه عند مضعف المناعة (١١٨). ويجب ألا ننسى أخيراً المواد المساعدة الواعدة، وهي سيتوكينات منحلة معروفة بقدرتها على توجيه الاستجابة المناعية نحو Th1 مثل IL- 12 وسيتوكين العامل المحفز لمستعمرات البالعات المحببة **Granulocyte-macrophage " GM-CSF colony-stimulating factor"** (١١٩).

٦- الجينات المستهدفة لتصنيعها كلقاح دنا في دراستنا

تعود فوعة طفيليات الليشمانية لامتلاك هذه الطفيليات لمجموعة مختلفة من الجزيئات تشمل المستضدات المفرزة أو السطحية والمستضدات الداخل خلوية. في حين تلعب المستضدات المفرزة والسطحية دوراً هاماً في إحداث العدوى وحماية الطفيلي من رد الفعل المناعي البدئي للمضيف وتلعب دوراً كمحددات مستضدية غازية **Envasive**، تلعب المستضدات داخل خلوية دوراً في تحديد النمط الظاهري للمرض (١٢٠).

بينت الدراسات ارتفاع مستوى الأضداد المضادة لليشمانية لدى المصابين بداء الليشمانيات الحشوي، مقارنة بمستواها المنخفض عند المصابين بداء الليشمانيات الجلدي. بالرغم من عدم وضوح دور هذه الأضداد حتى الآن (١٢١)، تستخدم هذه الأضداد حالياً، سواء أكانت ضد مستضدات المشيقات أو الليشمانات، في التشخيص المصلي لهذا الداء (١٢١)(١٢٢) (١٢٣) (١٢٤) وفي إمكانية تحضير لقاح وافي من الإصابة.

أظهر مسح أجري على مصول مرضى مصابين بالليشمانية وجود العديد من المُستمنعات كالبروتينات غير المفرزة والتي تشكل الهيستونات جزء منها (١٢٥) (١٢٦) (١٢٧). تسمى هذه البروتينات الداخل خلوية "ومن ضمنها الهيستونات" المصانة بشكل كبير والمحرضة لاستجابات مناعية قوية، بمستضدات **Panantigens** (١٢٨).

تنتج مستضدات Panantigens، بما فيها الهيستونات، مستويات عالية من الأضداد كنتيجة مباشرة لتفعيل اللفوايات البائية متعددة النسائل كما لوحظ في داء شاغاس (١٢٩) (١٣٠). وتشكل هذه المستضدات هدفاً لأضداد المناعة الذاتية، التي تتشكل كنتيجة للإصابة بأمراض المناعة الذاتية (١٣١). تكون الاستجابات المناعية تجاه مستضدات Panantigens، سواء الخلطية أو الخلوية، نوعية بشكل كبير ولا يرافقها إنتاج لأضداد ذاتية (١٣٢) (١٢٨) (١٣٣).

تعتبر الهيستونات بروتينات بنوية تملك دوراً هاماً في تنظيم وظيفة الدنا وتنظيم عملية النسخ وتعديلات ما بعد الترجمة. هناك أربعة أصناف هامة من الهيستونات H2A و H2B و H3 و H4 والتي تشكل لب الجسيم النووي. تعتبر هذه البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض أكثر البروتينات صوتاً ضمن الكائنات حقيقية النواة (١٣٤).

تم إثبات وجود أضداد الهيستونات في مصول الكلاب المصابة بداء الليشمانيات الطفيلية الحشوي حيث بلغت نسبة أضداد الهيستونات عند الكلاب السابقة ٧٢% بالنسبة لأضداد H2A، و ٦٠% بالنسبة لأضداد H2B، و ٦٨% بالنسبة لأضداد H3، و ٤٤% بالنسبة لأضداد H4. سجل أيضاً ارتفاع في مستويات أضداد الهيستونات في مصول المصابين بداء الليشمانيات الحشوي مما سمح باستخدامها كمعلم تشخيصي للإصابة (١٣٥).

على الرغم من كون هذه الهيستونات مصانة بشكل كبير، فإن الاستجابة الخلطية تجاه هذه الهيستونات أثناء الإصابة ناجمة فقط من هيستونات الطفيلي حيث لم يلاحظ نهائياً حدوث رد فعل مناعي تجاه هيستونات المضيف. أظهر المسح المناعي للمحددات المستضدية لللفوايات البائية أنها تتضمن فقط المناطق الأكثر اختلافاً بين هيستونات الليشمانيات الطفيلية (١٢٧) (١٣٦) (١٣٧).

في حين يتعرض جهازنا المناعي للمستضدات المفروزة والسطحية بشكل مبكر منذ لحظة دخول الطفيليات إلى الجسم، فإنه يتعرض للمستضدات الـ Panantigens خلال الطور الطبيعي من الإصابة حيث يحدث التعارف بين هذه المستضدات Panantigens والجهاز المناعي بعد تحطم الطفيلي فقط. يحدث هذا التحطم عند دخول الطفيلي، نتيجة لدغة ذبابة الرمل، حيث يتحطم قسم من هذه الطفيليات عند دخولها للمضيف (١٣٨).

لا يفسر انخفاض عدد الطفيليات التي تدخل مبدئياً أثناء لدغة الحشرة، بين ١٠٠-١٠٠٠ طفيلي، لوحده التنوع الكبير لكل من الجمهرات الخلوية المناعية والمتواسطات المناعية خلال طور العدوى. لذلك يفترض أن يكون الجسم قد تعرض لفترة طويلة لمستضدات Panantigens قبل ظهور أي عرض سريري واضح (١٣٨).

يلعب التحرر المبكر لمستضدات Panantigens دوراً تآزرياً عابراً مع المستضدات المفرزة والسطحية، حيث تشكل مستضدات Panantigens ما يشبه الستار الدخاني smoke screen لتغطية المستضدات المفرزة والسطحية التي تسمح بدورها ببدء العدوى بواسطة الطفيليات الحية. وبالتالي يمكن أن يساهم رد الفعل المناعي المتطور تجاه مستضدات Panantigens في التمويه عن جزيئات الطفيلي المسؤولة عن غزو الخلايا البالعة. يظهر بروفایل الاستجابة الخلوية تحرراً ثابتاً للمستضدات Panantigens خلال العدوى (١٣٩) (١٤٠) (١٢٣). ويظهر البروفایل السابق أيضاً أن هذه المستضدات تنشأ من الطفيليات إما نتيجة لتحطم الليشمانات الداخل خلوي بواسطة البالعات المفعلة، أو تحطم الليشمانات المتحررة نتيجة انفجار البالعات، أو نتيجة تحلل خلوي عفوي للليشمانات داخل الخلايا المصابة (١٢٠).

في داء الليشمانيات النشط، يبدو أنه يحدث استعطال بالبالعات المصابة يؤدي إلى ضعف في فعاليتها ووظيفتها (١٤١) (١٤٢) (١٤٣). لذلك من غير المتوقع أن يكون مصدر مستضدات Panatigens هو من تلك البالعات المصابة. وعلى الرغم من أن الليشمانات الحرة، المتحررة من البالعات التي انفجرت، يمكن أن تقوم بإخماج البالعات الأخرى مباشرة إلا أنها لا توجد سوى بأعداد قليلة غير قابلة للكشف حتى في حالات الإصابة الشديدة وبالتالي لا يمكن أن تشكل مصدراً رئيسياً للحصول على مستضدات Panantigens (١٢٠). كما يؤدي بطء تضاعف الليشمانات ضمن البالعات وقدرتها على تأخير عملية الاستماتة في البالعات المخموجة بشدة، إلى السماح ببقاء الليشمانات لفترة طويلة ضمن البالعات وبالتالي لا تعد مصدراً هاماً للحصول على Panantigens (١٢٠).

بناء على ما سبق فإن الفرضية الأكثر قبولاً بالنسبة لمراحل تحرر هذه المستضدات هي الانحلال الخلوي العفوي لليشمانات الداخل خلوية وهو ما يطلق عليها بعض العلماء عملية الاستماتة. (١٤٤).

يؤدي تحرر هذه المستضدات إلى تأثير تدريجي تزداد أهميته مع تطور الإصابة وزيادة الحمل الطفيلي، مما يفسر العلاقة بين هذه المستضدات وشدة الباثولوجيا المناعية المرتبطة بعدوى الليشمانية (١٢٠).

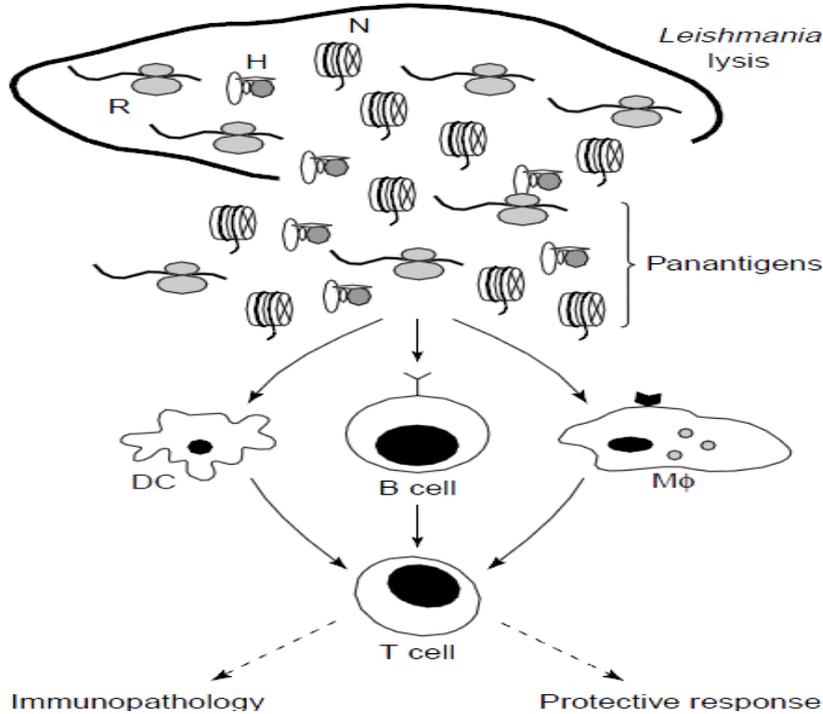
يمكن أن ترتبط قدرة Panantigens على تعديل الجهاز المناعي بكونها بروتينات داخل خلوية لم تتعرض للضغط المناعي Immune pressure. وبالتالي يمكن أن تؤمن خواصاً معدلة للمناعة مهمة لتصميم اللقاحات (٤١). كما نعلم تسبب طفيليات الليشمانية حدوث تثبيط مناعي عند الانسان، تلعب الأضداد دوراً في تأخير حدوث التثبيط المناعي السابق سواء نتيجة التأثير الحال للطفيلي لهذه الأضداد أو نتيجة دورها في تخريب بنية ووظيفة البروتين (٤١).

٦-١- تفسير القدرة الاستمناعية لمستضدات Panantigens

توجد مستضدات Panantigens ضمن الخلايا عادة بشكل بروتينات متعددة القسمات multimers. يترافق تحطم الليشمانات مع تحرر كميات كبيرة من معقدات متعددة المكونات تحتوي على هذه المستضدات. يتم بعدها بلعمة هذه المستضدات ومعالجتها من قبل خلايا متخصصة مقدمة للمستضد APCs، كالبالعات غير المصابة أو الخلايا التغصنية أو اللمفاويات البائية، التي تقدم هذه المستضدات بواسطة معقدات توافق نسيجي من النمط الثاني MHCII (١٢٨).

يعزى رد الفعل المناعي تجاه مستضدات Panantigens عند الإنسان والحيوانات المصابة بداء الليشمانيات إلى ثلاثة عوامل أساسية تشمل وفرة وجود هذه المستضدات كمعقدات جواله خلال الإصابة بالليشمانية، والثباتية العالية للبروتينات النووية، وأخيراً ارتفاع قدرة الخلايا المقدمة للمستضد على قبط هذه المستضدات كون الجزيئات المتعددة المكونات تدخل إلى الخلية بشكل أكثر فعالية من المستضدات الذوابة. علاوة على ذلك، يمكن أن تحرض الخلايا الذاكرة المتولدة عن تعرض قديم لمستضدات Panantigens،

نتيجة من عوامل إخماجية أخرى أو من عضيات دقيقة موجودة في الفلورا الطبيعية، رد فعل مناعي سريع عندما يتم تحريضها بمستضدات Panantigens لطفيليات الليشمانية (١٢٨). هذا ويبين الشكل ١٥ نموذجاً افتراضياً للقدرة الاستمناعية لمستضدات Panantigens خلال الإصابة بداء الليشمانيات. حيث أن انحلال الطفيليات، بواسطة آليات مناعية نوعية وغير نوعية، يؤدي إلى تحرر كميات كبيرة من البروتينات الداخل خلوية. تشكل معظم هذه المستضدات معقدات عديدة البروتين. ويفترض هذا النموذج أن قبط ومعالجة هذه المستضدات من قبل الخلايا المتخصصة المقدمة للمستضد يمكن أن يتم بثلاثة طرق. يمكن أن يسمح وجود هذه المستضدات بشكل معقدات إلى جعلها أكثر قابلية للبلعمة من قبل الخلايا التغصنية والبالعات. كما يمكن أن يتم القبط نتيجة لوجود مستقبلات نوعية لمستضدات Panantigens على سطح الخلايا المقدمة للمستضد كالخلايا التغصنية والبالعات. وأخيراً يمكن أن يتم التعرف على المناطق المصانة لهذه البروتينات من قبل مستقبلات الغلوبولينات المناعية، أضداد مناعية ذاتية، الموجودة على سطح بعض اللمفاويات البائية.



شكل ١٥. نموذج افتراضي للقدرة الاستمناعية لمستضدات Panantigens خلال الإصابة بداء الليشمانيات (128).

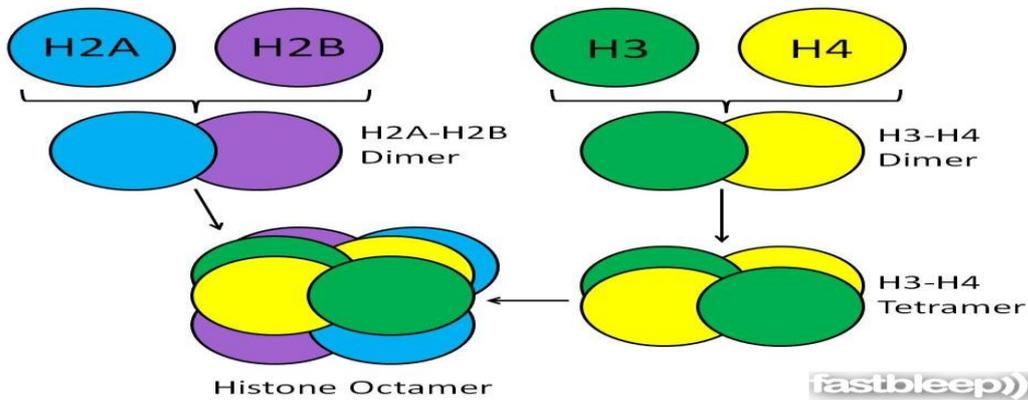
٢-٦- H2A جين

١-٢-٦- لمحة عامة عن جين H2A

يبلغ طول جين H2A ٣٩٩ زوج أساس. يوجد هذا الجين لدى كل من الlišمانية الكبيرة، والlišمانية الطفلية، والlišمانية البرازيلية، والlišمانية المكسيكية، والlišمانية الدونوفانية. لم يتم حتى الآن نشر تسلسل هذه الجين عند الlišمانية المدارية. يشفر هذه الجين للهيستون H2A الذي يتألف من ١٣٢ حمضاً أمينياً، ويبلغ وزنه الجزيئي ١٣,٩٣٥ دالتون (١٤٥).

الهيستون H2A هو أحد مكونات بنية لب الجسيم النووي الذي يتألف من تجمع ٨ جزيئات من الهيستونات بمعدل جزيئين لكل هيستون من الهيستونات H2A و H2b و H3 و H4. تتجمع الهيستونات H2A و H2B بشكل مثنويات، والهيستونات H3 و H4 بشكل رباعيات حيث يلتف على الجسيم النووي ١٤٦-١٤٧ زوج أساس من الدنا. يتألف الهيستون H2A من منطقة كروية وذيل عند النهاية الأزوتية أو النهاية كربونية. تطراً تعديلات ما بعد الترجمة على منطقة الذيل عند النهاية الأزوتية أو الكربوكسيلية (١٤٦).

يلعب الهيستون H2A دوراً في عملية الـ packaging للدنا، وتنظيم انتساخ الدنا وعمليات إصلاحه وتضاعفه، وثباتية الصبغيات، والتعبير الجيني (١٤٧). تنظم إمكانية الوصول للدنا عبر مجموعة تعديلات ما بعد الترجمة تطراً على الهيستونات تدعى histone code أو إعادة تنظيم الجسيم النووي nucleosome remodeling (١٤٦).



شكل ١٦. بنية لب الجسيم النووي (١٤٨).

٦-٢-٢- وجود الجين في أنواع وحيدات الخلية الأخرى

يعتبر جين H2A من الجينات المصانة بشكل كبير عند حقيقيات النوى (١٤٩). يوجد هذا الجين عند الحيوانات الأولية كالتريبانوزوما، والبلاسموديوم، والمشعرة المهبلية (١٥٠).

٦-٣-٢- جين H2B

٦-٣-١- لمحة عامة عن جين H2B

يبلغ طول جين H2B ٣٣٦ زوج أساس. يوجد هذا الجين لدى كل من الليشمانية الكبيرة، والليشمانية الطفلية، والليشمانية البرازيلية، والليشمانية المكسيكية، والليشمانية الدونوفانية. يشفر هذا الجين للهستون H2B الذي يتألف من ١١١ حمضاً أمينياً، ويبلغ وزنه الجزيئي ١٢,٤٥٧ دالتون (١٥١).

يدخل الهستون H2B في بنية لب الجسيم النووي الذي يتألف من تجمع ٨ جزيئات من الهستونات، جزيئين من كل هستون H2A و H2b و H3 و H4. تتجمع هستونات H2A و H2B بشكل مثنويات وهستونات H3 و H4 بشكل رباعيات، شكل ١٦، حيث يلتف على الجسيم النووي ١٤٦-١٤٧ زوج أساس من الدنا. يتألف الهستون H2B من منطقة كروية وذيلين أحدهما عند النهاية الأزوتية والآخر عند النهاية الكربونية. تطرأ التعديلات ما بعد الترجمة على منطقة الذيل عند النهايتين الأزوتية والكربوكسيلية (١٤٦).

يلعب الهستون H2B دوراً في عملية الـ packaging للدنا وتنظيم انتساخ الدنا وعمليات إصلاحه وتضاعفه وثنائية الصبغيات والتعبير الجيني (١٤٧). تنظم إمكانية الوصول للدنا عبر مجموعة تعديلات ما بعد الترجمة تطرأ على الهستونات تدعى histone code أو إعادة تنظيم الجسيم النووي nucleosome remodeling (١٤٦).

٦-٣-٢- وجود الجين لدى وحيدات الخلية الأخرى

يعتبر جين H2B من الجينات المصانة بشكل كبير عند حقيقيات النوى (١٤٩). يوجد في الحيوانات الأولية كالتريبانوزوما، والبلاسموديوم، والمشعرة المهبلية (١٥٢).

٦-٤-٦- جين H3

٦-٤-٦-١- لمحة عامة عن جين H3

يبلغ طول جين H3 ٣٩٣ زوج أساس. لم يتم حتى الآن نشر تسلسل هذه الجين عند الليشمانية المدارية. توجد في جميع أنواع الليشمانية سواء الليشمانية الكبيرة، والليشمانية الطفلية، والليشمانية البرازيلية، والليشمانية المكسيكية، والليشمانية الدونوفانية. يشفر هذا الجين للهيستون H3 الذي يتألف من ١٣٠ حمضاً أمينياً، ويبلغ وزنه الجزيئي ١٤,٦٣٣ دالتون (١٥٣).

يدخل الهيستون H3 في بنية لب الجسيم النووي الذي يتألف من تجمع ٨ جزيئات من الهيستونات، جزيئين من كل هيستون H2A و H2B و H3 و H4. تتجمع هيستونات H2A و H2B بشكل مثنويات وهيستونات H3 و H4 بشكل رباعيات حيث يلتف على الجسيم النووي ١٤٦-١٤٧ زوج أساس من الدنا (شكل ٧).

يتألف الهيستون H3 من منطقة كروية وذيل طويل عند النهاية الأزوتية. تطراً التعديلات ما بعد الترجمة على منطقة الذيل عند النهاية الأزوتية وتكون أكبر عند الهيستون H3 مقارنة مع باقي الهيستونات (١٤٦).

يلعب الهيستون H3 دوراً في عملية الـ packaging للدنا وتنظيم انتساخ الدنا وعمليات إصلاحه وتضاعفه وثنائية الصبغيات والتعبير الجيني (١٤٧). تنظم إمكانية الوصول للدنا عبر مجموعة تعديلات ما بعد الترجمة تطراً على الهيستونات تدعى histone code أو إعادة تنظيم الجسيم النووي nucleosome remodeling (١٤٦).

٦-٤-٦-٢- وجود الجين لدى وحيدات الخلية الأخرى

يعتبر جين H3 من الجينات المصانة بشكل كبير عند حقيقيات النوى (١٤٩). يوجد الهيستون H3 في الحيوانات الأوالي كالتريبانوزوما، والبلاسموديوم، والمشعرة المهبلية (١٥٤).

٦-٥-٦- H4 جين

٦-٥-٦-١- لمحة عامة عن جين H4

يبلغ طول جين H4 ٣٠٣ زوج أساس. لم يتم حتى الآن نشر تسلسل هذا الجين عند الليشمانية المدارية. يوجد في جميع أنواع الليشمانية سواء الليشمانية الكبيرة، والليشمانية الطفلية، والليشمانية البرازيلية، والليشمانية المكسيكية، والليشمانية الدونوفانية. يشفر هذا الجين للهيستون H4 الذي يتألف من ١٠٠ حمضاً أمينياً، ويبلغ وزنه الجزيئي ١١,٣٦٦ دالتون (١٥٥).

يدخل الهيستون H4 في بنية لب الجسيم النووي الذي يتألف من تجمع ٨ جزيئات من الهيستونات، جزيئين من كل هيستون H2A و H2b و H3 و H4. تتجمع هيستونات H2A و H2B بشكل مثنويات وهيستونات H3 و H4 بشكل رباعيات حيث يلتف على الجسيم النووي ١٤٦-١٤٧ زوج أساس من الدنا (شكل ١٦).

يتألف الهيستون H4 من منطقة كروية وذيل طويل عند النهاية الأزوتية. تطراً التعديلات ما بعد الترجمة على منطقة الذيل عند النهاية الأزوتية (١٤٦). يلعب الهيستون H4 دوراً في عملية الـ packaging للدنا وتنظيم انتساح الدنا وعمليات إصلاحه وتضاعفه وثباتية الصبغيات والتعبير الجيني. تنظم إمكانية الوصول للدنا عبر مجموعة تعديلات ما بعد الترجمة تطراً على الهيستونات تدعى histone code أو إعادة تنظيم الجسيم النووي nucleosome remodeling (١٤٦).

٦-٥-٦-٢- وجود الجين لدى وحيدات الخلية الأخرى

يعتبر جين H4 من الجينات المصانة بشكل كبير عند حقيقيات النوى (١٤٩). يوجد في الحيوانات الأوالي كالتريبانوزوما، والبلاسموديوم، والمشعرة المهبلية (١٥٦).

٦-٦- الدراسات المطبقة على جينات هيستونات اللب النووي أو البروتينات المشفرة من قبلها في تحضير لقاحات ضد الليشمانية

لوحظت أضرار الهيستون H2A بشكل متكرر في مصول الكلاب المصابة بالليشمانية الطفلية (١٣٥).

ترتبط الأضداد البشرية لهيستون H2A لطفيليات الليشمانية بشكل نوعي مع الهيستون H2A للطفيلي بدون أن ترتبط مع هيستونات الثدييات (136).

في الحقيقة بالرغم من أن الهيستون H2A يعتبر من البروتينات المصانة عند حقيقيات النوى، تكون الاستجابة الخلوية للبشر خلال الإصابة الطبيعية محرضة بشكل نوعي ضد البروتين H2A وتكون محرضة من قبل المحددات المستضدية المميزة للبروتين H2A لطفيليات الليشمانية. تتوضع المحددات السابقة في النهايتين الأمينية والكربوكسيلية لهيستون H2A. لوحظت أضداد الهيستون H2A في مصول الكلاب المصابة بالليشمانية الطفيلية عند 78% من الكلاب المصابة، مما يؤكد أن الهيستون H2A مستمع أساسي خلال الإصابة بالليشمانية عند الكلاب المصابة. كما تم التأكد من وجود هذه الأضداد في مصول البشر المصابة بالليشمانية الحشوية (136). مما أوحى بإمكانية أن يشكل التلقيح بهيستونات اللب أداة تشخيصية وقائية تجاه طفيليات الليشمانية (157).

في حين أظهر التمنيع بلقاح دنا يشفر لهيستونات اللب الأربعة لليشمانية قدرة وقائية طويلة الأمد تجاه العدوى بالليشمانية الكبيرة، لم يظهر التمنيع بلقاح دنا يشفر لهيستونين فقط نفس القدرة الاتقائية الطويلة تجاه العدوى بالليشمانية الكبيرة (157). يتعرف الجهاز المناعي على هيستونات الليشمانية خلال طور الإصابة بعد بلعمة الطفيليات من قبل البالعات، حيث يتم التعرف على حواتم مستضدية نوعية من هذه الهيستونات من قبل اللمفاويات البائية والتائية (158).

تترافق العدوى بداء الليشمانيات الحشوي عند الإنسان والكلاب والفئران بزيادة هامة في مستويات الأضداد النوعية لهيستونات (159) (158) (160) (161) (162) (162). تتوضع الحواتم المستضدية الأكثر استمناً في النهايات الأمينية عند الهيستونين H3 و H4 وفي كلا نهايتي الهستونين H2A (162) و H2b (163).

أظهرت الدراسات أن الهيستونين H2A و H3 أكثر استمناً من الهيستونين H2B و H4 وذلك بناء على نسب وجودهم في مصول الكلاب المصابة بداء الليشمانيات الحشوي، حيث شخص H2A عند 72% من الكلاب، و H3 عند 68%، و H2B عند 60%، و H4 عند 44% (162) (164) (165).

أظهر التمنيع بلقاح دنا يشفر لأي من هيستونات اللب الأربعة لليشمانية الطفيلية، استخدم هيستون واحد من الهيستونات الأربعة، تأخراً في تطور الآفة في موقع الإخماج حتى

خمسة أسابيع بعد اختبار التحدي بالليشمائية الكبيرة ولكن لم تلاحظ بعد هذه المدة أية فروق ذات دلالة احصائية مقارنة مع المجموعة الشاهدة سواء من حيث حمل الطفيلي أو تورم القدم المصابه(١٦٦).

وبخلاف ما سبق فقد أظهر لقاح الدنا المشفر لأي هيستونين معاً من هيستونات الليشمائية الطفلية الأربعة، بعد ستة أسابيع من اختبار التحدي بالليشمائية الكبيرة مقارنة مع المجموعة الشاهدة، تراجعاً ذا دلالة احصائية سواء من حيث تورم القدم أو الحمل الطفيلي في الطحال والعقد اللمفية النازحة أو مستوى انتاج الانترلوكين ٤ في العقد اللمفية النازحة. وبذلك أمن هذا اللقاح وقاية جزئية تجاه الإصابة بالليشمائية الكبيرة (١٦٦).

أظهر التمنيع بلقاح دنا يشفر لهيستونات الليشمائية الطفلية الأربعة معاً قدرة عالية على توليد استجابة خلوية نوعية من نمط Th1 تجاه الإصابة بالليشمائية الجلدية وقدرة وقائية دائمة تجاه الإصابة بالليشمائية الجلدية عند فئران BALB/c. حيث لوحظ بعد التحدي بالليشمائية الكبرى، مقارنة مع المجموعة الشاهدة، انتفاخ ضئيل جداً في القدم خلال طور الإخماج، وانخفاضاً ذا دلالة احصائية في الحمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة إلى أن اختفت الطفيليات من الطحال بعد الأسبوع السابع، وارتفاعاً ذا دلالة احصائية في نسبة الخلايا التائية المنتجة للانترفيون غاما IF γ في العقد اللمفية النازحة، وانخفاضاً ذا دلالة احصائية بنسبة الخلايا التائية المنتجة للانترلوكين ٤ في العقد اللمفية النازحة(١٦٦).

بين Iborra أن تمنيع الفئران ببلاسميد يشفر لأربعة هيستونات في الليشمائية الطفلية، حرض استجابة مناعية خلوية نوعية من نمط Th1 وأدى إلى وقايتها من الإصابة بالليشمائية الكبيرة. ترافق ما سبق مع انتاج مرتفع للانترفيرون غاما من قبل اللمفاويات التائية، وانتاج منخفض جداً من الانترلوكين ٤. وسجل وجود مستويات منخفضة من الأضداد لدى الفئران الممنعة وكان النمط السائد منها هو IgG2a والذي يعتبر مؤشراً عن الخلايا Th1، مقارنة مع مستويات عالية من الأضداد في المجموعة الشاهدة حيث كان النمط السائد منها هو IgG1 والذي يعتبر مؤشراً عن الخلايا Th2(١٦٠).

وبالتالي وبناء على العديد من الدراسات التي بينت الأهمية الاستمناعية للبروتينات الداخلة نووية، فقد قمنا باختيار جينات الهيستونات H2A و H2B و H3 و H4، لتصميم لقاح دنا.

II- هدف البحث Aim of study

نظراً لما يشكل داء الليشمانيات من مشكلة صحية هامة في سورية نتيجة للانتشار الكبير لطفيليات الليشمانية، وصعوبة الشفاء العفوي للإصابات الناجمة عن الليشمانية المدارية المنتشرة في سورية، وعدم وجود دواء نوعي آمن وفعال. وبالتالي تكتسب الوقاية من الإصابة، التي تعتمد بشكل رئيسي على وجود لقاح فعال، دوراً هاماً. نظراً للنتائج الإيجابية التي حققتها اللقاحات المعتمدة جينات هيستونات اللب النووي عند أنواع الليشمانية الأخرى بالمقارنة مع اللقاحات الأخرى المعتمدة على أنواع أخرى من الجينات ونظراً لعدم وجود أي بحث حول جينات الهيستونات عند الليشمانية المدارية من حيث وجودها والتعبير الجيني عنها ودورها العلاجي أو الاتقائي من الإصابة بالليشمانية المدارية، فكان لا بد من القيام بهذا البحث بهدف :

- ١- تحري وجود جينات الهيستونات H2A، H2B، H3، H4 عند الليشمانية المدارية المنتشرة في سورية.
- ٢- تحري التعبير الجيني عن هذه الجينات على مستوى الدنا المتمم لطفيليات الليشمانية المدارية.
- ٣- تصميم هذه الجينات كلقاح دنا لدراسة قدرتها المستضدية.
- ٤- سلسلة جينات هيستونات اللب النووي.

III - المواد والطرائق

تم تنفيذ الأهداف السابقة للدراسة من خلال عدة مراحل. تعتمد المرحلة الأولى على إثبات وجود جينات الهيستونات H2A و H2B و H3 و H4 عند سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا وتحري التعبير الجيني عن هذه الجينات على مستوى الدنا المتمم cDNA لليشمانية المدارية. وذلك من خلال كشف وتضخيم الجينات على مستوى الدنا والدنا المتمم باستخدام تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR .

تعتمد المرحلة الثانية على تحضير هذه الجينات كلقاح دنا وذلك من خلال تنقية منتجات تضخيم الجينات وإدخال الدنا المتمم cDNA لهذه الجينات ضمن بلاسميد مناسب وذلك بهضم كل من الجين والبلاسميد بنفس إنزيمي الإقتطاع ثم إجراء تفاعل الربط ومن ثم تكثير البلاسميد المؤشب عبر إدخاله ضمن جراثيم الإشريكية الكولونية TOP 10 واستخلائه من هذه الجراثيم.

تمت هذه الدراسة بالتعاون بين كلية الصيدلة ومركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانية وهيئة التقانة الحيوية وكلية العلوم.

تم تنفيذ ما سبق وفق الخطوات التالية:

١- إثبات وجود الجينات المختارة ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا

- تصميم المشاريع النوعية لكل جين بعد مقارنة تسلسل الجين بين أنواع الليشمانية المختلفة، واختيار البلاسميد الملائم وإنزيمات الاقتطاع التي ستستخدم في مرحلة التأشيب.
- استخلاص الدنا الجينومي من طفيليات الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا.
- نمذجة تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR وتطبيقه لتضخيم الجينات المختارة باستخدام المشاريع النوعية بكل جين.
- الترحيل الكهربائي لكشف منتجات التضخيم وتحديد حجمها.

٢- إثبات التعبير الجيني عن الجينات المختارة

- استخلاص الرنا من طفيليات الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا.
- تحويل RNA إلى cDNA.
- تحري التعبير الجيني عن الجينات المختارة بتضخيم الدنا المتمم cDNA للجينات من خلال تفاعل البوليميراز السلسلي واستخدام المشاع النوعية بكل جين.
- الترحيل الكهربائي لكشف منتجات التضخيم وتحديد حجمها.

٣- تحضير البلاسميد المأشوب بالجين لاستخدامه كلقاح دنا

- تنقية نواتج تضخيم cDNA لكل جين.
 - إجراء تفاعل التهضيم لكل من الجين والبلاسميد بإنزيمات الاقترع المختارة.
 - إجراء تفاعل الربط Ligation للبلاسميد والجين.
 - تكثير البلاسميدات المأشوبة من خلال إدخالها إلى جراثيم كفيئة Ecoli TOP 10 بعملية الاستحالة transformation.
 - استخلاص البلاسميد المأشوب من جراثيم Ecoli TOP 10، والتأكد من وجود الجين ضمن البلاسميد من خلال إجراء تفاعل PCR باستخدام المشاع النوعية لكل جين، ومن ثم تهضيم البلاسميد وترحيل ناتج التهضيم لتحري وجود عصابة الجين.
- تم تنفيذ المخط السابق وفقاً للترتيب الآتي.

١- إثبات وجود الجينات المختارة ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا

يجب في البداية الإشارة إلى عدم نشر تسلسل جينوم الليشمانية المدارية بشكل كامل حتى الآن وعدم وجود أي دراسة تشير إلى وجود الجينات المختارة في دراستنا في جينوم الليشمانية المدارية.

يتطلب إثبات وجود هذه الجينات استخدام مشاريع نوعية تسمح بتضخيمها بواسطة تفاعل PCR وتظهرها بواسطة الرحلان الكهربائي. في الحقيقة يتطلب تصميم هذه المشاريع مقارنة تطابق تسلسلات الجينات المختارة لدى الأنواع الأخرى من الليمشمانية.

١-١- اختيار البلاسميد وتصميم المشاريع النوعية للجينات المختارة واختيار إنزيمات الاقتطاع المناسبة باستخدام تطبيقات المعلوماتية الحيوية

نظراً لعدم وجود تسلسلات منشورة لجينات H2A، و H2B، و H3، و H4 في جينوم الليمشمانية المدارية، فقد أجريت دراسة حاسوبية لتسلسلات هذه الجينات عند أنواع أخرى من الليمشمانية كالليمشمانية الكبيرة، والدونوفانية، والطفلية، والبرازيلية، والمكسيكية. سمحت الدراسة الحاسوبية بمعرفة مدى التطابق بين تسلسلات كل جين في هذه الأنواع، ومدى التطابق بين هذه التسلسلات والجينوم البشري، وتصميم المشاريع النوعية لتضخيم كل جين. تمت دراسة هذه التسلسلات باستخدام برنامجي Vector NTI Express و CLC free workbench 7، والتطبيقات التالية :

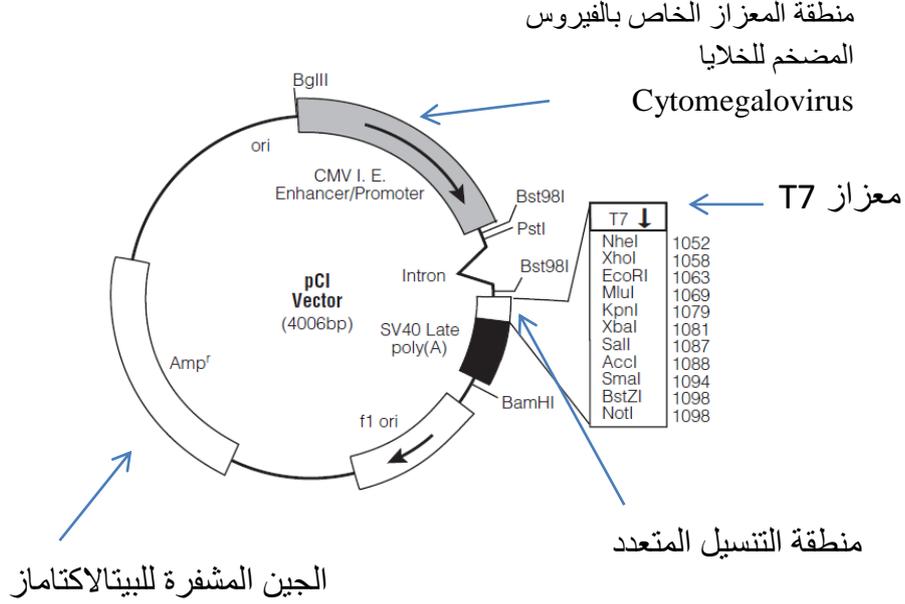
أ- http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustal_w2-l20131227-140338-0512-30396697-oy

ب- http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html

١-١-١- البلاسميد المستخدم في الدراسة

تم اختيار البلاسميد PCI plasmid في دراستنا. يستخدم البلاسميد PCI بشكل عام للتعبير المؤقت أو الدائم عن الجين المدخل إليه. يبلغ حجم البلاسميد ٤٠٠٦ زوج أساس ويتألف من مجموعة من الأجزاء التالية تبدأ بمنطقة المعزاز الخاص بالفيروس المضخم للخلايا Cytomegalovirus الذي يؤمن تعبيراً قوياً ومستمراً في العديد من الأنماط الخلوية. تليها منطقة الإنترون β - globin/IgG chimeric intron المتوضعة نزلاً downstream بعد منطقة المعزاز حيث يؤمن الإنترون المرافق لأي دنا متمم cDNA مدخل زيادة في التعبير عن الجين. ثم منطقة المعزاز T7 Promoter، الذي يمكن استخدامه لاصطناع نسخ رنا في الزجاج باستخدام T7 RNA Polymerase. ثم منطقة التنسيل المتعدد Multiple Cloning Region التي تؤمن إدخالاً سهلاً للدنا المتمم cDNA. تليها منطقة SV40 Late Polyadenylate، تعطي

هذه المنطقة إشارة Polyadenylation تنهي عملية النسخ وتضيف ٢٠٠-٢٥٠ ثمالة أدينوزين تؤمن ثباتية وترجمة الرنا المرسل.



الشكل ١٧. بنية البلاسميد PCI وفقاً لشركة بروميغا.

تليها منطقة Plasmid Replicon and Origin of Replication f1 التي تنتج دنا مفرد الطاق (ssDNA) single-stranded DNA. وأخيراً منطقة الجين المشفرة للبيتالاكتاماز التي تسمح للجراثيم الحاوية على البلاسميد بالنمو على أوساط تحوي الأميسيلين (من البيتالاكتام).

٢-١-١- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لكل جين

صممت المشاريع يدوياً باستخدام التطبيقات التالية

أ- <http://www.idtdna.com/calc/analyzer>

ب- http://www.geneinfinity.org/sms/sms_primanalysis.html

تم تصنيع مشاريع عالية النقاوة وفقاً للتسلسلات التي قمنا باختيارها من قبل شركة

VBC- Biotech، فيينا.

بعد أن صممت المشاريع التي ستستخدم في التنسيل، تم اختيار إنزيمات الاقتطاع،

اعتماداً على تسلسل التنسيل لهذا البلاسميد الموضح بالشكل ١٨، وتمت إضافة تسلسلات

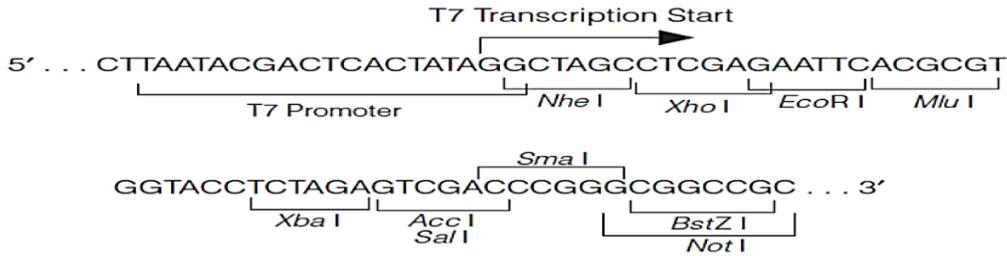
التعرف الخاصة بها إلى المشاريع وفقاً للشروط التالية:

١- ألا تكون تسلسلات التعرف recognition site لكل من الإنزيمين موجودة ضمن تسلسل الجين حتى لا يتم هضم التسلسل المراد تنسيه. تم ما سبق باستخدام برنامج CLC Free Workbench 7 والموقع <http://rna.lundberg.gu.se/cutter> الذي يحدد لنا فيما اذا كان إنزيم الإقتطاع يقطع تسلسل الجين أم لا.

٢- أن يكون لكلا الإنزيمين الوقاء ذاته الذي يؤمن فعالية تهضيم بنسبة ١٠٠% باستخدام الموقع <http://www.THermoscientificbio.com/webtools/doubledigest> الذي يحدد لنا وقاءات الهضم الملائمة لفعالية إنزيمي الإقتطاع.

٣- مراعاة ترتيب مواقع إنزيمي الإقتطاع، الشكل ١٨، ضمن تسلسل التنسيل Cloning sequence للبلاسميد بحيث يكون تسلسل التعرف لإنزيم الإقتطاع الوارد أولاً في البلاسميد متصلاً بالمشرع المباشر forward primer وتسلسل التعرف لإنزيم الإقتطاع الثاني متصلاً بالمشرع العكسي reverse primer ليتم الانتساخ وفق الاتجاه الصحيح المشار إليه في الشكل ١٨.

٤- ألا تتجاوز ΔG للمشارع بعد ربطها بتسلسلات التعرف الخاصة بإنزيمات الإقتطاع قيمة -8 kcal/mole ، كي يسهل فصل المثنويات والمثنويات المغايرة heterodimer.



الشكل ١٨. منطقة تسلسلات التعرف لإنزيمات الإقتطاع ضمن البلاسميد PCI.

أ- تصميم المشارع واختيار إنزيمات الإقتطاع لجين H2A

تم ترصيف Alignment تسلسلات هذا الجين المعروفة عند أنواع الليشمانية الطفلية، والدونوفانية، والكبيرة، والمكسيكية والبرازيلية. كما تم ترصيف التسلسلات على

مستوى ذراري هذه الأنواع. بين الترصيف وجود نسب ارتصاف عالية ترواحت بين ٩١-١٠٠%. اعتمد تسلسل جين H2A لليشمانيّة الكبيرة ذو الرقم XM_003722207.1 وتسلسل جين H2A لليشمانيّة الطفلية ذو الرقم XM_003392413 في تصميم المشاريع حيث بلغت نسبة التطابق بينهما ٩٤%. يعود اعتمادنا لهذين التسلسلين لكونهما الأكثر تكراراً بين الأنواع والذراري وبالتالي زيادة احتمالية مطابقتها لتسلسل هذه الجين ضمن جينوم الليشمانيّة المدارية، ولكون هذين النوعين يسببان إصابة جلدية تشبه الإصابة التي تسببها الليشمانيّة المدارية. باستخدام برنامج CLC Free Workbench 7، اختيرت المنطقة open reading frame من الجين H2A، وهي التسلسل الذي يعبر عنه. هذا وشملت ORF كامل الجين.

تم تحديد المشاريع المباشرة والعكسية المبدئية لجين H2A

المشروع الأول 5'- ATG GCT ACT CCT CGC AGC G -3'

المشروع العكسي الأول 5'- CTAAGCGCTCGGTGTCGCCTTG -3'

المشروع العكسي الثاني 5'- TTA CGC GCT CGG TGT CGC CTT G-3'

تم تصميم مشرعين عكسيين بناءً على الاختلافات الموجودة في منطقة المشراع العكسي في تسلسل هذه الجين بين أنواع الليشمانيّة المختلفة، ولزيادة احتمالية ملائمة المشاريع العكسية لتسلسل هذه الجين في الليشمانيّة المدارية.

Conditions for Restriction Enzymes in Thermo Scientific Five Buffer System

Enzyme	Recommended buffer	Units for overnight incubation	Thermal inactivation	Restriction enzyme activity, %					
				B	G	O	R	Tango™	
								1X	2X
EcoRI		0.2	65°C	NR(0-20)	NR	100	100*	NR	100
Tango™		0.1	65°C	50-100	50-100	20-50	NR(0-20)	100	50-100

الشكل ١٩. الدارئة الملائمة لإنزيمي الاقتطاع ECORIXBAI التي تؤمن فعالية هضم ١٠٠%. بعد تصميم التسلسلات البدئية للمشارع، تم اختيار إنزيمات الاقتطاع بعد مراعاة الشروط التي سبق ذكرها. تم اختيار الإنزيمين ECORI و XbaI، أضفنا تسلسل تعرف الإنزيم ECORI في بداية المشراع المباشر، وأضفنا تسلسل تعرف الإنزيم XbaI في بداية المشراع العكسي. تم اختيار الدارئة Tango 2X مع زيادة كمية إنزيم XbaI

المستخدمة في عملية الهضم إلى الضعفين لتأمين فعالية هضم تساوي ١٠٠%.

التسلسل النهائي للمشاريع اللازمة لتضخيم جين H2A

المشروع الأمامي 5'- ATTA GAATTC ATG GCT ACTCCTCGCAGCG-3'

المشروع العكسي الأول 5'- CT TCTAGA CTAAGCGCTCGGTGTCGCCTTG-3'

المشروع العكسي الثاني 5'- CT TCTAGA TTA CGC GCT CGG TGT CGC CTT G-3'

تسلسل التعرف لإنزيم ECORI: GAATTC

تسلسل التعرف لإنزيم XBAI: TCTAGA

تمت إضافة الأسس ATTA للمشروع المباشر، والأساسين CT للمشروع العكسي الأول والثاني من أجل زيادة فعالية الهضم للإنزيمات وذلك بناء على التعليمات المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتطاع. وتم إعادة الاختبارات، اختبارات حدوث المثنويات والمثنويات المتغايرة، على التسلسلات النهائية للمشاريع.

ب- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لجين H2B

تم إجراء ترصيف Alignment لتسلسلات هذا الجين المعروفة بباقي أنواع الليشمانية الكبيرة، والدونوفانية، والبرازيلية، والطفلية، والمكسيكية وحصاننا على نسب ارتصاف عالية تراوحت بين ٩٠,٩-١٠٠%. اعتمد تسلسل H2B لليشمانية الكبيرة ذو الرقم AF336276.1 وتسلسل H2B لليشمانية الطفلية ذو الرقم XM_001463561.1 في تصميم المشاريع وبلغت نسبة التطابق بينهما ٩٧,٣%. يعود اعتمادنا لهذين التسلسلين لكونهما الأكثر تكراراً بين الأنواع والذري وبالتالي زيادة احتمالية مطابقتهما لتسلسل هذا الجين ضمن جينوم الليشمانية المدارية، ولكون هذين النوعين يسببان إصابة جلدية تشبه الإصابة التي تسببها الليشمانية المدارية. باستخدام برنامج CLC Free Workbench 7، اختيرت المنطقة open reading frame من الجين H2B، وهي التسلسل الذي يعبر عنه. هذا وشملت ORF كامل الجين.

تم تحديد المشاريع المباشرة والعكسية المبدئية لجين H2B:

المشروع الأول 3'- ATG GCC TCT TCT CGC TCT GC -5'

المشروع العكسي الأول 3'- TCAAGCCGACGCGCTCGAC -5'

المشروع العكسي الثاني 3'- TCA ACG CGA CGC GCT CGA C -5'

تم تصميم مشرعين عكسيين بناءً على الاختلافات الموجودة في منطقة المشراع العكسي في تسلسل هذا الجين بين أنواع الليشمانية المختلفة، ولزيادة احتمالية ملائمة المشراع العكسي لتسلسل هذه الجين في الليشمانية المدارية والذي لا يزال غير معروف حتى الآن.

بعد تصميم التسلسلات البدئية للمشراع، تم اختيار إنزيمات الاقتران بعد مراعاة الشروط التي سبق ذكرها. تم اختيار الإنزيمين ECORI و Xbal، أضفنا تسلسل تعرف الإنزيم ECORI في بداية المشراع المباشر، وأضفنا تسلسل تعرف الإنزيم Xbal في بداية المشراع العكسي. تم اختيار الدائرة Tango 2X مع زيادة كمية إنزيم Xbal المستخدمة في عملية الهضم إلى الضعفين لتأمين فعالية هضم تساوي ١٠٠% (شكل ١٩).

التسلسل النهائي للمشراع اللازمة لتضخيم جين H2B

المشروع المباشر 3'- ATAGAATTCATG GCC TCT TCT CGC TCT GC -5'

المشروع العكسي الأول 3'- CT TCTAGA TCAAGCCGACGCGCTCGAC -5'

المشروع العكسي الثاني 3'- AT TCTAGATCA ACG CGA CGC GCT CGA C -5'

تسلسل التعرف لإنزيم ECORI :GAATTC

تسلسل التعرف لإنزيم XBAI :TCTAGA

تمت إضافة الأسس ATA للمشراع المباشر، والأساسين CT للمشراع العكسي الأول والأساسين AT للمشراع العكسي الثاني من أجل زيادة فعالية الهضم للإنزيمات وذلك بناء على التعليمات المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتران. وتم إعادة الاختبارات، اختبارات حدوث المتنويات والمتنويات المتغايرة، على التسلسلات النهائية.

ج- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لجين H3

تم إجراء ترصيف Alignment لتسلسلات هذا الجين المعروفة بباقي أنواع الليشمانية الكبيرة، والدونوفانية، والبرازيلية، والطفلية، والمكسيكية وحصلنا على نسب ارتصاف عالية ترواحت بين ٩٦,٤-١٠٠%. واعتمد تسلسل جين H3 XM_001463703.1 وتسلسل جين H3 XM_001682087.1 في تصميم المشاريع وبلغت نسبة التطابق بينهما ٩٨,٢%. يعود اعتمادنا لهذين التسلسلين لكونهما الأكثر تكراراً بين الأنواع والذراري وبالتالي زيادة احتمالية مطابقتها لتسلسل هذه الجين ضمن جينوم الليشمانية المدارية، ولكون هذين النوعين يسببان إصابة جلدية تشبه الإصابة التي تسببها الليشمانية المدارية. باستخدام برنامج CLC Free Workbench 7، اختيرت المنطقة open reading frame من الجين H3، وهي التسلسل الذي يعبر عنه. هذا وشملت ORF كامل الجين.

تم تحديد المشاريع المباشرة والعكسية المبدئية لجين H3

المشروع المباشر 3'- ATG TCC CGC ACC AAG GAG A -5'

المشروع العكسي الأول 3'- TTAGTGGCGCTCACCGC -5'

المشروع العكسي الثاني 3'- CTA GTG CCG CTC ACC GC -5'

تم تصميم مشرعين عكسيين بناءً على الاختلافات الموجودة في منطقة المشرع العكسي في تسلسل هذه الجين بين أنواع الليشمانية المختلفة، ولزيادة احتمالية ملائمة المشاريع العكسية لتسلسل هذا الجين في الليشمانية المدارية والذي لا يزال غير معروف حتى الآن.

بعد تصميم التسلسلات البدئية للمشاريع، تم اختيار إنزيمات الاقتطاع بعد مراعاة الشروط التي سبق ذكرها. تم اختيار الإنزيمين XbaI وSAL I، أضفنا تسلسل تعرف الإنزيم XbaI في بداية المشرع المباشر، وأضفنا تسلسل تعرف الإنزيم SAL I في بداية المشرع العكسي. تم اختيار الدائرة Tango 2X مع زيادة كمية إنزيم SAL I المستخدمة في عملية الهضم إلى الضعفين لتأمين فعالية هضم تساوي ١٠٠%.

Reaction Conditions for Restriction Enzymes in Thermo Scientific Five Buffer System

	Incubation temp.	Recommended buffer	Units for overnight incubation	Thermal inactivation	Restriction enzyme activity, %					
					B	G	O	R	Tango Buffer	
									1X	2X
Sall	37°C	O	0.1	65°C	NR(0-20)	NR(0-20)	100	20-50	NR(0-20)	50-100
XbaI	37°C	Tango	0.1	65°C	50-100	50-100	20-50	NR(0-20)	100	50-100

الشكل ٢٠. الدائرة الملائمة لإنزيمي الاقتطاع XBAlSAl التي تؤمن فعالية هضم ١٠٠%. التسلسل النهائي للمشروع اللازمة لتضخيم جين H3

المشروع المباشر 3'-TATCTAGAATG TCC CGC ACC AAG GAG A-5'

المشروع العكسي الأول 3'-ATT GTCGAC TTAGTGGCGCTCACCGC-5'

المشروع العكسي الثاني 3'-ATTGTCGACCTA GTG CCG CTC ACC GC-5'

تسلسل التعرف لإنزيم XBAI :TCTAGA

تسلسل التعرف لإنزيم SALI :GTCGAC

تمت إضافة الأساسين TA للمشروع المباشر، والأسس ATT للمشروع العكسي الأول والثاني من أجل زيادة فعالية الهضم للإنزيمات وذلك بناء على التعليمات المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتطاع. وتم إعادة الاختبارات، اختبارات حدوث المثنويات والمثنويات المتغايرة، على التسلسلات النهائية للمشروع.

د- تصميم المشاريع واختيار إنزيمات الاقتطاع لجين H4

تم إجراء ترصيف Alignment لتسلسلات هذا الجين المعروفة بباقي أنواع الليشمانية الكبيرة، والدونوفانية، والبرازيلية، والطفلية، والمكسيكية، وحصلنا على نسب ارتصاف عالية تراوحت بين ٩٢-١٠٠% وبلغت نسبة التطابق بينهما ٩٨,٣%. واعتمد تسلسل H4 XM_001467608.1 وتسلسل H4 XM_003721559.1 في تصميم المشروع. يعود اعتمادنا لهذين التسلسلين لكونهما الأكثر تكراراً بين الأنواع والذري وبالتالي زيادة احتمالية مطابقتها لتسلسل هذه الجين ضمن جينوم الليشمانية المدارية، ولكون هذين النوعين يسببان إصابة جلدية تشبه الإصابة التي تسببها الليشمانية المدارية.

باستخدام برنامج 7 CLC Free Workbench، اختيرت المنطقة open reading frame من الجين H4، وهي التسلسل الذي يعبر عنه. هذا وشملت ORF كامل الجين.

تم تحديد المشاريع المباشرة و العكسية المبدئية لجين H4.

المشروع المباشر '3'- ATG GCC AAG GGC AAG CGC TC -5'

المشروع العكسي الأول '3'- TTACGCGTAGCCGTAGAGGATG -5'

المشروع العكسي الثاني '3'- TTACGCGTAGCCGTACAGGATG -5'

تم تصميم مشرعين عكسيين بناءً على الاختلافات الموجودة في منطقة المشرع العكسي في تسلسل هذا الجين بين أنواع الليشمانية المختلفة، ولزيادة احتمالية ملائمة المشاريع العكسية لتسلسل هذا الجين في الليشمانية المدارية والذي لا يزال غير معروف حتى الآن.

بعد تصميم التسلسلات البدئية للمشارع، تم اختيار إنزيمات الاقتطاع بعد مراعاة الشروط التي سبق ذكرها. تم اختيار الإنزيمين ECORI و Xbal، أضفنا تسلسل تعرف الإنزيم ECORI في بداية المشرع المباشر، وأضفنا تسلسل تعرف الإنزيم Xbal في بداية المشرع العكسي. تم اختيار الدائرة Tango 2X مع زيادة كمية إنزيم Xbal المستخدمة في عملية الهضم إلى الضعفين لتأمين فعالية هضم تساوي ١٠٠% (شكل ١٢).

التسلسل النهائي للمشارع اللازمة لتضخيم جين H4:

المشروع المباشر '3'- ATCA GAATTCATG GCC AAG GGC AAG CGC TC -5'

المشروع العكسي الأول '3'- ATGTCTAGA TTACGCGTAGCCGTAGAGGATG -5'

المشروع العكسي الثاني '3'- ATGTCTAGA TTACGCGTAGCCGTACAGGATG -5'

تسلسل التعرف لإنزيم ECORI :GAATTC

تسلسل التعرف لإنزيم XBAI :TCTAGA

تمت إضافة الأسس ATCA للمشرع المباشر والأسس ATG للمشرع العكسي الأول والثاني من أجل زيادة فعالية الهضم للإنزيمات وذلك بناء على التعليمات المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتران. وتم إعادة الاختبارات، اختبارات حدوث المثنويات والمثنويات المتغيرة، على التسلسلات النهائية للمشاريع. بعد الانتهاء من وضع الأسس النظرية للدراسة ننتقل للخطوات العملية.

٢-١- تضخيم الجينات المختارة باستخدام المشاريع النوعية لكل جين على مستوى الدنا والدنا المتمم

في حين يهدف تضخيم الجينات على مستوى الدنا إلى إثبات وجود الجينات المختارة ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا، يهدف تضخيم الجينات على مستوى الدنا المتمم إلى تحري التعبير الجيني عن هذه الجينات. وسنستعرض المراحل اللازمة لتضخيم الجينات.

١-٢-١- استخلاص الدنا من طفيليات الليشمانية

تم استخدام مشيقات ذرية strain من طفيليات الليشمانية المدارية L.tropica المأخوذة من مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانية. عُزل الدنا من الطفيليات المزروعة على وسط RPMI-1640 لشركة Lonza الأمريكية والمدعم بمصل العجل الجنيني منزوع المتمة لشركة Cytogen الألمانية، باستخدام عتيدة عزل الدنا من شركة ThermoScientific الأمريكية. يتطلب الاستخلاص بالعتيدة أن يتوفر أيضاً دائرة Phosphate-buffered saline (PBS) من شركة Panreac الاسبانية، ودائرة Tris EDTA buffer (TE).

أ- تحضير الدائرات المستخدمة في الاستخلاص

• تحضير دائرة Tris EDTA buffer (TE)

تم تحضير ٥٠ مل من هذه الدائرة وفقاً لما يلي.

المادة	الكمية المطلوبة	التركيز النهائي
تريس المحمض بحمض كلور الماء Tris-Hcl	٦٠,٥٧ ملغ	Mm ١٠
EDTA	١٨,٦١٢ ملغ	Mm ١
PH		٨

لتحضير ٥٠ مل يتم وزن الكميات السابقة على الميزان الحساس، ثم تحل هذه الكميات في ٢٥ مل ماء مقطر، ثم يكمل الحجم إلى ٥٠ مل وتضبط درجة الباهاء pH عند الدرجة ٨ بإضافة حمض كلور الماء M1. توضع الدارئة في عبوة زجاجية نظيفة وتعقم بالصاد الموصد ثم تحفظ بالبراد بعد وضع لصاقة تدل على اسم الدارئة، ودرجة الباهاء pH، وتاريخ التحضير.

• تحضير دارئة الغسل I (wash buffer I)

توجد هذه الدارئة ضمن العتيدة المستخدمة لعزل الدنا بشكل محلول حجمه ١٠ مل. يجب إضافة ٣٠ مل من الإيتانول المطلق إلى محلول الدارئة كي يصبح جاهزاً للاستخدام، ويجب وضع علامة على العبوة للإشارة بأنه تم تمديدها.

• تحضير دارئة الغسل II (wash buffer II)

توجد هذه الدارة ضمن العتيدة المستخدمة لعزل الدنا بشكل محلول حجمه ١٠ مل. يجب إضافة ١٠ مل من الإيتانول المطلق إلى محلول الدارئة كي يصبح جاهزاً للاستخدام، ويجب وضع علامة على العبوة للإشارة بأنه تم تمديدها.

ب- بروتوكول عزل الدنا

- ثفلت ٥ مل من مستنبت لمشيقات سلاتنا لليثمانية المدارية، في طور الاستتباب ويبلغ ٢٠ مليون طفيلي / مل، وُثقل بسرعة ٥٠٠٠ دورة/ د لمدة ٥ دقائق. تم التخلص من الطافي ثم غسلت الرسابة بـ ٥ مل من الدارئة الفوسفاتية الملحية .PBS
- علقت الرسابة بـ ٥٠٠ مكل من دارئة الحل lysis buffer ثم أضيف ٢٠ مكل من RNase A وحضنت العينة بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ١٠ دقائق. استخدمت دارئة الحل ومحلول RNase A الموجود ضمن عتيدة عزل الدنا.

- أضيفت ٢٥ مكل من البروتيناز K الموجود ضمن عتيدة عزل الدنا، وحُضنت لمدة ساعة في حمام مائي لشركة JSR الكورية الجنوبية، بدرجة حرارة ٥٦م.
- أضيفت ٢٠٠ مكل من الإيتانول المطلق لترسيب الدنا ومزجت لمدة ١٥ ثانية.
- نُقلت العينة كاملة، أي السائل الطافي مع الدنا المترسب، ووضعت على عمود السيليكا. نُقل العمود لمدة دقيقة واحدة بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/الدقيقة على أنبوب بسعة ٢ مل، فبقي الدنا المترسب بالإيتانول عالقاً على فلتر عمود السيليكا، ورُمي السائل المتجمع في أنبوب الجمع.
- نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب جمع آخر سعة ٢ مل ورُمي أنبوب الجمع الأول.
- أضيف إلى العمود ٥٠٠ مكل من دائرة الغسيل washing buffer I الممددة بالإيتانول وتُقل لمدة دقيقة بسرعة ٨٠٠٠ دورة/الدقيقة.
- نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب جمع آخر وأضيف إلى العمود ٥٠٠ مكل من دائرة الغسيل washing buffer II الممدد بالإيتانول وتُقل لمدة ٣ دقائق بسرعة التنفيل القصوى ١٢٠٠٠ دورة/الدقيقة.
- نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب ابندورف مقصوص الغطاء بسعة ٢ مل أيضاً، ثم تُقل دقيقة بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/الدقيقة للتأكد من التخلص من كل آثار دائرة الغسل II.
- نُقل عمود السيليكا إلى أنبوب تنفيل سعة ١.٥ مل وأضيف له ٢٠٠ مكل من دائرة الشطف elution buffer لشطف الدنا العالق بالعمود، ثم حُضن بدرجة حرارة المخبر لمدة دقيقتين، وتُقل لمدة دقيقة بسرعة ٨٠٠٠ دورة/الدقيقة.
- نُقل محتوى الأنبوب إلى أنبوب ابندورف جديد وضعت عليه لصاقة تدل على اسم العينة وتاريخ العزل وحُفظ في الدرجة - ٢٠م.

٢-٢-١- استخلاص الرنا RNA من طفيليات الليشمانية

تم استخلاص الرنا من طفيليات الليشمانية باستخدام عتيدة عزل الرنا GeneJET RNA purification من شركة ThermoScientific الأمريكية.

أ- تحضير المحاليل والدارئات المستخدمة بالعزل

- تحضير دائرة الحل lysis Buffer

تزود الكمية المطلوبة من وقاء الحل ب β -mercaptoeThanol حيث يضاف 20μ من $14.3M \beta$ -mercaptoeThanol لكل 1 ml من وقاء الحل المطلوب .

• تحضير محلول Proteinase K

يتمدد 10μ من Proteinase K مع 590μ من وقاء 10 mM Tris TE .
(HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)

• تحضير محاليل الغسل

يتم إضافة 10 ml من الإيتانول 100% إلى وقاء الغسل 1 و 39 ml من وقاء الغسل 2 قبل الاستخدام.

ب- بروتوكول الاستخلاص

١- أخذ 5 ml من مستنبت الطفيلي وهو في طور الاستنباب (4×10^4 خلية)، ووضعت في أنبوب التنفيل 1.5 ml ثم تنفل لمدة دقيقتين بسرعة $12000 \times g$ ويرمى الطافي . تشطف الخلايا بالوقاء الفوسفاتي الملحي PBS لإزالة بقايا الوسط الزراعي . تعاد خطوات التنفيل ويرمى الطافي .

٢- تعلق الخلايا ب 100 ميكروليتر من الوقاء الحال.

٣- تحضن بدرجة حرارة 30 لمدة 30 دقيقة.

٤- يضاف 300 ميكروليتر من الوقاء الحال المضاف له β -mercaptoeThanol ويتم المزج بواسطة الميكروبيبيت.

٥- يضاف 600 ميكروليتر من Proteinase K الممدد، يمزج ويحضن بدرجة حرارة $50-60$ لمدة 10 دقائق.

٦- يثقل لمدة 10 دقائق بسرعة $12000 \times g$ وينقل الطافي إلى أنبوب تنفيل خالي من RNase .

٧- يضاف 450 ميكروليتر من الإيتانول 100% وتمزج بالميكروبيبيت.

٨- ينقل ٧٠٠ ميكروليتر من المحلول لعمود تنقية الرنا الموضوع ضمن أنبوب الجمع ثم يثقل العمود لمدة دقيقة بسرعة $12000 \times g$ ويرمى السائل المتدفق من العمود Flow- Through ثم يعاد وضع عمود التنقية بأنبوب الجمع. تعاد هذه الخطوة حتى يتم نقل كافة كمية المحلول الى العمود ويتم تثقيها.

ثم يرمى أنبوب الجمع الحاوي على محلول السائل المتدفق من العمود، ويوضع عمود التنقية بأنبوب جمع جديد ٢ مل.

٩- يضاف ٧٠٠ ميكروليتر من وقاء الغسل ١ (المزود بالايثانول) لعمود التنقية ويثقل لمدة دقيقة بسرعة $12000 \times g$ يرمى السائل المتدفق من العمود ثم يعاد عمود التنقية إلى أنبوب الجمع.

١٠- يضاف ٦٠٠ ميكروليتر من وقاء الغسل ٢ (المزود بالايثانول) لعمود التنقية ويثقل لمدة دقيقة بسرعة $12000 \times g$ يرمى السائل المتدفق من العمود ثم يعاد عمود التنقية إلى أنبوب الجمع.

١١- يضاف ٢٥٠ ميكروليتر من وقاء الغسل ٢ لعمود التنقية ويثقل لمدة دقيقتين بسرعة $12000 \times g$

يرمى أنبوب الجمع الحاوي على السائل المتدفق من العمود وينقل عمود التنقية إلى أنبوب تثقيل عقيم خالي من RNase ذو سعة ١.٥ مل.

١٢- يضاف ١٠٠ ميكروليتر من الماء الخالي من النكلياز إلى غشاء عمود التنقية ثم يثقل لمدة دقيقة بسرعة $12000 \times g$ لازالة الرنا.

١٣- يرمى عمود التنقية ويحفظ الرنا المنقى في أنبوب ابندورف جديد عليه لصاقة تدل على اسم العينة و تاريخ العزل بحرارة -٢٠ او -٧٠ لحين الاستخدام.

تم قياس نقاوة الرنا المصطنع باستخدام جهاز NANO DROP من شركة ThermoScientific الأميركية ورحل على هلامة آغاروز ١% لتقييم جودة الرنا.

٣-٢-١- اصطناع الدنا المتمم cDNA

تم اصطناع الدنا المتمم من الرنا المستخلص من طفيليات الليشمانية المدارية باستخدام عتيدة اصطناع الدنا المتمم RevertAid First Strand cDNA Synthesis من شركة Thermo Scientific الأمريكية.

أ- مكونات عتيدة الاصطناع

هذا الطاقم معد لاصطناع الدنا المتمم من 100 عينة. ويحوي 10 أنابيب:

- أنبوب يحوي الأنزيم بحجم ١٢٠ مكل RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase بتركيز ٢٠٠ وحدة/مكل.
 - أنبوب يحوي ١٢٠ مكل من RiboLock RNase Inhibitor بتركيز ٢٠ وحدة/مكل.
 - أنبوب يحوي ٥٠٠ مكل من Reaction Buffer بتركيز 5X تتألف هذه الدارئة من ٢٥٠ ميلي مولار تريس - HCl بدرجة باهاء pH=8.5، و ٢٥٠ ميلي مولار كلور المغنيزيوم MgCl₂، و ٢٠ ميلي مولار كلور البوتاسيوم KCl، و ٥٠ ميلي مولار.
 - أنبوب يحوي ٢٥٠ مكل من dNTP Mix.
 - أنبوب يحوي ١٢٠ مكل من Oligo(dT)18 Primer بتركيز ١٠٠ ميكرومولار.
 - أنبوب يحوي ١٢٠ مكل من Random Hexamer Primer بتركيز ١٠٠ ميكرومولار.
 - أنبوب يحوي ٢٠ مكل من Forward GAPDH Primer بتركيز ١٠ ميكرومولار وتسلسله 3' - CAAGGTCATCCATGACAACTTTG - 5'.
 - أنبوب يحوي ٢٠ مكل من Reverse GAPDH Primer بتركيز ١٠ ميكرومولار وتسلسله 3' - GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 5'.
 - أنبوب يحوي ٢٠ مكل من Control GAPDH RNA بتركيز ٠,٠٥ مكغ/مكل وهو 1.3 kb 3'-poly(A) tailed RNA transcript.
 - أنبوبين يحوي كل واحد منهما ١,٢٥ مل من الماء الخالي من النكلياز Water, nuclease- free.
- تحفظ هذه العتيدة بدرجة حرارة -٢٠⁰ م.

ب- بروتوكول الاصطناع

١. أخرجت العينات من المجمدة ووضعت تحت الخيمة العقيمة حتى تمام الانحلال في درجة حرارة الغرفة.
٢. يضاف ١ مكل من Oligo(dT)18 Primer إلى الأنبوب السابق. يكمل الحجم بالماء الخالي من النكلياز إلى ١٢ مكل. يمزج بهدوء ويثقل بشكل مختصر ويحضن بدرجة حرارة ٦٥ م° لمدة ٥ دقائق. ثم يبرد بوضع الأنبوب في الثلج.
٣. يضاف ٤ مكل من 5X Reaction Buffer، و ١ مكل من RiboLock RNase Inhibitor، و ٢ مكل من dNTP Mix، و ١ مكل من الأنزيم RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase فيصبح الحجم النهائي للعينات ٢٠ مكل. يمزج بلطف تحضن بدرجة حرارة ٤٢ م° لمدة ٦٠ دقيقة.
٤. تم انهاء التفاعل بالتسخين العينة في حمام مائي درجة حرارته ٧٠ م° مئوية لمدة ٥ دقائق.
٥. تحفظ العينات بدرجة حرارة -80 م°.

١-٢-٤- تضخيم الدنا DNA والدنا المتمم cDNA للجينات بالتفاعل التسلسلي

للبوليميراز PCR

استخدمت عديدة PCR Mater mix من شركة Thermo scientific الأمريكية، صنّعت مشاريع عالية النقاوة التي قمنا بتصميمها، من قبل شركة VBC-Biotech في فيينا. واستخدم جهاز thermal cyler من شركة BIO-RAD الأمريكية.

أ- تفاعل PCR لجين H2A

ضُخّم الجين H2A باستخدام المشاريع التالية

المشروع المباشر 5'- ATTA GAATTCATG GCT ACT CCT CGC AGC G -3'

المشروع العكسي الأول 5'- CTTCTAGACTAAGCGCTCGGTGTCGCCTTG-3'

المشروع العكسي الثاني 5'- CTTCTAGACTAAGCGCTCGGTGTCGCCTTG-3'

- حل المشاريع

حلت جميع المشاريع المستخدمة للحصول على تركيز ١٠٠ ميكرومولار وتمديد ١٠ ميكرومولار.

تبلغ درجة انصهار المشرع المباشر ٦٦,٢م، وتحتوي العبوة ٢٧,٦ نانومول.

• لتحضير محلول للمشرع بتركيز ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢٧٦ مكل من ماء PCR.

• نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

تبلغ درجة انصهار المشرع العكسي الأول ٦٨,٩م، وتحتوي العبوة ١٠,١ نانومول.

• لتحضير محلول للمشرع بتركيز ١٠٠ ميكرومولار نضيف ١٠١ مكل من ماء PCR.

• نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

تبلغ درجة انصهار المشرع العكسي الثاني ٧٠,٧م، وتحتوي العبوة ٢٥,٤ نانومول.

• لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢٥٤ مكل من ماء PCR.

• نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

تم حفظ المحاليل السابقة بالدرجة -٢٠م.

- بروتوكول تفاعل PCR

يحتوي مزيج تفاعل PCR لتضخيم الجين H2A على المكونات الموضحة في الجدول ٢ .

الجدول ٢ . مكونات مزيج تفاعل PCR.

المشروع الأمامي	١ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠ ميكرومولار
المشروع العكسي	١ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠ ميكرومولار
عينة الدنا تركيز (١١٠ نغ/مكل)	٢,٥ مكل
PCR master mix	١٢,٥ مكل
ماء PCR	٨ مكل
الحجم الكلي	٢٥ مكل

يتكون البرنامج الحراري المعتمد لتفاعل PCR لتضخيم الجين H2A من الدورات الموضحة في الجدول ٣.

الجدول ٣. البرنامج الحراري المعتمد لتفاعل PCR لتضخيم الجينات.

الخطوة	عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة °م
التمسخ البدئي initial denaturation	١	٥ دقائق	٩٥
التمسخ denaturation	٣٥	١ دقيقة	٩٥
الالتحام annealing جين H2A		٤٥ ثانية	٦١,٦
الالتحام annealing جين H2B		٤٥ ثانية	٦١
الالتحام annealing جين H3		٤٥ ثانية	٥٨
الالتحام annealing جين H4		٤٥ ثانية	٦٢
الاستطالة extension		١ دقيقة	٧٢
الاستطالة النهائية Final extension	١	٥ دقائق	٧٢

ب- تفاعل PCR لتضخيم الجين H2B

صُخِّم الجين H2B باستخدام المشارع التالية:

المشروع المباشر 5'- ATAGAATTCATG GCC TCT TCT CGC TCT GC -3'

المشروع العكسي الأول 5'- CT TCTAGA TCAAGCCGACGCGCTCGAC-3'

المشروع العكسي الثاني '3- AT TCTAGATCA ACG CGA CGC GCT CGA C -5'

- حل المشاريع

تم تمديد المشاريع للوصول إلى تركيز ١٠٠ ميكرومولار وتمديد ١٠ ميكرومولار.

تبلغ درجة انصهار المشروع المباشر ٦٦,٣ °م، وتحتوي العبوة ٢٠ نانومول.

- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢٠٠ مكل من ماء PCR.
- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

تبلغ درجة انصهار المشروع العكسي الأول ٦٩,١ °م، وتحتوي العبوة ٢١,٢ نانومول.

- ١- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢١٢ مكل من ماء PCR.
- ٢- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

تبلغ درجة انصهار المشروع العكسي الثاني ٦٩,٣ °م، وتحتوي العبوة ٢٢,٣ نانومول.

- ١- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢٢٣ مكل من ماء PCR.
- ٢- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

- بروتوكول تفاعل PCR لتضخيم جين H2B

يحتوي مزيج تفاعل PCR لتضخيم الجين H2B على المواد الموضحة في الجدول ٢

يتكون البرنامج الحراري المعتمد لتفاعل PCR لتضخيم الجين H2B من الدورات

الموضحة في الجدول ٣.

ج- تفاعل PCR لتضخيم الجين H3

ضُخِمَ الجين H3 باستخدام المشارع التالية:

المشرع المباشر '3- 5'- TATCTAGAATG TCC CGC ACC AAG GAG A

المشرع العكسي الأول '3- 5'- ATT GTCGAC TTAGTGGCGCTCACCGC

المشرع العكسي الثاني '3- 5'- ATTGTCGACCTA GTG CCG CTC ACC GC

- حل المشارع

تم تمديد المشارع للوصول إلى تركيز ١٠٠ ميكرومولار وتمديد ١٠ ميكرومولار.

تبلغ درجة انصهار المشرع المباشر ٦٥,٦°م، وتحتوي العبوة ٢٦.٤ نانومول.

١- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢٦٤ مكل من ماء PCR.

٢- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز

١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار

ونضيف لها ٩٠ مكلو لتر من ماء PCR.

تبلغ درجة انصهار المشرع العكسي الأول ٦٤,٦°م، وتحتوي العبوة ٣٠.٦ نانومول.

١- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٣٠٦ مكل من ماء PCR.

٢- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز

١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار

ونضيف لها ٩٠ مكلو لتر من ماء PCR.

تبلغ درجة انصهار المشرع المباشر ٦٤,٨°م، وتحتوي العبوة ١٤,٩ نانومول.

١- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ١٤٩ مكل من ماء PCR.

٢- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

- بروتوكول تفاعل PCR لتضخيم جين H3

يحتوي مزيج تفاعل PCR لتضخيم الجين H3 على المواد الموضحة في الجدول ٢.

يتكون البرنامج الحراري المعتمد لتفاعل PCR لتضخيم الجين H3 من الدورات الموضحة في الجدول ٣.

- د- تفاعل PCR لتضخيم جين H4

ضُخِمَ الجين H4 باستخدام المشرع التالية:

المشرع المباشر '3- 5'-ATCA GAATTCATG GCC AAG GGC AAG CGC TC

المشرع العكسي الأول '3- 5'- A TGTCTAGA TTACGCGTAGCCGTAGAGGATG

المشرع العكسي الثاني '3- 5'-ATGTCTAGATTACGCGTAGCCGTACAGGATG

- حل المشرع

تم تمديد المشرع للوصول إلى تركيز ١٠٠ ميكرومولار وتمديد ١٠ ميكرومولار.

تبلغ درجة انصهار المشرع المباشر ٥٧٠م، وتحتوي العبوة ٢٤ نانومول.

- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢٤٠ مكل من ماء PCR.
- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

تم تمديد المشرع للوصول إلى تركيز ١٠٠ ميكرومولار وتمديد ١٠ ميكرومولار.

تبلغ درجة انصهار المشرع العكسي الأول ٦٥,٤م، وتحتوي العبوة ١٧,٤ نانومول.

- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ١٧٤ مكل من ماء PCR.

- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

تبلغ درجة انصهار المشرع العكسي الثاني ٨,٥٦٥م، وتحتوي العبوة ٩,٢٣ نانومول.

- لتحضير محلول تركيزه ١٠٠ ميكرومولار نضيف ٢٣٩ مكل من ماء PCR.
- نمدد المحلول السابق ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار للحصول على محلول بتركيز ١٠ ميكرومولار، حيث نأخذ ١٠ مكل من المحلول ذو التركيز ١٠٠ ميكرومولار ونضيف لها ٩٠ ميكرو لتر من ماء PCR.

- بروتوكول تفاعل PCR لتضخيم جين H4

يحتوي مزيج تفاعل PCR لتضخيم الجين H4 على المواد الموضحة في الجدول ٢.

يتكون البرنامج الحراري المعتمد لتفاعل PCR لتضخيم الجين H4 من الدورات الموضحة في الجدول ٣.

٣-١- الرحلان الكهربائي لنواتج تضخيم الجينات

تم ترحيل نواتج PCR للجينات المضخمة على هلامة آغاروز تركيزها ٢% ملونة بالإيثيديوم برومايد.

استخدمت المواد التالية في الرحلان الكهربائي. آغاروز لتحضير هلامة الآغاروز من شركة Vivantis الماليزية، دائرة TBE تركيز 5X ، Loading dye 6x من شركة Thermo scientific الأميركية، جهاز رحلان كهربائي أفقي من شركة Cleaver البريطانية، واسم لطول الدنا DNA ladder 50bp من شركة Thermo scientific الأميركية.

١-٣-١- تحضير محاليل ودارنات الرحلان

أ- تحضير دائرة TBE (Tris Borate EDTA buffer)

حُضِرَ 1 لتر من محلول EDTA بتركيز 0.5 M ودرجة باهاء PH=8، بوزن

١٢, ١٨٦ ملغ EDTA من شركة Bio Basic Inc الكندية، وحلها بجزء من الماء المقطر. لا يحدث الانحلال حتى يتم تعديل درجة الباهاء إلى ٨ بإضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم 1 نظامي، ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى الحجم المطلوب.

لتحضير 1 لتر من دائرة (5X) TBE وزن 54 غرام من مادة Tris base من شركة promega الأميركية، و 27.5 غرام من حمض البور boric acid من شركة USB الأميركية. حُلّت 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 لتر. ثم ويجب التأكد مرة ثانية أن درجة الباهاء pH=8. أما إذا كانت درجة الباهاء أعلى أو أقل من ٨، فتضبط مرة ثانية بمحلول حمض كلور الماء أو ماءات الصوديوم ١ نظامي.

ب- تحضير هلامة الآغاروز

تم تحضير هلامة الآغاروز بتركيز ٢% بوزن ٢ غ من الآغاروز وحلها بمساعدة الحرارة في فيول زجاجي يحوي ١٠٠ مل من محلول يتألف من ١٠ مل TBE تركيزه 5X و ٩٠ مل من الماء المقطر، حتى يصبح المحلول شفافاً تماماً. يترك المحلول حتى يبرد وعندما تصل درجة حرارة الآغاروز المنحل إلى ٥٥ °م نضيف ضمن الفيول ٢ مكل من الإيثيديوم بروميد *vivantis* الماليزية. وضع المشط في حامل الهلامة في المكان المخصص له ثم صبّ محلول الآغار في حامل الهلامة وترك حتى يبرد ويتصلب. نُزِع المشط بلطف وبشكل عمودي بعد أن برد الآغار وتهلم تماماً. نُقل الهلام بعدئذ إلى حوض الرحلان حيث غمرت الهلامة بدائرة 0.5X TBE.

حقنت العينات في الآبار، تم مزج ٥ مكل من ناتج تضخيم الجين + ١ مكل من زرقة البروموفينول bromophenol blue في أنبوب إندورف ومزجها جيداً ومن ثم حقنها بواسطة رأس ممص دقيق في البئر المناسب. كما تم حقن ٢,٥ مكل من واسم اطوال الدنا 50 bp DNA ladder، ممزوجة مع ٠,٥ مكل من زرقة البروموفينول في البئر المناسب. تم توصيل جهاز الرحلان إلى تيار كهربائي ١٠٠ فولط وشدته ١٢٠ ميلي أمبير. تم الترحيل لمدة ٥٠ دقيقة، ثم تم إظهار العصابات بوضع الهلامة في جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV لشركة Cleaver البريطانية.

٢- تنقية نواتج تضخيم الجينات

تمت تنقية نواتج تضخيم الجينات باستخدام عتيدة GENE Jet PCR purification kit وفقاً للخطوات التالية:

- ١- نضيف Binding buffer إلى ناتج التضخيم بنسبة ١:١ ونمزجهما.
 - ٢- نضع الناتج على عمود التنقية على أنبوب إبيندروف سعة ١,٥ مل. وننقل لمدة دقيقة واحدة بسرعة ١٤٠٠٠ دورة/بالدقيقة.
 - ٣- نرمي الرشاحة ونضيف ٧٠٠ مكل من دائرة الغسل wash buffer المضاف لها ٤٥ مكل من الإيتانول ١٠٠%.
 - ٤- ننقل لمدة دقيقة بسرعة ١٤٠٠٠ دورة/بالدقيقة ونرمي الرشاحة.
 - ٥- ننقل عمود التنقية إلى أنبوب إبيندروف سعة ١,٥ مل.
 - ٦- نضيف ٣٠ مكل من دائرة الشطف elution buffer وننقل بنفس الشروط. نحتفظ بالرشاحة الناتجة، التي تحتوي نواتج تضخيم الجينات المنقاة، بدرجة حرارة -٢٠°م.
- ٣- تحضير اللقاح من كل جين من الجينات المختارة
- ٣-١- التأكد من فعالية إنزيمات الاقتطاع بهضم البلاسميد بإنزيم اقتطاع واحد

تم تهضيم البلاسميد باستخدام إنزيم اقتطاع واحد في كل مرة من شركة Thermo scientific الأمريكية، وذلك للتأكد من فعالية إنزيمات الاقتطاع.

الجدول ٤. الكواشف المطلوبة لتفاعل التهضيم وحجومها.

الكواشف المستخدمة	أنبوب ٣	أنبوب ٢	أنبوب ١
دائرة 2x Tango	٤ مكل	٤ مكل	٤ مكل
Deionized water	١٣ مكل	١٣ مكل	١٣ مكل
جين/بلاسميد	٢ مكل	٢ مكل	٢ مكل
إنزيم ECORI	٠	٠	1 مكل (١٠ وحدات)
إنزيم XBAI	٠	1 مكل (١٠ وحدات)	٠
إنزيم SALI	1 مكل (١٠ وحدات)	٠	٠
الحجم الكلي	٢٠ مكل	٢٠ مكل	٢٠ مكل

حضنت الأنابيب بحمام مائي درجة حرارته ٣٧ °م لمدة ٢ ساعة، ثم قمنا بترحيل العينات على هلامه آغاروز ٠,٨% وفقاً للنموذج التالي.

بئر ١	بئر ٢	بئر ٣	بئر ٤	بئر ٥
واسم أطوال الدنا	بلاسميد غير مهضم	بلاسميد مهضم بانزيم ECORI	بلاسميد مهضم بانزيم XBAI	بلاسميد مهضم بانزيم SALI

سمح الترحيل بالحصول على بروفائل قطع نظامي.

٢-٣- التهضيم الثنائي للبلاسميد والجينات

بعد التأكد من فعالية كل إنزيم من إنزيمات الهضم، قمنا بالتهضيم الثنائي لكل من البلاسميد والجينات وفقاً للجدول ٥.

الجدول ٥. الكواشف المطلوبة لتهضيم البلاسميد والجينات المختلفة وحجومها.

الكواشف المطلوبة لتهضيم الثنائي	أنبوب بلاسميد	أنبوب بلاسميد	أنبوب الجين H4	أنبوب الجين H3	أنبوب الجين H2B	أنبوب الجين H2A
جين/بلاسميد	٤ مكل	٤ مكل	١٠ مكل	١٠ مكل	١٠ مكل	١٠ مكل
دائرة 2x Tango	٦ مكل	٦ مكل	٦ مكل	٦ مكل	٦ مكل	٦ مكل
ddH2o	١٧ مكل	١٧ مكل	١٧ مكل	١٧ مكل	١٧ مكل	١٧ مكل
إنزيم ECORI	٠	١,٥ مكل	١,٥ مكل	٠	١,٥ مكل	١,٥ مكل
إنزيم XBAI	١,٥ مكل	١,٥ مكل	١,٥ مكل	١,٥ مكل	١,٥ مكل	١,٥ مكل
إنزيم SALI	١,٥ مكل	٠	٠	١,٥ مكل	٠	٠
الحجم الكلي	٣٠ مكل	٣٠ مكل	٣٠ مكل	٣٠ مكل	٣٠ مكل	٣٠ مكل

مزجت محتويات كل أنبوب ووضعت بحمام مائي بدرجة حرارة 37°C لمدة ساعتين ثم تم التأكد من فعالية القطع بترحيل نواتج الهضم على هلامة آغاروز 0.8% وفقاً للنموذج التالي.

بئر ٤	بئر ٣	بئر ٢	بئر ١
بلاسميد مهضم بانزيمي XBAI\SALI	بلاسميد مهضم بانزيمي ECORI\XBAI	بلاسميد غير مهضم	واسم أطوال الدنا 1kb

٣-٣- الرحلان الكهربائي للبلاسميدات المهضمة ثنائياً

استخدم جهاز رحلان CLEAVER البريطاني، وتم الترحيل على هلامة آغاروز تركيزها 0.8% ملونة stained بالإيثيديوم برومايد.

٣-٤- تنقية نواتج الهضم الثنائي للجينات والبلاسميدات

تمت التنقية باستخدام عتيدة GENE JET PCR PURIFICATION KIT لشركة ThermoScientific الأميركية وذلك وفقاً للخطوات التالية:

- ١- نضيف دائرة Binding buffer إلى ناتج التضخيم بنسبة ١:١ ونمزج.
- ٢- نضع الناتج على عمود التنقية ونثقل لمدة دقيقة واحدة بسرعة ١٤٠٠٠ دورة/الدقيقة على أنبوب سعة ١,٥ مل.
- ٣- نرمي الرشاحة ونضيف ٧٠٠ مكل من دائرة الغسل wash buffer المضاف لها ٤٥ مكل من الإيتانول ١٠٠%.
- ٤- نثقل لمدة دقيقة بسرعة ١٤٠٠٠ دورة/الدقيقة ونرمي الرشاحة.
- ٥- نثقل أيضاً بنفس الشروط ثم ننقل عمود التنقية إلى أنبوب إيبندروف بسعة ١ مل.
- ٦- نضيف ٣٠ مكل من دائرة الشطف elution buffer ونثقل بنفس الشروط السابقة. نحفظ بالرشاحة الناتجة المنقاة بدرجة حرارة -٢٠ م°.

٣-٥- قياس تركيز الجينات والبلاسميدات المهضمة بعد التنقية

تم القياس باستخدام مقياس الطيف الضوئي. تم ضبط الجهاز باستخدام λ DNA

من شركة Thermo scientific الأمريكية. تم ادخال الإعدادات المطلوبة من حيث طول الموجة، على طولي موجة ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر والنسبة بينهما، ونغ/مكل كوحدة لقياس التراكيز. بعد تمرير الناصع، الماء المقطر، قسنا التراكيز.

٣-٦- ربط الجين بالبلاسميد ligation

يشكل ربط الجين والبلاسميد المهضمين بشكل متوافق بنفس إنزيمات الاقتطاع، الخطوة الأخيرة في بناء البلاسميد المؤشب. تم هذا التفاعل باستخدام إنزيم dna t4 ligase من شركة Thermo scientific الأمريكية، الذي يقوم بتحفيز تشكيل روابط ثنائية تساهمية، فوسفو إستيرية، تربط النكليوتيدات معاً بشكل ثابت.

تم تحديد كمية كل من الجينات والبلاسميد المهضمة بإنزيمات الاقتطاع والداخلية في تفاعل الربط ligation اعتماداً على القانون التالي:

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

بافتراض أن كمية البلاسميد المراد إدخالها تساوي ٥٠ نانوغرام، وأن النسبة المولية بين الجين والبلاسميد تساوي ٦ جين : 1 بلاسميد، وأن طول البلاسميد يساوي ٤٠٠٦ زوج أساس، وأن طول جين H2A يبلغ ٣٩٩ زوج أساس، يظهر تطبيق القانون أن كمية الجين H2A المطلوبة تساوي ٢٩,٨٨ نانوغرام. وبما أن تركيز الجين يساوي ٣٢ نغ/مكل فإننا بالتالي نحتاج إلى ٠,٩٣٣٧ مكل من محلول الجين لإتمام التفاعل. وبما أن تركيز البلاسميد المقطع بإنزيمي القطع ECORIXBAI يساوي ٢٤٧ نانوغرام/مكل، فإننا بالتالي نحتاج إلى ٠,٢٠٢ مكل من محلول البلاسميد لنحصل على ٥٠ نانوغرام.

وكذلك الأمر بالنسبة لجين H2B الذي يبلغ طوله ٣٣٦ زوج أساس، يظهر تطبيق القانون، أن كمية الجين H2B المطلوبة تساوي ٢٥,١٦ نانوغرام. وبما أن تركيز الجين يساوي ٢٧ نانوغرام/مكل فإننا بالتالي نحتاج ٠,٩٣١٨ مكل من محلول دنا الجين لإتمام التفاعل. وبما أن تركيز البلاسميد المقطع بإنزيمي ECORIXBAI يساوي ٢٤٧ نانوغرام/مكل، فإننا بالتالي نحتاج إلى ٠,٢٠٢ مكل من محلول دنا البلاسميد المستخلص لنحصل على ٥٠ نانوغرام.

وكذلك الأمر بالنسبة لجين H3 الذي يبلغ طوله ٣٩٣ زوج أساس، يظهر تطبيق القانون، أن كمية الجين H3 المطلوبة تساوي ٢٩,٤٣ نانوغرام. وبما أن تركيز الجين يساوي ٢٤٩ نانوغرام/مكل فإننا بالتالي نحتاج ٠,١١٨ مكل من محلول دنا الجين لإتمام التفاعل. وبما أن تركيز البلاسميد المقطع بإنزيمي I XBAI\SALI يساوي ٢٨٩ نانوغرام/مكل، فإننا بالتالي نحتاج إلى ٠,١٧ مكل من محلول دنا البلاسميد المستخلص لنحصل على ٥٠ نانوغرام.

وكذلك الأمر بالنسبة لجين H4 الذي يبلغ طوله ٣٠٣ زوج أساس، يظهر تطبيق القانون، أن كمية الجين H4 المطلوبة تساوي ٢٢,٦٩ نانوغرام. وبما أن تركيز الجين يساوي ٩٢ نانوغرام/مكل فإننا بالتالي نحتاج ٠,٢٤٦٦ مكل من محلول دنا الجين لإتمام التفاعل. وبما أن تركيز البلاسميد المقطع بإنزيمي ECORI\XBAI يساوي ٢٤٧ نانوغرام/مكل، فإننا بالتالي نحتاج إلى ٠,٢٠٢ مكل من محلول دنا البلاسميد المستخلص لنحصل على ٥٠ نانوغرام.

نظراً لصغر حجوم الكواشف السابقة، ولأسباب عملية تتعلق بسهولة العمل وبدقة الممصات فقد ضاعفنا الكميات بحيث تم إجراء تفاعل الربط ligation وفقاً للبروتوكول المذكور في الجدول ٦.

الجدول ٦. الكواشف المستخدمة في تفاعل الربط وحجومها.

الكواشف المطلوبة	شاهد سلبي	شاهد سلبي	تهضيم جين H4	تهضيم جين H3	تهضيم جين H2B	تهضيم جين H2A
الجين	٠	٠	٢ مكل	٢ مكل	٢ مكل	٢ مكل
بلاسميد مهضم	٠,٥ مكل	٠,٥ مكل	(ECORI\XBAI) ٠,٥ مكل	(XBAI\SALI) ٠,٥ مكل	(ECORI\XBAI) ٠,٥ مكل	(ECORI\XBAI) ٠,٥ مكل
دائرة	٢ مكل	٢ مكل	٢ مكل	٢ مكل	٢ مكل	٢ مكل
ddH2o	١٧,٣ مكل	١٧,٣ مكل	١٥,٣ مكل	١٥,٣ مكل	١٥,٣ مكل	١٥,٣ مكل
T4 DNA ligase	٠,٢ مكل	٠,٢ مكل	٠,٢ مكل	٠,٢ مكل	٠,٢ مكل	٠,٢ مكل
الحجم الكلي	٢٠ مكل	٢٠ مكل	٢٠ مكل	٢٠ مكل	٢٠ مكل	٢٠ مكل

تم تفاعل الربط بحضن المكونات بدرجة حرارة ٥١٦م لمدة ساعتين، ثم تم تعطيل تفاعل الربط ligation بوضع أنبوب الإيندورف الحاوي على المكونات في حمام مائي بدرجة حرارة ٥٦٥م لمدة ٥ دقائق ومن ثم حفظ ناتج تفاعل الربط بالدرجة - ٢٠م.

٧-٣- الاستحالة Transformation

١-٧-٣- تهيئة الجراثيم E coli TOP 10

تم استخدام الجراثيم E coli TOP 10 من شركة promega الأميركية. حضرت معلقات من هذه السلالة بكثافة OD₆₀₀ تساوي ٤,٠، ووزعت ضمن انابيب تحتوي ١٠٠ مكل من المعلق وحفظت بدرجة حرارة -٨٠م للحفاظ على السلالة. قمنا بتهيئة الجراثيم السابقة، جعلها خلايا مؤهلة competent cells، بطريقة كلوريد الكالسيوم.

أ- تحضير الأوساط اللازمة لنمو الجراثيم

• تحضير وسط Luria-Bertani (LB) آغار

تم وزن ٣,٥ غ من الوسط، من شركة ROTH الألمانية، ثم حُلَّت في ١٠٠ مل من الماء المقطر في عبوة زجاجية. تم تعقيم الوسط بالصاد الموصد بدرجة حرارة ١٢١م وضغط ١,٥ بار لمدة ٢٠ دقيقة، ثم أغلقت العبوة بإحكام ووضعت عليها لصاقة تدل على اسم المادة وتاريخ التحضير.

• تحضير وسط مرق LB

تم وزن ٢ غ من الوسط، من شركة ROTH الألمانية، ثم حُلَّت في ١٠٠ مل من الماء المقطر في عبوة زجاجية. تم تعقيم الوسط بالصاد الموصد بدرجة حرارة ١٢١م وضغط 1.5 بار لمدة 20 دقيقة، ثم أغلقت العبوة بإحكام ووضع عليها لصاقة تدل على اسم المادة وتاريخ التحضير.

ب- بروتوكول تهيئة جراثيم E.coli TOP 10

حُضِرَ مستنبت أولي pre culture من جراثيم TOP 10 بأخذ ١٠٠ مكل من

الجراثيم المجمدة بالدرجة - ٨٠م^٥ ووضعتها في ٥ مل من وسط مرق LB من شركة RoTh الألمانية في إيندورف سعة ١.٥ مل وتم حضنها في الدرجة ٣٧ م^٥ لمدة ٢٤ ساعة.

نُقل المستنبت أولي pre culture السابق إلى فيول زجاجي يحتوي ١٠٠ مل من مرق LB. حُضن محتوى الفيول في حاضنة هزازة لشركة JSR الكورية الجنوبية، بالدرجة ٣٧ م^٥ مع الرج بسرعة ٢٢٥ دورة/دقيقة. تمت مراقبة الكثافة الضوئية للمستنبت الموجود في الفيول وذلك بأخذ عينة من الفيول كل ساعتين وقياس الكثافة الضوئية بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي على طول موجة ٦٠٠ نانومتر.

عندما وصلت الكثافة الضوئية إلى قيمة ٠،٤، وُزِع محتوى الفيول على أنبوبين بلاستيكيين معقمين مخصصين للزرع سعة ٥٠ مل ثم تُقَلَّا بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق. عُلق الراسب الناتج من كل أنبوب في ٢٠ مل من محلول مبرد ومعقم لكلوريد الكالسيوم بتركيز ٦٠ ميلي مولار، من شركة Merck الألمانية، ويحتوي على ١٥% منه غليسيرول من شركة Merck الألمانية.

تُقل المعلق السابق بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق في مثقلة لشركة BIOSAN الألمانية بدرجة حرارة +٤ م^٥. تم التخلص من الطافي وُعلق الراسب الناتج من كل أنبوب في ٢٠ مل من مزيج كلوريد الكالسيوم والغليسيرول السابق ثم حُضن على الثلج لمدة ٣٠ دقيقة. فنحصل بذلك على جراثيم مؤهلة.

تُقل الأنبوبين بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق في مثقلة لشركة BIOSAN الألمانية ثم علق الراسب الناتج في كل أنبوب في ٢ مل من مزيج السابق لكلوريد الكالسيوم والغليسيرول.

وُزعت الكمية السابقة ضمن عدة أنابيب إيندورف عقيمة بحيث يحتوي كل أنبوب على ١٠٠ مكل من جراثيم E coli TOP 10 competent cells وحفظت في المجمدة بالدرجة -٨٠ م^٥.

٣-٧-٢- تفاعل الاستحالة Transformation

تتطلب عملية الاستحالة توفر رؤوس ممصات عقيمة قياس ١٠٠ و ١٠٠٠ مكل، وأنابيب إيندورف عقيمة قياس ١,٥ مل، ثلج، وسط مرق LB من دون صادات، تحضير

المدروسة، وذلك لتحري وجود الجين ضمن البلاسميد. اعتبرت المستعمرات الحاوية على بلاسميد غير مؤشبه كمستعمرات شاهدة.

أخذ من كل طبق زرع مخصص لكل جين من الجينات، ١١ مستعمرة جرثومية. استخلبت كل مستعمرة في ١٠مكل ماء معقم ومنزوع الشوارد. زرع ٥ مكل من المعلق السابق على وسط آغار LB الحاوي على أمبيسيلين بتركيز ١٠٠مكغ/مل وحضنت لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ درجة مئوية ثم حفظت الأطباق التي نمت عليها الجراثيم بدرجة +٨٠م. أخذ ٥ مكل، ما تبقى من المعلق الجرثومي، لإجراء تفاعل PCR.

الجدول ٧. حجوم الكواشف الداخلة في تفاعل PCR.

المعلق الجرثومي المأخوذ من المستعمرة	٥ مكل
المشروع المباشر للجين	١ مكل
المشروع العكسي للجين	١ مكل
PCR Master mix 2x	١٢,٥ مكل
ماء ثنائي التقطير ومنزوع الشوارد	٥,٥ مكل
الحجم الكلي	٢٥ مكل

أجري تفاعل PCR باستخدام عتيده PCR Master mix 2x من شركة Thermoscientific الأمريكية، وجهاز المدور الحراري Thermocycler لشركة BIO-RAD الأمريكية.

٤-١- تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H2A

استخدمت المشارع السابقة التي تم ذكرها سابقاً، المشروع المباشر والمشروع العكسي الثاني، وتم تطبيق نفس البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم جين H2A.

٤-٢- تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H2B

استخدمت المشارع السابقة التي تم ذكرها سابقاً، المشروع المباشر والمشروع العكسي الثاني، وتم تطبيق نفس البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم جين H2B.

٣-٤ تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H3

استخدمت المشاريع السابقة التي تم ذكرها سابقاً، المشرع المباشر والمشرع العكسي الثاني، وتم تطبيق نفس البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم جين H3.

٤-٤ تفاعل PCR للمستعمرات المفترض إحتوائها على جين H4

استخدمت المشاريع السابقة التي تم ذكرها سابقاً، المشرع المباشر والمشرع العكسي الثاني، وتم تطبيق نفس البرنامج الحراري المعتمد لتضخيم جين H4.

٤-٥- تفاعل PCR للمستعمرات النامية التي تحتوي جراثيم خضعت لعملية الاستحالة لإدخال بلاسميدات لا تحتوي على جينات

أخذت كل المستعمرات النامية على طبق الزرع، وخضعت لتفاعل PCR باستخدام المشاريع الخاصة بكل جين من الجينات على حدى، وطبق بروتوكول البرنامج الحراري الخاص بالجين التي استخدمت مشارعها.

٥- الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR للمستعمرات النامية التي تحتوي جراثيم خضعت لعملية الاستحالة

رحلت النواتج على هلامة آغاروز بتركيز ١%. تم اختيار المستعمرات التي احتوت على الجينات.

٦- استخلاص البلاسميد المأشوب من جراثيم E.coli Top 10 التي أظهر تطبيق تفاعل PCR على مستعمراتها وجود الجينات فيها

بعد إجراء تفاعل PCR وتحري المستعمرات الحاوية على الجينات، تم استخلاص البلاسميدات المأشوبة من هذه المستعمرات بطريقة الاستخلاص اليدوي لتحري وجود البلاسميد المغلق وإجراء تفاعل التهضيم على هذه البلاسميدات للتأكد بشكل نهائي من وجود الجينات داخلها. وبعد التأكد من هذه الاختبارات التي ستذكر بالتفصيل لاحقاً تم استخلاص البلاسميدات، التي أظهر تفاعل التهضيم إحتوائها على الجينات، من جراثيم E.coli Top 10 باستخدام عتيدة GF-1 PLASMID DNA EXTRACTION من شركة

vivantis الماليزية. وسنستعرض فيما يلي خطوات استخلاص البلاسميد المؤشب بالطريقة اليدوية أو بواسطة عتيدة الاستخلاص.

٦-١- طريقة استخلاص البلاسميد المؤشب يدوياً

٦-١-١- تحضير محاليل الاستخلاص

- محلول إعادة تعليق الرسابة الجرثومية Resuspension solution

يتألف محلول التعليق من ٥٠ mM غلوكوز، ٢٥ mM Tris HCL (pH=8)، ١٠ mM EDTA (pH=8)، وماء منزوع الشوارد. حضّر ١٠٠ مل من هذا المحلول وذلك بمزج ٨٠ مل ماء منزوع الشوارد، و ٥ مل غلوكوز ١M، و ٢,٥ مل Tris HCl (pH=8)، و ٢ مل EDTA (pH=8)، وأكمل الحجم بالماء منزوع الشوارد حتى ١٠٠ مل. حفظ المحلول بدرجة حرارة +٤ م°.

- محلول حل خلايا الجراثيم Lysis solution بالطريقة القلوية

يتألف محلول الحل من هيدروكسيد الصوديوم ٠,٢ ن، و sodium dodecyl sulfate (SDS) ١%، وماء منزوع الشوارد. حضّر ١٠٠ مل من هذا المحلول بوضع ٨٠ مل ماء منزوع الشوارد مع ٢ مل هيدروكسيد الصوديوم ١٠ ن، و ١٠ مل من SDS ١٠%، وأكمل الحجم لـ ١٠٠ مل بالماء منزوع الشوارد. حفظ المحلول بدرجة حرارة الغرفة.

- محلول التعديل Neutralizing solution

يتألف محلول التعديل من أسيتات البوتاسيوم ٥ M، وحمض الخل الثلجي، وماء منزوع الشوارد. حضّر ١٠٠ مل من المحلول بمزج ٢٨,٥ ماء منزوع الشوارد مع ٦٠ مل أسيتات البوتاسيوم ٥ M، و ١١,٥ مل من حمض الخل الثلجي. حفظ المحلول بدرجة حرارة الغرفة.

٦-١-٢- بروتوكول الاستخلاص

١- تحضير المستنبت الزراعي: أخذت مستعمرة، أظهرت إيجابية تفاعل PCR، واستحلبت في أنبوب زرع عقيم يحوي على ٣ مل من مرق LB الحاوي على

الأميبسليين بتركيز ١٠٠ مكغ /مل وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م في حاضنة هزازة بسرعة اهتزاز ٢٢٥ هزة/دقيقة لمدة ٢٤ ساعة. زرعت كل مستعمرة من المستعمرات الأخرى التي أظهرت إيجابية تفاعل PCR، على طبق منفصل وبشكل مماثل.

٢- ثفل أنبوب زرع بسرعة ٦٠٠٠ g x لمدة ٥ دقائق ورمي السائل الطافي.

٣- أضيف ٢٥٠ مكل من محلول التعليق Resuspension solution، المضاف له ١٠ مكل RNAase، للتخلص من أي آثار للربنا في حال وجدت، للرسابة وأعيد تعليق الرسابة بشكل كامل بالمحلول بواسطة رجاجة.

٤- أضيف ٢٥٠ مكل من محلول الحل lysis solution ومزج المحتوى بقلب الأنبوب بلطف حوالي ٤-٦ مرات ثم حضن بالتلج لمدة ٥ دقائق بالضبط.

٥- أضيف ٢٥٠ مكل من محلول التعديل NB solution ومزج المحتوى بقلب الأنبوب بلطف ٦-١٠ مرات، ثم حضن الأنبوب في الثلج لمدة خمس دقائق ثم ثفل بسرعة ١٤٠٠٠ g x لمدة ١٠ دقائق.

٦- نقل الطافي إلى أنبوب ابيندورف نظيف يحتوي على ٧٠٠ مكل إيزوبروبانول لترسيب البلاسميد، ومزج لمدة ٣٠ ثانية، ثم ثفل بسرعة ١٤٠٠٠ g x لمدة ١٠ دقائق.

٧- رمي السائل الطافي بحذر، وأضيف ٢٥٠ مكل إيتانول ٧٠% للرسابة ثم ثفل بسرعة ١٤٠٠٠ g x لمدة ١٠ دقائق ورمي السائل الطافي.

٨- بعد التأكد من التخلص من آثار الكحول أضيف ماء منزوع الشوارد لحل الرسابة.

٩- ثم رحلت نواتج الاستخلاص على هلامه آغاروز بتركيز ٠,٨%، وقورنت مع نتائج الاستخلاص بالعنيدة.

٢-٦- استخلاص البلاسميد من جراثيم E.coli Top 10 بواسطة عتيدة GF-1

PLASMID DNA EXTRACTION من شركة vivantis

أ- بروتوكول الاستخلاص

١- تحضير المستنبت الزرعي: أخذت مستعمرة، أظهرت إيجابية تفاعل PCR، واستحلبت في أنبوب زرع عقيم يحوي على ٥ مل من مرق LB الحاوي على

الأميبسللين بتركيز ١٠٠ مكغ /مل وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م في حاضنة هزازة بسرعة اهتزاز ٢٢٥ هزة/دقيقة لمدة ٢٤ ساعة. زرعت كل مستعمرة من المستعمرات الأخرى التي أظهرت إيجابية تفاعل PCR، على طبق منفصل وبشكل مماثل.

- ٢- ثفل الأنبوب بسرعة $6000 \times g$ لمدة ٥ دقائق ورمي السائل الطافي.
- ٣- أضيف ٢٥٠ مكل من محلول S1 ، المضاف له RNAase حسب تعليمات العتيدة، إلى الرسابة وعلقت الرسابة بشكل كامل بالمحلول بواسطة الرجاجة.
- ٤- أضيف ٢٥٠ مكل من محلول S2، لحل الجراثيم، ومزج محتوى الأنبوب بقلبه بلطف حوالي ٤-٦ مرات ثم حضنه بالتلج لمدة ٥ دقائق بالضبط.
- ٥- أضيف ٤٠٠ مكل من Buffer NB، محلول التعديل، يعيد طبيعة البلاسميد لشكله الطبيعي renature في درجة باهاء معتدلة ويرسب بقايا حطام الخلية الجرثومية والدنا الكرموزومي، ومزج محتوى الأنبوب بقلبه بلطف ٦-١٠ مرات حتى تشكل رسابة بيضاء. ثفل بعدها الأنبوب بسرعة $14000 \times g$ لمدة ١٠ دقائق.
- ٦- نقل ٦٥٠ مكل من السائل الطافي إلى عمود التنقية وثل لمدة ١ دقيقة بسرعة $10000 \times g$ ورمي السائل الطافي.
- ٧- أضيف ٦٥٠ مكل من دائرة الغسل، المضاف لها مسبقاً الكحول الإيتيلي المطلق ١٠٠% حسب تعليمات الشركة المصنعة، وثل لمدة ١ دقيقة بسرعة $10000 \times g$ ورمي الطافي.
- ٨- ثفل العمود بسرعة $10000 \times g$ لمدة ٢ دقيقة على أنبوب ابيندورف بسعة ٢ مل للتخلص من بقايا الكحول الإيتيلي.
- ٩- نقل عمود التنقية إلى أنبوب تثقيل نظيف وأضيف له ٦٥ مكل بمركز المرشحة من دائرة الشطف Elution Buffer وترك لمدة ٢ دقيقة، ثم ثفل لمدة ١ دقيقة بسرعة $10000 \times g$ وحفظت الرشاحة، التي تحتوي على البلاسميد بدرجة حرارة ٢٠°م.

٦-٣- الرحلان الكهربائي للبلاسميد المستخلص من جراثيم Ecoli Top 10

رحلت نواتج الاستخلاص على هلامة آغاروز ٠,٨% وأكمل العمل على المستعمرات الحاوية على البلاسميد.

٧- هضم البلاسميدات المستخلصة والمفترض احتوائها على الجينات للتأكد من وجود الجينات فيها

بعد الحصول على البلاسميدات الحاوية على الجينات، من المستعمرات الجرثومية، قمنا بهضم البلاسميدات المأشوبة بعد استخلاصها كما ذكر مسبقاً في فقرة التهضيم للبلاسميدات والجينات.

الجدول ٨. الكواشف المطلوبة لتفاعل التهضيم وحجومها.

الكواشف المطلوبة	(١) أنبوب	(٢) أنبوب	(٣) أنبوب	(٤) أنبوب
	الجين H2A	الجين H2B	الجين H3	الجين H4
البلاسميد المستخلص	٥ مكل	٥ مكل	٥ مكل	٥ مكل
دارئة 2x Tango	٤ مكل	٤ مكل	٤ مكل	٤ مكل
DdH2O	٩,٤ مكل	٩,٤ مكل	٩,٤ مكل	٩,٤ مكل
إنزيم ECOR I	٠,٨ مكل	٠,٨ مكل	٠	٠,٨ مكل
إنزيم XBAI	٠,٨ مكل	٠,٨ مكل	٠,٨ مكل	٠,٨ مكل
إنزيم SALI	٠	٠	٠,٨ مكل	٠
الحجم النهائي	٢٠ مكل	٢٠ مكل	٢٠ مكل	٢٠ مكل

مزجت محتويات كل أنبوب، لكل جين، ووضعت بحمام مائي بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ساعتين لضمان حدوث التهضيم. رحلت نواتج الهضم على هلامة آغاروز ١%. اخترنا المستعمرات التي تحتوي بلاسميد يحوي على الجين المطلوب. وأكمل العمل على المستعمرات إيجابية تفاعل التهضيم (ظهر الجين والبلاسميد).

٨- تفاعل السلسلة للجينات المثبت وجودها ضمن البلاسميد

أجري تفاعل السلسلة للجينين H2A و H4 ضمن البلاسميد المأشوب بعد التأكد من الاختبارات السابقة في هيئة التقانة الحيوية باستخدام جهاز ABI PRISM 310 Genetic analyzer من شركة Applied Biosystems الأميركية الذي يعمل بطريقة Sanger.

٩- تكثير البلاسميد الحاوي على جين H2A والبلاسميد الحاوي على جين H4

تم استخلاص البلاسميد من المستعمرات، التي احتوت على البلاسميد المؤشب، وتكثيره باستخدام عتيدة GeneJET Plasmid Maxiprep Kit من شركة Thermoscientific الأمريكية. تم العمل وفقاً لبروتوكول الاستخلاص التالي:

- ١- تحضير المستنبت الزرعي: أخذت مستعمرة تحتوي على الجين H2A أو الجين H4 واستحلبت في أنبوب معقم يحوي ٣ مل مرق LB حاوي على أمبسللين بتركيز ١٠٠ مكغ /مل. ووضعت بدرجة حرارة ٣٧°م في حاضنة هزازة بسرعة ٢٢٥ هزة/دقيقة لمدة ٢٤ ساعة. ثم نقلت محتويات ٣ أنابيب تحتوي على نفس الجين إلى أرلينة حاوية على ٢٥٠ مل من مرق LB الحاوي على أمبسللين بتركيز ١٠٠ مكغ /مل ووضعت بدرجة حرارة ٣٧°م في حاضنة هزازة بسرعة ٢٢٥ هزة/دقيقة، وبلغت الامتصاصية ٢-٣ بطول موجة ٦٠٠ نانومتر. ثم ثفل الوسط الزرعي بسرعة ٥٠٠٠ g لمدة ١٠ دقائق ورمي السائل الطافي.
- ٢- أضيف ٦ مل من محلول إعادة تعليق الجراثيم Resuspension، المضاف له RNAase، للرسابة وتمت إعادة تعليقها بالمحلول بواسطة الرجاجة.
- ٣- أضيف ٦ مل من محلول lysis لحل الجراثيم، وقلب الأنبوب بلطف ٤-٦ مرات حتى يصبح المحلول لزجاً، وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣ دقائق بالضبط.
- ٤- أضيف ٦ مل من محلول التعديل neutralization solution وقلب الأنبوب بلطف ٥-٨ مرات.
- ٥- أضيف ٠,٨ مل من كاشف ربط الاندوتوكسينات Endotoxin binding reagent، وقلب الأنبوب ٥-٨ مرات وترك ٥ دقائق بدرجة حرارة الغرفة.
- ٦- أضيف ٦ مل من الكحول الإيثيلي ٩٦% لترسيب البلاسميد وقلب الأنبوب ٥-٦ مرات. ثم ثفل ٤٠ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ g.
- ٧- نقل الطافي إلى أنبوب ٥٠ مل نظيف وأضيف ٦ مل من الكحول الإيثيلي ٩٦% وقلب الأنبوب بلطف ٥-٦ مرات.
- ٨- وضعت العينة على عمود تنقية وثقلت لمدة ٣ دقائق بسرعة ٢٠٠٠ g على أنبوب بسعة ٢ مل ورمي السائل المتدفق من المرشحة.

٩- أضيف ٨ مل من دائرة الغسل ١ على عمود التنقية وثقل لمدة ٢ دقيقة بسرعة $g \times 3000$ ورمي السائل المتدفق من المرشحة.

١٠- أضيفت ٨ مل من دائرة الغسل ٢، المضاف لها مسبقا الكحول الإيثيلي المطلق حسب تعليمات الشركة المصنعة، على عمود التنقية وثقل لمدة ٢ دقيقة بسرعة $g \times 3000$ ورمي السائل المتدفق من المرشحة. وكررت الخطوة مرة أخرى.

١١- ثقل عمود التنقية لمدة ٥ دقائق بسرعة $g \times 3000$.

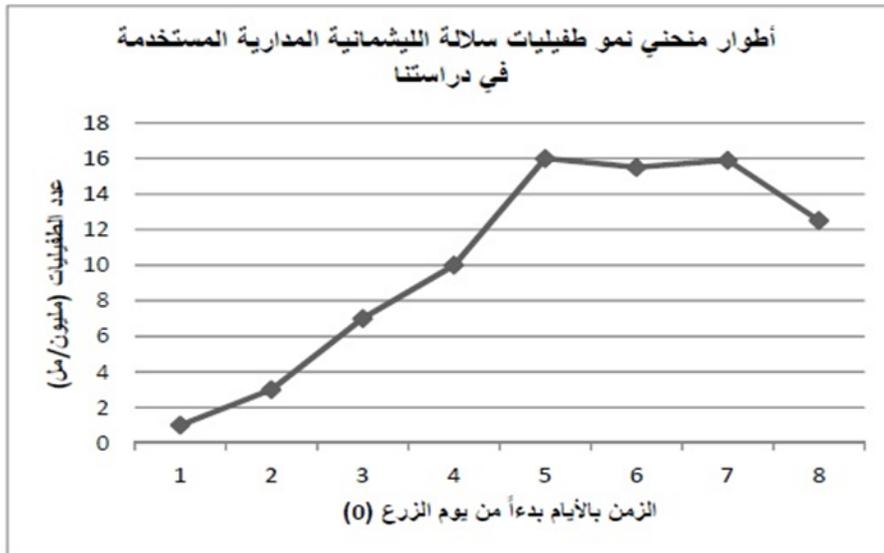
١٢- نقل الفلتر إلى أنبوب ٥٠ مل وأضيف ٧٠٠ مكل من دائرة الشطف Elution Buffer في مركز الفلتر، وترك لمدة ٢ دقيقة وثقل لمدة ٥ دقائق بسرعة $g \times 3000$. فحصلنا بذلك على الدنا المنقى في السائل المتدفق من الأنبوب.

١٣- قيس تركيز الدنا المنقى الذي تم استخلاصه بواسطة جهاز NANO DROP من شركة ThermoScientific الأميركية وقيست نقاوته وذلك بحساب النسبة: الامتصاص على طول الموجة ٢٦٠ / الامتصاص على طول الموجة ٢٨٠ نانومتر. حُفظ في أنبوب إبيندورف عقيم بالدرجة - ٢٠م.

VI- النتائج

١- 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 ١٠% مصل عجل جنيني منزوع المتممة، إلى نموها وفقاً لمنحني النمو المبين بالشكل ٢١. يتألف منحنى نمو السلالة المختارة من الأطوار الأربعة التالية: طور الكمون في بداية الزرع حيث تحتاج الطفيليات إلى ٢٤ ساعة للتأقلم مع الوسط حتى تبدأ بالتكاثر، والطور اللوغاريتمي الذي يستمر لمدة ٩٦ ساعة ويتكاثر فيه الطفيلي بالانشطار الطولي ويزداد فيه عدد الطفيليات بشكل أسي، وطور الاستتباب والنضج حيث يتوقف خلاله الطفيلي عن الانقسام ويستمر هذا الطور لمدة ٤٨ ساعة، و طور الانحلال الذي تموت فيه الطفيليات وبالتالي يتناقص عددها. تم المحافظة على سلالة هذه الطفيليات بنقل ١ مل مأخوذة من نهاية الطور اللوغاريتمي إلى وسط جديد، حيث تستطيع الطفيليات التكاثر مباشرة في الأوساط الجديدة دون الحاجة إلى فترة كمون.



الشكل ٢١. منحنى تكاثر المشيقات لسلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا. تم الحصول على هذا المنحنى بعد زرع مليون طفيلي في ٥ مل من وسط RPMI-1640 الكامل و الحضن بالدرجة ٢٦°م وتعداد الطفيليات يومياً.

٢- إثبات وجود الجينات المختارة ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا

يجب في البداية الإشارة إلى أنه لم يتم حتى الآن نشر تسلسل جينوم الليشمانية المدارية بشكل كامل، وإلى عدم وجود أي دراسة تشير إلى وجود الجينات المختارة في دراستنا في جينوم الليشمانية المدارية.

يتطلب إثبات وجود هذه الجينات استخدام مشاريع نوعية تسمح بتضخيمها بواسطة تفاعل PCR وتطهيرها بواسطة الرحلان الكهربائي. في الحقيقة يتطلب تصميم هذه المشاريع مقارنة تطابق تسلسلات الجينات المختارة لدى الأنواع الأخرى من الليشمانية. تسمح مقارنة تسلسلات الجينات السابقة مع الجينوم البشري بالحكم على إمكانية استخدام الجينات المختارة كلقاح حيث يتطلب ذلك عدم وجود نسبة عالية من التشابه مع الجينوم البشري ونضمن بذلك عدم تشكل أي رد فعل مناعي تجاه الجينوم البشري عند التلقيح.

٢-١- وجود جين H2A لدى أنواع الليشمانية الأخرى

٢-١-١ مقارنة تطابق تسلسل جين H2A لدى أنواع الليشمانية الأخرى

تم إجراء ترصيف Alignment التسلسلات المنشورة في بنك الجينات لهذا الجين عند خمسة أنواع من الليشمانية، ملحق ١، تشمل الليشمانية الطفلية ورمز الجين فيها LINJ_21_1160، والليشمانية الدونوفانية LDBPK_211160، والليشمانية الكبيرة LMJF_29_1730، والليشمانية المكسيكية LMXM_08_29_1720 والليشمانية البرازيلية LBRM_21_1140. يبين الملحق ١ أن هذا الجين يتألف من ٣٩٩ زوج أساس وقد وجدنا أن حجم هذا الجين هو نفسه لدى جميع الأنواع السابقة. تبين مقارنة تسلسلات الأنواع السابقة أن نسبة التطابق تتراوح بين ٩١-١٠٠%. وحصلنا على النتائج نفسها من حيث حجم الجين ونسبة تطابق التسلسلات لدى ترصيف تسلسلات الذراري السابقة ولكن لم نضع جدولاً بها لانتفاء الحاجة لضخامة المعلومات.

قمنا بمقارنة التسلسلات السابقة وتحديد نسبة التشابه في منطقة المشاريع المباشرة أي في بداية التسلسل، وفي منطقة المشاريع العكسية أي في نهاية التسلسل، وذلك لتصميم المشاريع التي يفترض أن تكون الأكثر ملاءمة لهذه الجين عند الليشمانية المدارية.

اعتمد تسلسل H2A لليشمانية الكبيرة في NCBI ذو الرقم XM_003722207.1 وتسلسل H2A لليشمانية الطفلية المنشور في NCBI، ذو الرقم XM_003392413، لتصميم المشاريع وبلغت نسبة التطابق بينهما ٩٧,٣%. وقد اعتمدنا هذين التسلسلين كونهما الأكثر تكراراً بين الأنواع والذاري مما يزيد من احتمال مطابقتها لتسلسل هذه الجين ضمن جينوم الليشمانية المدارية، ولأن هذين النوعين يسببان إصابة جلدية مشابهة لتلك التي تسببها الليشمانية المدارية.

هذا وبينت مقارنة تسلسل البروتين الذي يشفره هذا الجين، في جميع من الأنواع السابقة، أنه يتألف من ١٣٢ حمضاً أمينياً.

٢-١-٢ نسبة تطابق تسلسل جين H2A مع الجينوم البشري

تم تحري تطابق تسلسلي جين H2A عند الليشمانية الكبيرة ذو الرقم XM_003722207.1 والليشمانية الطفلية ذو الرقم XM_003392413 المعتمدين في تصميم المشاريع مع الجينوم البشري باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi.

تبين عدم وجود أي تطابق مع الجينوم البشري، ملحق ٢، وبالتالي يمكن استخدام هذا الجين من حيث المبدأ لتحضير لقاح DNA يحوي هذا الجين.

٢-٢ وجود جين H2B لدى أنواع الليشمانية الأخرى

١-٢-٢ مقارنة تطابق تسلسل جين H2B لدى أنواع الليشمانية الأخرى

تم إجراء ترصيف Alignment للتسلسلات المنشورة في بنك الجينات لهذا الجين عند ثلاثة أنواع من الليشمانية، الملحق ٣، تشمل الليشمانية الطفلية ورقم الجين فيها LINJ_09_1410، والليشمانية الدونوفانية LDBPK_091410، والليشمانية الكبيرة H2B L.major (H2B). يبين الملحق ٣ أن هذا الجين يتألف من ٣٣٦ زوج أساس وقد وجدنا أن حجم هذا الجين هو نفسه لدى جميع الأنواع السابقة.

تبين مقارنة تسلسلات الأنواع السابقة أن نسبة التطابق تتراوح بين ٩٠,٩-١٠٠%. وحصلنا على النتائج نفسها من حيث حجم الجين ونسبة تطابق التسلسلات لدى ترصيف تسلسلات الذراري السابقة ولكن لم نضع جدولاً بها لانتفاء الحاجة ولضخامة المعلومات.

اعتمد تسلسل H2B الليشمانية الكبيرة في بنك الجينات ذو الرقم AF336276.1 وتسلسل H2B لليشمانية الطفلية المنشور في NCBI، ذو الرقم XM_001463561.1، لتصميم المشاريع وبلغت نسبة التطابق بينهما ٩٧,٣%.

هذا وبينت مقارنة تسلسل البروتين الذي يشفره هذا الجين، في جميع من الأنواع السابقة، أنه يتألف من ١١١ حمضاً أمينياً.

٢-٢-١ نسبة تطابق تسلسل جين H2B مع الجينوم البشري

تم تحري تطابق تسلسل جين H2B عند الليشمانية الكبيرة ذو الرقم AF336276.1، والليشمانية الطفلية ذو الرقم XM_001463561.1 المعتمدين في تصميم المشاريع مع الجينوم البشري باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi. وتبين عدم وجود أي تطابق مع الجينوم البشري، الملحق ٢، وبالتالي يمكن استخدام هذا الجين من حيث المبدأ لتحضير لقاح DNA يحوي هذا الجين.

٢-٢-٣ وجود جين H3 لدى أنواع الليشمانية الأخرى

٢-٣-١ مقارنة تطابق تسلسل جين H3 لدى أنواع الليشمانية الأخرى

تم إجراء ترصيف Alignment للتسلسلات المنشورة في بنك الجينات لهذا الجين عند أربع أنواع من الليشمانية، الملحق ٤، تشمل الليشمانية الطفلية ورمز الجين فيها LINJ_10_0920، والليشمانية الدونوفانية LDBPK_100920 والليشمانية الكبيرة LMJF_16_0600 والليشمانية المكسيكية LMXM_16_0570. يبين الملحق ٤ أن هذا الجين يتألف من ٣٩٣ زوج أساس وقد وجدنا أن حجم هذا الجين هو نفسه لدى جميع ذراري الأنواع السابقة. تبين مقارنة التسلسلات السابقة أن نسبة التطابق تتراوح بين ٩٦,٤-١٠٠% على مستوى الذراري والأنواع. وحصلنا على النتائج نفسها من حيث حجم الجين ونسبة تطابق التسلسلات لدى ترصيف تسلسلات الذراري السابقة ولكن لم نضع جدولاً بها لانتفاء الحاجة ولضخامة المعلومات.

قمنا بمقارنة التسلسلات السابقة وتحديد نسبة التشابه في منطقة المشاريع المباشرة أي في بداية التسلسل، وفي منطقة المشاريع العكسية أي في نهاية التسلسل، وذلك لتصميم المشاريع التي يفترض أن تكون الأكثر ملاءمة لهذا الجين عند الليشمانية المدارية.

واعتمد تسلسل جين H3 لليشمانيّة الكبيرة في NCBI ذو الرقم XM_001463703.1 وتسلسل جين H3 لليشمانيّة الكبيرة في NCBI ذو الرقم XM_001682087.1، لتصميم المشارع وبلغت نسبة التطابق بينهما ٩٨,٢%. وقد اعتمدنا هذين التسلسلين كونهما الأكثر تكراراً بين الأنواع والذاري مما يزيد من احتمال مطابقتها لتسلسل هذا الجين ضمن جينوم الليشمانيّة المدارية، ولأن هذين النوعين يسببان إصابة جلدية مشابهة لتلك التي تسببها الليشمانيّة المدارية.

هذا وبينت مقارنة تسلسل البروتين الذي يشفره هذا الجين، في جميع من الأنواع السابقة، أنه يتألف من ١٣٠ حمضاً أمينياً.

٢-٣-٢ نسبة تطابق تسلسل جين H3 مع الجينوم البشري

تم تحري تطابق تسلسل جين H3 لليشمانيّة الكبيرة ذو الرقم XM_001463703.1، وجين H3 لليشمانيّة الطفلية ذو الرقم XM_001682087.1 المعتمدين في تصميم المشارع مع الجينوم البشري باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi. تبين عدم وجود أي تطابق مع الجينوم البشري، الملحق ٥، وبالتالي يمكن استخدام هذا الجين من حيث المبدأ لتحضير لقاح DNA يحوي هذا الجين.

٢-٤-٢ اثبات وجود جين H4

٢-٤-١ تطابق تسلسل جين H4 لدى أنواع الليشمانيّة الأخرى

تم إجراء ترصيف Alignment للتسلسلات المنشورة في بنك الجينات لهذا الجين عند خمسة أنواع من الليشمانيّة، الملحق ٦، تشمل الليشمانيّة الطفلية LINJ_31_3320، والليشمانيّة الدونوفانية LDBPK_360020، والليشمانيّة الكبيرة LMJF_02_0020، والليشمانيّة المكسيكية LMXM_25_2450، والليشمانيّة البرازيلية LBRM_02_0020. يبين الملحق ٦ أن هذا الجين يتألف من ٣٠٣ زوج أساس وقد وجدنا أن حجم هذا الجين هو نفسه لدى جميع الأنواع السابقة. تبين مقارنة التسلسلات السابقة أن نسبة التطابق تتراوح بين ٩٢-١٠٠% لدى جميع الأنواع السابقة. وحصلنا على النتائج نفسها من حيث حجم الجين ونسبة تطابق التسلسلات لدى ترصيف تسلسلات الذاري السابقة ولكن لم نضع جدولاً بها لانتفاء الحاجة ولضخامة المعلومات.

قمنا بمقارنة التسلسلات السابقة وتحديد نسبة التشابه في منطقة المـشـارـع المباشرة أي في بداية التسلسل، وفي منطقة المـشـارـع العكسية أي في نهاية التسلسل، وذلك لتصميم المـشـارـع التي يفترض أن تكون الأكثر ملاءمة لهذا الجين عند الليشمانية المدارية.

اعتمد تسلسل جين H4 لليشمانية الكبيرة في NCBI ذو الرقم M_003721559.1 وتسلسل جين H4 لليشمانية الطفالية ذو ارقم XM_001467608.1، لتصميم المـشـارـع وبلغت نسبة التطابق بينهما ٩٨.٣%.

هذا وبينت مقارنة تسلسل البروتين الذي يشفره هذا الجين، في جميع من الأنواع السابقة، أنه يتألف من ١٠٠ حمضاً أمينياً.

٢-٤-٢ نسبة تطابق تسلسل جين H4 مع الجينوم البشري

تم تحري تطابق تسلسل جين H4 لليشمانية الكبيرة ذو الرقم XM_003721559.1 وجين الليشمانية الطفالية ذو الرقم XM_001467608.1 المعتمدين في تصميم المـشـارـع مع الجينوم البشري باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi. تبين عدم وجود أي تطابق مع الجينوم البشري، الملحق ٥، وبالتالي يمكن استخدام هذا الجين من حيث المبدأ لتحضير لقاح DNA يحوي هذا الجين.

٣- تصميم المـشـارـع

تم تصميم المـشـارـع يدوياً اعتماداً على تسلسل الجينات لدى الليشمانية الطفالية والليشمانية الكبيرة وباستخدام التطبيقات التـالـيـة <http://www.idtdna.com/calc/analyzer> و http://www.geneinfinity.org/sms/sms_primanalysis.html. تم تصنيع مـشـارـع عالية النقاوة، وفقاً للتسلسل الذي قمنا بتصميمه، من قبل شركة VBC-BIOTECH، فيينا.

٣-١- التسلسلات النهائية لمـشـارـع جين H2A

تم تصميم مـشـارـع مباشرة تتوافق مع إنزيم القطع ECORI، ومـشـارـع عكسية تتوافق مع إنزيم القطع XBAI. تمت إضافة الأسس ATTA للمشرع المباشر والأساسين CT للمشرع العكسي من أجل زيادة فعالية الهضم للأنزيمات وذلك بناء على التعليمات

المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتطاع. يوضح الجدول ٩ تسلسلات المشاريع النهائية المصممة لتضخيم جين H2A.

الجدول ٩. تسلسلات المشاريع المعتمدة لتضخيم الجينات المدروسة.

جين	نوع المشروع	تسلسل المشروع البدئي	تسلسل التعرف لأنزيم القطع	تسلسل مطلوب لزيادة فعالية الهضم
جين H2A	مشروع مباشر	ATG GCT ACT CCT CGC AGC G -3'	GAATTC	5'-ATTA
	مشروع عكسي	CTAAGCGCTCGGTGTCGCCTTG-3'	TCTAGA	5'-CT
جين H2B	مشروع مباشر	ATG GCC TCT TCT CGC TCT GC -3'	GAATTC	5'- ATA
	مشروع عكسي	TCAAGCCGACGCGCTCGAC -3'	TCTAGA	5'- CT
جين H3	مشروع مباشر	ATG TCC CGC ACC AAG GAG A -3'	TCTAGA	5'-TA
	مشروع عكسي	TTAGTGCGCTCACCGC -3'	GTCGAC	5'- ATT
جين H4	مشروع مباشر	ATG GCC AAG GGC AAG CGC TC -3'	GAATTC	5'- ATCA
	مشروع عكسي	TTACGCGTAGCCGTAGAGGATG -3'	TCTAGA	5'-ATG

٣-٢- التسلسلات النهائية لمشاريع جين H2B

تم تصميم مشروع مباشر يتوافق مع إنزيم القطع ECORI، ومشروع عكسي يتوافق مع إنزيم القطع XBAI. تمت إضافة الأسس ATA للمشروع المباشر والأساسين CT للمشروع العكسي من أجل زيادة فعالية الهضم للأنزيمات وذلك بناء على التعليمات المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتطاع. يوضح الجدول ٩ تسلسلات المشاريع النهائية المصممة لتضخيم جين H2B.

٣-٣- التسلسلات النهائية لمشاريع جين H3

تم تصميم مشروع مباشر يتوافق مع إنزيم القطع XBAI، ومشروع عكسي يتوافق مع إنزيم القطع SALI. تمت إضافة الأسس TA للمشروع المباشر والأساسين ATT للمشروع العكسي من أجل زيادة فعالية الهضم للأنزيمات وذلك بناء على التعليمات المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتطاع. يوضح الجدول ٩ تسلسلات المشاريع النهائية المصممة لتضخيم جين H3.

٣-٤- التسلسلات النهائية لمشاريع جين H4

تم تصميم مشروع مباشر يتوافق مع إنزيم القطع ECORI، ومشروع عكسي يتوافق مع إنزيم القطع XBAI. تمت إضافة الأسس ATCA للمشروع المباشر والأساسين ATG للمشروع العكسي من أجل زيادة فعالية الهضم للأنزيمات وذلك بناء على التعليمات المرفقة بفعالية إنزيمات الاقتطاع. يوضح الجدول ٩ تسلسلات المشاريع النهائية المصممة لتضخيم جين H4.

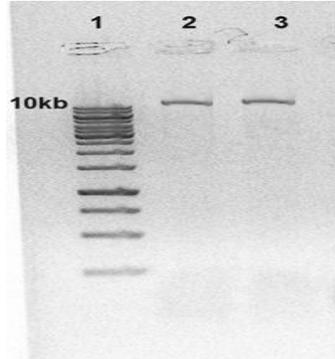
٤- تضخيم الجينات المختارة باستخدام المشاريع النوعية المصممة

تم تضخيم الجينات بواسطة تفاعل PCR، يتطلب ذلك استخلاص الدنا من الطفيليات أولاً.

٤-١- استخلاص الدنا DNA

استخلص الدنا الجينومي من رسابة الطفيليات باستخدام عتيدة خاصة باستخلاص الدنا لشركة Thermo scientific الأميركية، قمنا بتعديل تركيز البروتيناز K حيث استخدمناه بتركيز ٤٠ نغ/مكرو لتر بدلاً من ٢٠ نغ/مكرو لتر للتخلص من البروتينات والأنزيمات مثل DNAase وبالتالي ضمان استخلاص الدنا من طفيليات الليشمانية بالشكل الأمثل. تم التأكد من جودة الدنا المستخلص من المستنبتات بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامه أغاروز بتركيز ٠,٨%. أظهر تعريض الهلامة لمنبع الأشعة فوق البنفسجية 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 تدرجه أثناء الاستخلاص. وتمت معايرة الدنا المستخلص من ١٠٠ مليون من طفيليات

الليشمانية المدارية ، وقيست نقاوته فكان تركيز الدنا المستخلص مساوياً لـ ١٩٠ نانوغرام /مكل ، وكانت النسبة A260/A280 تساوي ١.٨ ، مما يشير إلى نقاوة عالية لعينة الدنا المستخلصة وخلوها بشكل شبه كامل من البروتينات



الشكل ٢٢. رحلان الدنا الجينومي لطفيليات الليشمانية المدارية. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 1kb، ويمثل البئرين ٢ و ٣ عينتي دنا جينومي مستخلصتين من طفيليات الليشمانية.

٢-٤- التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR لتضخيم الجينات المختارة

يسمح تضخيم الجينات المختارة باستخدام المشراع النوعية لكل منها، بأثبات وجود الجين ضمن جينوم الليشمانية المدارية. قمنا بتحضير وتصميم البروتوكول المطلوب لتفاعل PCR الخاص بكل جين والمذكور في فقرة المواد والطرائق.

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز ٢% لنتائج تفاعل التضخيم التسلسلي لجين H2A باستخدام المشراع المباشر والمشراع العكسي عصابة واحدة فقط، الشكل ٢٣، بطول قريب من ٤٠٠ bp (٣٩٩ bp تقريباً). لم يظهر الرحلان أي عصابة أخرى مما يعكس عدم تضخيم أي جين آخر، ويعكس بالتالي نوعية المشراع المصممة للجين H2A. وهكذا نكون قد أثبتنا وجود جين H2A ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا لدى مقارنة تطابق تسلسل هذه الجين لدى الليشمانية المدارية مع الأنواع الأخرى.

كما وأظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز ٢% لنتائج تفاعل التضخيم التسلسلي لجين H2B باستخدام المشراع المباشر والمشراع العكسي عصابة واحدة فقط، الشكل ٢٣، بطول قريب من ٣٥٠ bp (٣٣٣ bp تقريباً). هذا ولم يظهر الرحلان أي

عصابة أخرى مما يعكس عدم تضخيم أي جين آخر، ويعكس بالتالي نوعية المشرع المصممة للجين H2B. وهكذا نكون قد أثبتنا وجود جين H2B ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا لدى مقارنة تطابق تسلسل هذه الجين لدى الليشمانية المدارية مع الأنواع الأخرى.

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامه أغاروز ٢% لنتائج تفاعل التضخيم التسلسلي للجين H3 باستخدام المشرع المباشر والمشرع العكسي عصابة واحدة فقط، الشكل ٢٣، بطول قريب من ٤٠٠ bp (٣٩٣ bp تقريباً). هذا ولم تظهر أي عصابة أخرى مما يعكس عدم تضخيم أي جين آخر، ويعكس بالتالي نوعية المشرع المصممة للجين H3. وهكذا نكون قد أثبتنا وجود جين H3 ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا لدى مقارنة تطابق تسلسل هذه الجين لدى الليشمانية المدارية مع الأنواع الأخرى.

أخيراً أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامه أغاروز ٢% لنتائج تفاعل التضخيم التسلسلي للجين H4 باستخدام المشرع المباشر والمشرع العكسي عصابة واحدة فقط، الشكل ٢٣، بطول قريب من ٣٠٠ bp (٣٠٣ bp تقريباً). هذا ولم تظهر أي عصابة أخرى مما يعكس عدم تضخيم أي جين آخر، ويعكس بالتالي نوعية المشرع المصممة للجين H4. وهكذا نكون قد أثبتنا وجود جين H4 ضمن جينوم الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا لدى مقارنة تطابق تسلسل هذه الجين لدى الليشمانية المدارية مع الأنواع الأخرى.



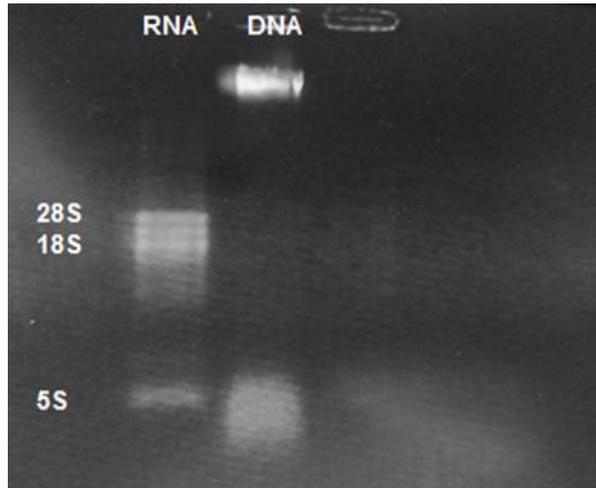
الشكل ٢٣. رحلان ناتج تضخيم الجينات باستخدام المشرع النوعية لكل جين. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50bp، ويمثل البئر ٢ عصابة الجين H2A بطول ٣٩٩ زوج أساس، ويمثل البئر ٣ عصابة الجين H2B بطول ٣٣٦ زوج أساس، ويمثل البئر ٤ عصابة الجين H3 بطول ٣٩٣ زوج أساس، ويمثل البئر ٥ عصابة الجين H4 بطول ٣٠٣ زوج أساس.

٥-التعبير عن الجينات المختارة

بعد أن أثبتنا وجود هذه الجينات في الجينوم، يجب أن نعرف فيما إذا كان يتم التعبير عن هذه الجينات أم لا. وبالتالي تهدف هذه الخطوة إلى إثبات حدوث التعبير الجيني عن الجينات المختارة من خلال تحري وجودها على مستوى cDNA . ولتنفيذ ذلك تم استخلاص الرنا من طفيليات الليشمانية المدارية وتحويله إلى دنا متمم cDNA ومن ثم إجراء تفاعل التضخيم التسلسلي للجينات المختارة على الدنا المتمم باستخدام المشارع النووية لكل جين.

٥-١- استخلاص الرنا RNA من طفيليات الليشمانية المدارية

تم استخلاص الرنا من ١٠٠ مليون طفيلي من طفيليات الليشمانية المدارية باستخدام عتيدة عزل الرنا GeneJET RNA purification وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. تم التأكد من جودة الرنا المستخلص من الطفيليات حيث قيست نقاوته بجهاز NANO DROP وبلغت ٢,١ وبلغ تركيز العينة ١٥٠٠ نانوغرام /مكل وبالتالي بلغ مردود الاستخلاص ٥٢,٥ مكغ. أظهر ترحيل عينة الرنا المستخلصة بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامه أغاروز بتركيز ٠,٨%، بعد تعريض الهلام لمنبع الأشعة فوق البنفسجية، وجود عصابتي 28s و18s واضحتين وعصابة 5S بينما لم يظهر عصابة للدنا مما يدل على عدم تلوث الرنا بالدنا الجينومي.



الشكل ٢٤. رحلان الرنا والدنا لطفيليات الليشمانية المدارية. يمثل البئر ١ رحلان عينة رنا الطفيليات، ويمثل البئر ٢ رحلان عينة الدنا الجينومي للطفيليات.

٢-٥- اصطناع الدنا المتمم cDNA

بعد استخلاص الرنا من طفيليات الليشمانية تم تحويله إلى دنا متمم cDNA، باستخدام عتيدة اصطناع الدنا المتمم cDNA من شركة Thermo scientific، وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة بدون أي تعديل. وبعد ذلك أجري تفاعل PCR للجينات المختارة باستخدام الدنا المتمم لسلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا كمرصاف.

٣-٥- تضخيم الدنا المتمم للجينات المختارة

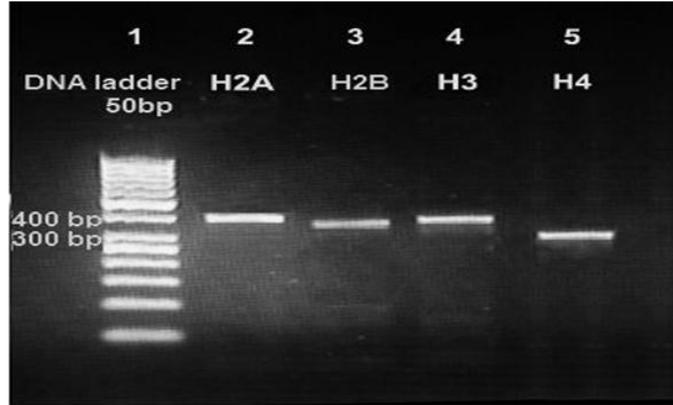
يهدف تضخيم الدنا المتمم للجينات المختارة، باستخدام المشارع النوعية لكل منها، إلى إثبات التعبير الجيني عن الجين ضمن الليشمانية المدارية. تم إجراء هذا التفاعل وفق البروتوكول الخاص بكل جين والمذكور سابقاً في فقرة المواد والطرائق.

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز ٢% لنتائج التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR لجين H2A باستخدام المشرع المباشر والمشرع العكسي، الشكل ٢٥، وجود عصابة واحدة بطول ٣٩٩ bp تقريباً، مما يثبت حدوث التعبير عن هذا الجين.

كما أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز ٢% لنتائج التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR لجين H2B باستخدام المشرع المباشر والمشرع العكسي، الشكل ٢٥، وجود عصابة واحدة بطول ٣٣٦ bp تقريباً، مما يثبت حدوث التعبير عن هذا الجين.

وأظهرت أيضاً نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز ٢% لنتائج التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR لجين H3 باستخدام المشرع المباشر والمشرع العكسي، الشكل ٢٥، وجود عصابة واحدة بطول ٣٩٣ bp تقريباً، مما يثبت حدوث التعبير عن هذا الجين.

وأخيراً أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز ٢% لنتائج التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR لجين H4 باستخدام المشرع المباشر والمشرع العكسي، الشكل ٢٥، وجود عصابة واحدة بطول ٣٠٣ bp تقريباً، مما يثبت حدوث التعبير عن هذا الجين.



الشكل ٢٥. رحلان ناتج تضخيم الدنا المتمم للجينات المختارة باستخدام المشارع النوعية لكل جين. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50bp، يمثل البئر ٢ عصابة الجين H2A بطول ٣٩٩ bp، ويمثل البئر ٣ عصابة الجين H2B بطول ٣٣٦ bp، ويمثل البئر ٤ عصابة الجين H3 بطول ٣٩٣ bp، ويمثل البئر ٥ عصابة الجين H4 بطول ٣٠٣ bp .

٦- تحضير اللقاح باستخدام كل جين من الجينات المختارة

تم اختيار بلاسميد PCI لحمل الجينات المختلفة المدروسة. يتطلب تحضير اللقاح تأشيب هذا البلاسميد بكل جين من الجينات وتكثير البلاسميد المؤشب ضمن جراثيم Ecoli TOP10. يتطلب تأشيب البلاسميد بالجينات بداية تهضيم البلاسميد بأنزيمي قطع يستخدم الأول لبداية الجين والثاني لنهايته. وقد اخترنا في دراستنا إنزيمات الاقتطاع التالية ECORI/XBAI لجينات H2A و H2B و H4، وإنزيمي XBAI/SALI لجين H3. وبالتالي سنستعرض نتائج هذا الخطوات.

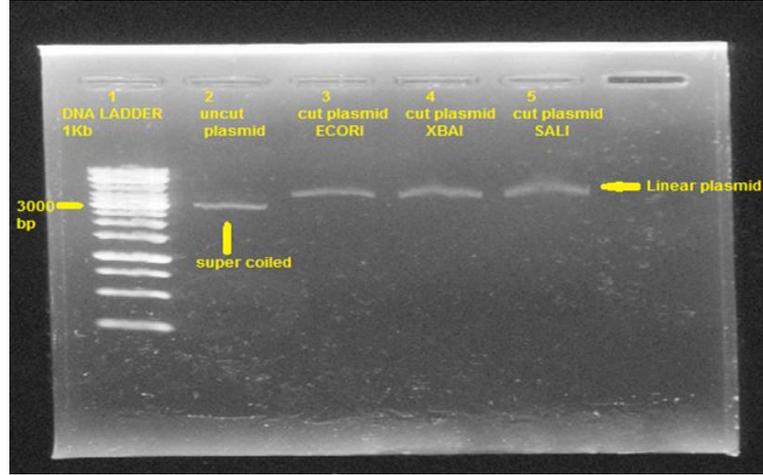
٦-١- تفاعل التهضيم Digestion

تم أولاً ضبط الشروط المثلى لتفاعل التهضيم لكل إنزيم اقتطاع على حدى، ومن ثم تطبيق الإنزيمين المطلوبين معاً.

٦-١-١- التأكد من فعالية إنزيمات الاقتطاع وضبط شروط تفاعل التهضيم

تم تهضم البلاسميد باستخدام ثلاثة إنزيمات اقتطاع، SALI أو ECORI أو XBAI، واستخدم في كل مرة إنزيم واحد فقط. ضبطت الشروط المثلى للتفاعل من حيث درجة الحرارة ومدة الحضان المطلوبة للتهضيم. سمح حضان الأنابيب الحاوية على البلاسميد وإنزيم الاقتطاع، والمواد الأخرى اللازمة للتفاعل، في حمام مائي درجة حرارته ٣٧م لمدة ساعتين وترحيل نواتج التهضيم على هلاما اغاروز ٠,٨% بالحصول على

بروفاييل قطع نموذجي للبلاسميد. أظهر البروفاييل السابق، الشكل ٢٦، وجود عصابة البلاسميد الخطية التي تكون أعلى من عصابة البلاسميد المغلق، مما يدل على حدوث عملية الهضم وتحول البلاسميد من الشكل الحلقي المغلق إلى الشكل الخطي. وبالتالي بينت نتائجنا تماثل الشروط المثلى لفعالية القطع لكل الإنزيمات الثلاثة المستخدمة.

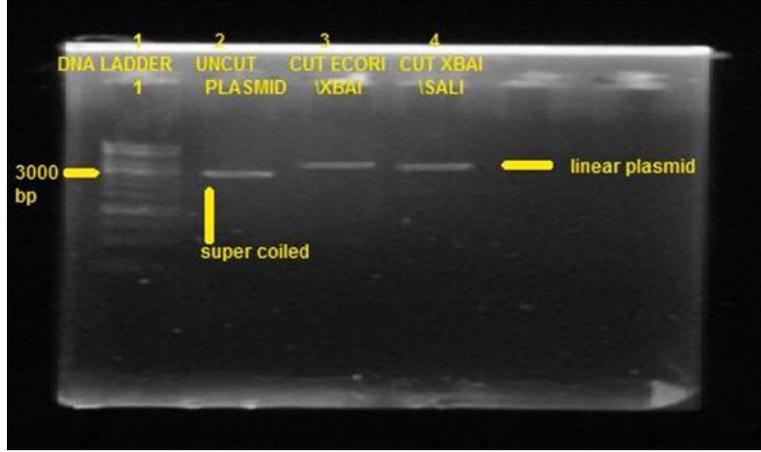


الشكل ٢٦. نمط رحلان البلاسميدات المهضمة بإنزيم اقتطاع واحد. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 1Kb، والبئر ٢ بلازميد غير مهضم، والبئر ٣ عصابة البلاسميد المهضم بإنزيم ECORI، والبئر ٤ عصابة البلاسميد المهضم بإنزيم XBAI، والبئر ٥ عصابة البلاسميد المهضم بإنزيم SALI.

٦-١-٢- التهضيم الثنائي للبلاسميدات والجينات

سمح تماثل الشروط المطلوبة لفعالية إنزيمات الاقتطاع بتطبيق التهضيم الثنائي للبلاسميدات بإنزيمي الاقتطاع ECORI\XBAI لتنسيل الجينات H2A و H2B و H4، أو بإنزيمي الاقتطاع XBAI\SALI لتنسيل الجين H3 وذلك وفقاً للبروتوكول المذكور في فقرة المواد والطرائق. أظهر ترحيل البلاسميدات المهضمة على هلامة أغاروز تركيزها ٨٠%، الشكل ٢٧، وجود عصابات البلاسميد الخطي مما يدل على حدوث عملية التهضيم.

كما تم تهضيم الجينات أيضاً باستخدام الإنزيمات السابقة، لكن وبما أن القطع لا يغير من حجم الجين، نظراً لقيامنا بوضع تسلسل القطع في بداية الجين، فإننا لم نقم بترحيل الجينات المهضمة.



الشكل ٢٧. نمط رحلان البلازميدات المهضمة بإنتزيمي اقتطاع معاً وبنفس الوقت. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 1Kb، والبئر ٢ بلازميد غير مهضم supercoiled، والبئر ٣ عصابة البلازميد المهضم بالإنزيمين ECORI \XBAI، والبئر ٤ عصابة البلازميد المهضم بالإنزيمين XBAI\SALI.

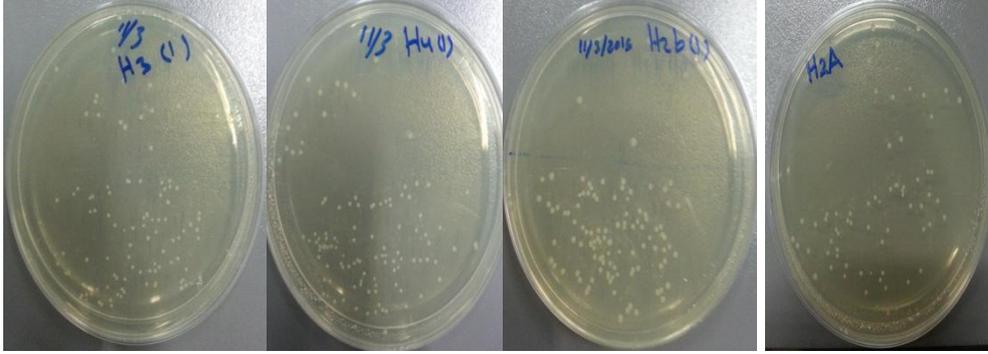
٢-٦- ربط البلازميد بالجينات المختارة

بعد انتهاء عملية التهضيم تمهيداً للتأشيب، نقيت الجينات المهضمة والبلازميد المهضم وفقاً للبروتوكول المتبع في المواد والطرائق باستخدام عتيدة Gene Jet PCR Purification Kit وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. تم تأشيب الجينات والبلازميد بواسطة عتيدة T4 Ligase من شركة Thermo scientific وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة.

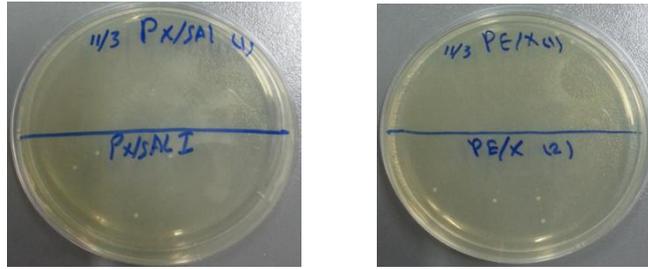
٣-٦- تفاعل الاستحالة Transformation

قمنا باختيار جراثيم *E. coli* TOP 10 لتكثير البلازميد المأشوب. تم إدخال البلازميد المأشوب في جراثيم *E. coli* TOP 10، الاستحالة Transformation، المهيئة بطريقة كلوريد الكالسيوم حسب البروتوكول المتبع في المواد والطرائق. كما تم إدخال بلازميد غير مأشوب، بلازميد مغلق لا يحوي أية جين، في الجراثيم السابقة كشاهد. نظراً لاحتواء البلازميد على جين مقاومة للأمبيسلين يشير نمو الجراثيم على مستنبت الزرع LB آغار، Luria-Bertani agar، الحاوي على الأمبيسلين إلى احتواء الجراثيم النامية إما على بلازميد فارغ أو بلازميد مؤشوب. وبالتالي يمكن أن تحتوي المستعمرات

النامية على الوسط بلاسميد فارغ أو مأشوب. يجب انتقاء المستعمرات الحاوية على بلاسميد مأشوب حتى تتمكن من تكثير البلاسميد المأشوب.



أ



ج

ب

الشكل ٢٨. نمو مستعمرات جراثيم الإشريكية الكولونية Top10 على وسط LB أغار يحتوي على الأمبيسلين. تمثل الأطباق (أ) نمو مستعمرات جراثيم الإشريكية الكولونية Top10 الحاوية على بلاسميد مأشوب بإحدى الجينات المدروسة H2A أو H2B أو H3 أو H4 على وسط LB أغار يحتوي على الأمبيسلين. يمثل الطبقين (ب و ج) نمو مستعمرات جراثيم الإشريكية الكولونية Top 10 الحاوية على بلاسميد مغلق، ويمثلان شاهداً سلبياً للتجربة يعكس قلة عدد المستعمرات النامية على هذه الأطباق. تشير الرموز E و X و S إلى بداية أسماء إنزيمات الاقتطاع المستخدمة أثناء التهضيم.

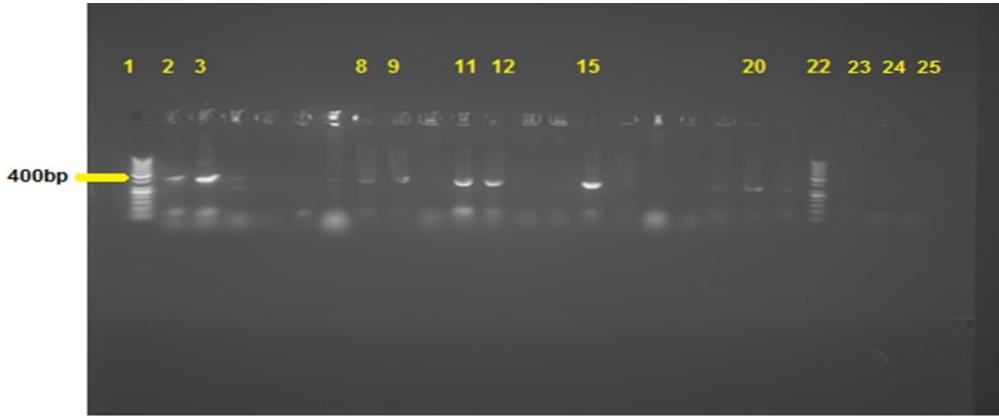
٦-٤- اختيار المستعمرات النامية الحاوية على البلاسميد المأشوب

٦-٤-١- تحري وجود الجينات ضمن المستعمرات النامية

يجب إثبات أولاً وجود الجين ضمن المستعمرات الجرثومية النامية الحاوية على البلاسميدات المأشوبة. ينعكس نجاح استحالة البلاسميد الفارغ أو المأشوب بنمو مستعمرات الجراثيم الحاوية عليها على المستنبت الزراعي.

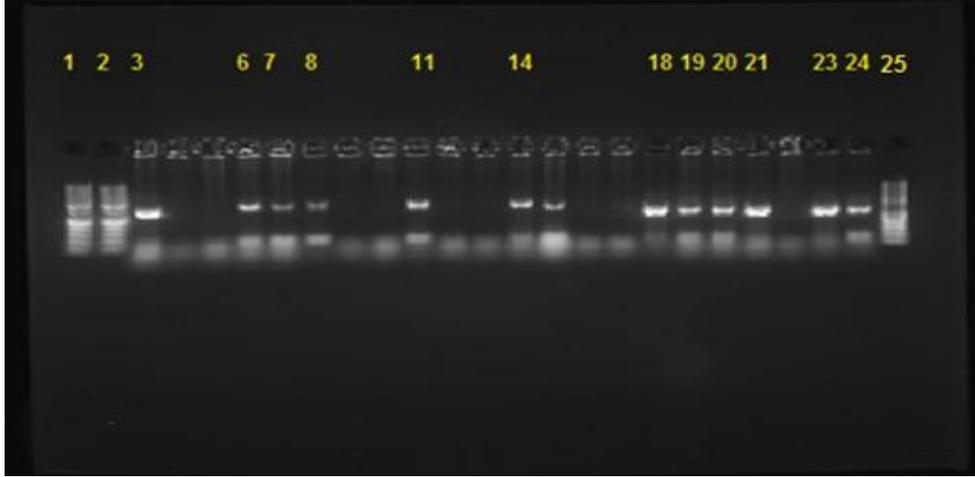
زرعت مستعمرات الجراثيم التي يجب أن تحتوي على أحد أنواع البلاسميدات المأشوبة بكل جين من الجينات على طبق بتري منفرد. كما زرعت الجراثيم الحاوية على بلاسميد فارغ على طبق منفرد. تم انتقاء عشوائي لعدد من المستعمرات النامية على كل طبق من الأطباق السابقة، وأجريت تفاعلات PCR لكشف وجود الجينات في كل مستعمرة من المستعمرات السابقة.

أخذ من كل طبق زرع خاص بكل جين ١١ مستعمرة جرثومية وحضر معلق جرثومي لكل مستعمرة على حدى. زرع نصف المعلق السابق على مستنبت LB-Agar الحاوي على ampicillin وحضن لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧°م للحصول على مستعمرات نقية من كل مستعمرة، وحفظت الأطباق بدرجة + ٨°م. استخدم النصف الآخر من المعلق للتأكد من وجود الجراثيم في المستعمرات بواسطة تفاعل PCR وفق الشروط المذكورة سابقاً بقسم المواد والطرائق وباستخدام المشارع النوعية لكل جين. بينت نتائجنا احتواء عدد من المستعمرات على الجين، حيث تراوحت نسبة هذه المستعمرات بين ٥٠-٧٠%.



الشكل ٢٩. نمط رحلان نتائج تفاعل PCR لتضخيم الجينات المدروسة في المستعمرات الجرثومية. يمثل البنران ٢٢ و ٢١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50bp. تمثل الأبار ٢ و ٣ و ١١ و ١٢ نواتج تفاعل pcr إيجابي لتضخيم جين H2A حيث ظهرت عصابات بطول ٣٩٩ زوج أساس. وتمثل الأبار ٤ و ٥ و ٦ و ٧ نواتج تفاعل pcr إيجابي ضعيفة أو سلبي لتضخيم جين H2A. ويمثل البنران ٥ و ٢٠ نواتج تفاعل pcr إيجابي لتضخيم جين H2B حيث ظهرت عصابات بطول 336 زوج أساس. وتمثل الأبار ٣ و ١٤ و ١٦ و ١٧ و ١٨ و ١٩ و ٢١ نواتج تفاعل pcr إيجابي ضعيفة أو سلبي لتضخيم جين H2B. تمثل الأبار ٢٣ و ٢٤ و ٢٥ نواتج تفاعل PCR سلبي لتضخيم الجينات H2A و H2B على التوالي من مستعمرات مأخوذة من طبق الشاهد.

هذا وبينت نتائجنا عدم احتواء مستعمرات الشاهد على أية جين. يظهر الشكلان ٢٩ و ٣٠ نمط الترحيل على هلامة أغاروز ٢% لنواتج تضخيم الجينات بتفاعل PCR عند كل من المستعمرات الفارغة والحاوية على الجينات. تم استبعاد المستعمرات الفارغة السلبية والمستعمرات الإيجابية الضعيفة التي كان تركيز الجين فيها ضعيفاً، واخترنا المستعمرات التي احتوت كمية جيدة من الجين.



الشكل ٣٠. نمط رحلان نتائج تفاعل PCR لتضخيم الجينات المدروسة في المستعمرات الجرثومية. تمثل الآبار ١ و ٢ و ٢٥ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50bp. يمثل البئر ٣ نواتج تفاعل pcr إيجابي لتضخيم جين H2B حيث ظهرت عصابات بطول ٣٣٦ زوج أساس. وتمثل الآبار ٦-٧-٨-١١-١٤-١٥ نواتج تفاعل pcr إيجابي لتضخيم جين H3 حيث ظهرت عصابات بطول ٣٩٣ زوج أساس. وتمثل الآبار ٩-١٠-١٢-١٣ نواتج تفاعل PCR سلبي لتضخيم الجين H3. وتمثل الآبار ١٨-١٩-٢٠-٢١-٢٣-٢٤ نواتج تفاعل PCR إيجابي للجين H4 حيث ظهرت عصابات بطول ٣٠٣ زوج أساس. ويمثل أخيراً البئر ٢٢ ناتج تفاعل PCR سلبي لتضخيم الجين H4.

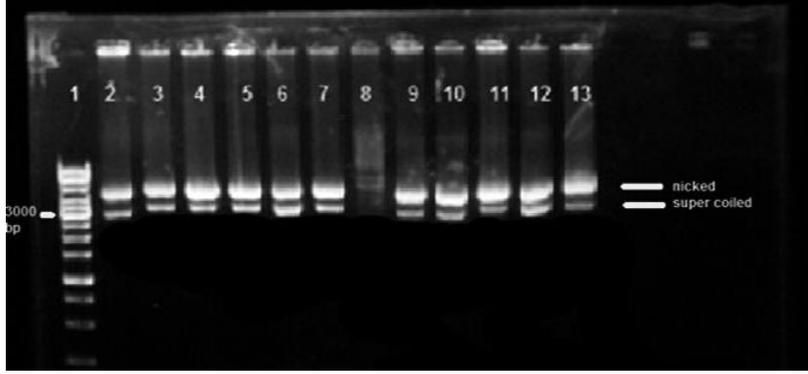
لكن وبما أن إيجابية وجود الجين لا تعني وجودها ضمن البلاسميد، فيجب بالتالي التأكد من وجود البلاسميد أولاً ضمن الجراثيم ومن ثم وجود الجين ضمن هذا البلاسميد.

٦-٤-٢- التأكد من وجود الشكل النموذجي للبلاسميد المغلق في المستعمرات الحاوية على الجينات المدروسة

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط LB أغار التي أظهرت تفاعل PCR إيجابي وبالتالي تحتوي أحد الجينات المدروسة. تم استخلاص البلاسميد المشوب من المستعمرات بعد تكثيرها على وسط مرق LB، ثم الاستخلاص بالطريقة اليدوية المذكورة

سابقاً في قسم المواد والطرائق. رحلت نواتج الاستخلاص على هلامة أغاروز بتركيز ٨، ٠، %.

يظهر الشكل ٣١ البلاسميد المستخلص من المستعمرات والمكون من عصابتين، عصابة البلازميد الحلقي المغلق Supercoiled، وعصابة البلاسميد nicked. البلازميد الحلقي المغلق Supercoiled هو الشكل النموذجي للبلاسميد ضمن الخلايا ويرحل على هلامة الأغاروز بشكل أسرع حيث تكون السلسلتين الحلزونيتين للدنا ملتفتان بشدة مع التواءات شديدة. أثناء عملية الاستخلاص بقي معظم البلاسميد بالشكل supercoiled لكن يتعرض جزء منه لحدوث تثلّمات nicks بإحدى السلسلتين مما يخفف من التواءاته ولكن يبقى بالشكل المغلق ويرحل هذا الشكل على هلامة الأغاروز بشكل أبطأ من شكل supercoiled.



الشكل ٣١. نمط رحلان البلاسميد المستخلص من المستعمرات الحاوية التي بين تفاعل PCR احتوائها على الجينات المدروسة. تظهر عصابات البلاسميد المغلق بنوعيه supercoiled و nicked. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 1Kb. تمثل الآبار ٢ و٣ و٤ و٥ رحلان البلاسميدات المستخلصة من المستعمرات حاوية على جين H2A. يمثل البئر ٦ و٧ رحلان البلاسميدات المستخلصة من مستعمرة حاوية على جين H2B. البئر ٨ لم تظهر عصابات البلاسميد بعد الاستخلاص من مستعمرة حاوية على جين H3 ولذلك تم استبعاد المستعمرة التي تم استخلاص البلاسميد منها. تمثل الآبار ٩ و١٠ رحلان بلاسميدات مستخلصة من مستعمرة حاوية على جين H3. وتمثل الآبار ١١ و١٢ و١٣ رحلان بلاسميدات مستخلصة من مستعمرة حاوية على جين H4.

٦-٤-٣- التأكيد من وجود الجينات ضمن البلاسميد في المستعمرات الحاوية على الجينات H2A أو H2B أو H3 أو H4.

بعد استخلاص البلاسميدات والتأكد من وجود البلاسميد بالشكل المغلق ضمن المستعمرات، تم التأكد من وجود الجينات H2A و H2B و H4 ضمن البلاسميدات بهضم

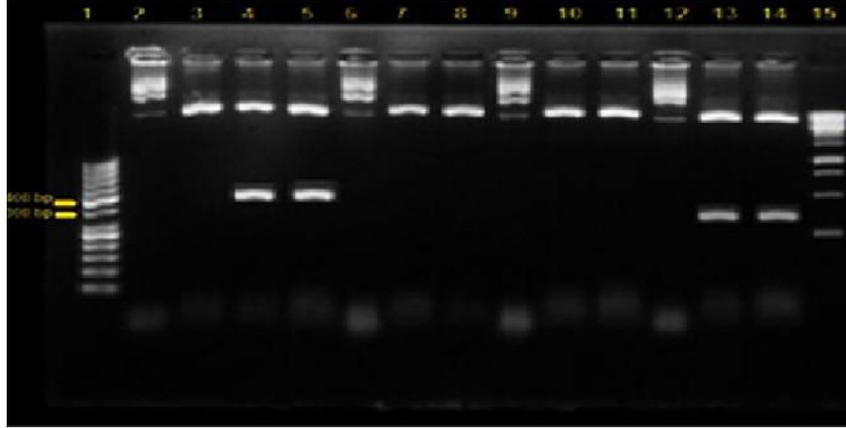
البلاسميدات بإنزيمي القطع ECOR1\XBAI والتأكد من وجود الجين H3 بهضم البلاسميدات بإنزيمي القطع XBAI/SAL1 وفق الشروط المذكورة سابقاً في فقرة المواد والطرائق. تم التأكد من فعالية التهضيم بترحيل نواتج تهضيم البلاسميدات المهضمة ومقارنتها مع نمط ترحيل بلاسميد غير مهضم يحوي الجين. يجب أن يظهر ترحيل البلاسميد، يبلغ حجمه ٤٠٠٦ زوج أساس، غير المهضم عصابة البلاسميد supercoiled و nicked. ويظهر ترحيل البلاسميد المهضم عصابة البلاسميد المهضم الخطية وعصابة الجين التي يحتويها البلاسميد والتي يختلف حجمها باختلاف الجين.

بالنسبة للبلاسميدات المؤشبة بجين H2A قمنا بتهضيم ثلاث عينات منفصلة تحتوي على بلاسميدات مؤشبة بهذه الجين وأظهر تفاعل PCR وجود الجين فيها، فظهرت في إحدى العينات في البئر ٣ من الشكل ٣٢ عصابة البلاسميد المهضم الخطية ولم تظهر عصابة الجين وذلك على الرغم من إيجابية تفاعل PCR لذلك تم استبعاد هذه العينة. بينما أظهر ترحيل العينتين الباقيتين في البئرين ٤ و ٥، الشكل ٣٢، عصابة الجين بطول ٣٩٩ زوج أساس بالإضافة إلى عصابة البلاسميد الخطية وبالتالي تم اختيار هاتين المستعمرتين لتكثير البلاسميد.

بالنسبة للبلاسميدات المؤشبة بجين H2B قمنا بتهضيم عينتين تحتويان على بلاسميدات مؤشبة بهذه الجين وأظهر تفاعل PCR وجود الجين فيها. ظهرت في العينتين في البئرين ٧ و ٨ من الشكل ٣٢، عصابة البلاسميد المهضم الخطية ولم تظهر عصابة الجين ولم تكتمل العمل على هذه الجين.

بالنسبة للبلاسميدات المؤشبة بجين H3 قمنا بتهضيم عينتين تحتويان على بلاسميدات مؤشبة بهذه الجين وأظهر تفاعل PCR وجود الجين فيها. ظهرت في العينتين في البئرين ١٠ و ١١ من الشكل ٣٢، عصابة البلاسميد المهضم الخطية ولم تظهر عصابة الجين ولم تكتمل العمل على هذه الجين.

بالنسبة للبلاسميدات المؤشبة بجين H4 قمنا بتهضيم عينتين تحتويان على بلاسميدات مؤشبة بهذه الجين وأظهر تفاعل PCR وجود الجين فيها. أظهر ترحيل العينتين في البئرين ١٣ و ١٤، الشكل ٣٢، عصابة الجين بطول ٣٠٣ زوج أساس بالإضافة إلى عصابة البلاسميد الخطية وبالتالي تم اختيار هاتين المستعمرتين لتكثير البلاسميد.

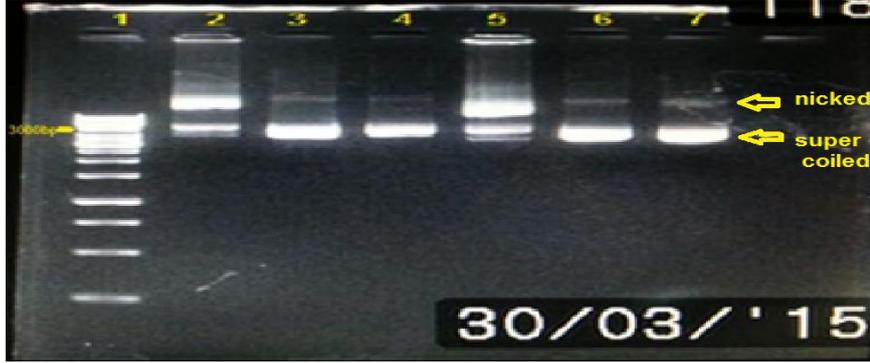


الشكل ٣٢. نمط رحلان البلاسميدات، المهضمة وغير المهضمة، المؤشبة بالجينات والمستخلصة من المستعمرات التي بين تفاعل PCR احتوائها على احد الجينات المدروسة H2A أو H2B أو H4 أو H3. تظهر عصابة البلاسميد المهضم الخطية بحجم ٣٠٠٠ زوج أساس، وعصابات الجينات. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 50Pb. يمثل البئر ٢ بلاسميد غير مهضم مأشوب بجين، ويمثل البئر ٣ بلاسميد مستخلص ومهضم ويفترض احتوائه على جين H2A لكن ظهرت فقط عصابة البلاسميد الخطي ولم تظهر عصابة الجين. ويمثل البئر ٤ و٥ بلاسميد مأشوب بجين H2A ومهضم حيث ظهرت عصابة البلاسميد الخطية وعصابة جين H2A بطول ٣٩٩ زوج أساس. ويمثل البئر ٦ بلاسميد غير مهضم يحوي جين H2B. ويمثل البئر ٧ و٨ بلاسميد مستخلص ومهضم - يفترض احتوائه على جين H2B- لكن ظهرت فقط عصابة البلاسميد الخطي ولم تظهر عصابة الجين. ويمثل البئر ٩ بلاسميد غير مهضم مأشوب بجين H3. ويمثل البئر ١٠ و١١ بلاسميد مستخلص ومهضم ويفترض احتوائه على جين H3 لكن ظهرت فقط عصابة البلاسميد الخطي ولم تظهر عصابة الجين. ويمثل البئر ١٢ بلاسميد غير مهضم يحوي جين H4. يمثل البئر ١٣ و١٤ بلاسميد مأشوب بجين H4 ومهضم حيث ظهرت عصابة البلاسميد الخطية وعصابة جين H4 بطول ٣٠٣ زوج أساس. ويمثل البئر ١٥ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 1 kb .

٦-٤-٤- مقارنة نتائج الاستخلاص اليدوي مع نتائج الاستخلاص بعتيده استخلاص البلاسميد

بعد التأكد من المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميد المأشوب والتأكد من وجود الجين بداخله تم تكثير البلاسميدات ضمن جراثيم E.coli Top 10 بعد زرعها في وسط مرق LB وفق البروتوكول المذكور في فقرة المواد والطرائق بواسطة عتيده GF-1 Plasmid DNA Extraction من شركة vivantis، وقورنت نتائج الاستخلاص بهذه العتيده مع طريقة الاستخلاص اليدوية. أظهر نمط ترحيل البلاسميد المؤشوب المستخلص

بالطريقة اليدوية، الشكل ٣٣، وجود ٣ عصابات للبلازميد: عصابة البلازميد super coiled، عصابة البلازميد linear وعصابة البلازميد nicked. بينما أظهر نمط ترحيل البلازميد المؤشب المستخلص بالعتيدة وجود عصابتين للبلازميد: عصابة البلازميد super coiled وعصابة البلازميد nicked ولم تظهر عصابة linear التي تدل على الشكل الخطي للبلازميد.



الشكل ٣٣ . نمط رحلان البلازميدات المؤشبة المستخلصة يدوياً او بواسطة عتيدة GF-1 Plasmid DNA Extraction من شركة vivantis. يمثل البئر ١ رحلان واسم الأطوال المعيارية DNA ladder 1Kb. يمثل البئر ٢ رحلان البلازميد المستخلص يدوياً والحاوي على جين H2A. يمثل البئر ٣ و٤ رحلان البلازميد المستخلص بالعتيدة والحاوي على جين H2A. يمثل البئر ٥ رحلان البلازميد المستخلص يدوياً والحاوي على جين H4. يمثل البئر ٦ و٧ رحلان البلازميد المستخلص بالعتيدة والحاوي على جين H4.

٥-٦- سلسلة الجينات ضمن البلازميد

بما أننا استطعنا الحصول على بلازميدات مؤشبة بالجينتين H2A و H4 فقط، فقد قمنا بسلسلة هاتين الجينتين ضمن البلازميد المؤشب. تسمح السلسلة، باستخدام المشاريع النوعية العكسية لكل جين والمشرع المباشر للبلازميد PCI، بالتأكد من وجود الجينتين ضمن البلازميد بالشكل الصحيح ضمن منطقة التنسيل المتعدد ومعرفة تسلسلهما في سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا.

٥-٦-١- نتائج سلسلة جين H2A

تم استخدام ناتج تنقية البلازميد المؤشب بجين H2A للسلسلة وتمت السلسلة بطريقة sanger. يبين الشكل ٣٤ (أ) تسلسل الجين الذي حصلنا عليه وتم تسجيل هذا التسلسل في بنك الجينات Gene bank بعد إدخال المعلومات بواسطة برنامج sequin

وأعطي رقم دخول من قبل Gene bank وهو KT956066. وفيما يلي نورد معلومات تسجيل الجين الشكل ٣٤ (ب).

```

1 atggctactc ctgcagcgc caagaaggcc gcccgcaaga ggggctccaa gtccgcgaaa
61 tgtggctcga tttcccggg gggccgcgct ggcgggatga tgcgccgcgg ccagtacgct
121 cgccgcacatc gtgcctctgg cgccgtgtac ctggccgccg tgctggagta cctgacggcg
181 gagctgctgg agctgtccgt gaaggcggcc ggcagagcgc ggaagaagcg gtgccgcctg
241 aaccgcgcga ccgtgatgct ggccgcgcgc caccagcagc acatcgccat gttctgaag
301 aacgtgacct tgtctcacag cggcgttggt cggagcgtca gcaaggcggg ggcaaagaag
361 aaggcggcca agaagggcaa ggcgacaccg agcgcgtaa

```

أ

LOCUS L._tropica, H2A 399 bp mRNA linear 19-SEP-2015
DEFINITION Leishmania Tropica (LCEB-Syrian strain 01), putative histone H2A, mRNA, complete cds.
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS
SOURCE .
ORGANISM Leishmania tropica
Leishmania tropica
Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae;
Leishmaniinae; Leishmania.
REFERENCE
AUTHORS Alhabash, M. and Maarouf, M.
TITLE L. tropica, H2A GENE
JOURNAL Unpublished
KEYWORDS
REFERENCE
AUTHORS Alhabash, M. and Maarouf, M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-SEP-2015) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Leishmaniasis Center for Epidemiological and Biological Studies -Damascus University, Mazzeh, Damascus, Syria
FEATURES
source
1..399
/organism="Leishmania tropica"
/mol_type="mRNA"
CDS
1..399
/codon_start=1
/product="putative histone H2A"
/translation="MATPRSAKKAARKSGSKSAKCLIFPVGRVGGMMRRGQYARRIG
ASGAVYLAADVLELYTAELELSVKAAAQSGKKRCLNPRVTVMLAARHDDDDIGMLLKNV
TLSHSGVVPSVSKAVAKKGGKGGKATPSA"
BASE COUNT 74 a 124 c 145 g 56 t
ORIGIN
1 atggctactc ctgcagcgc caagaaggcc gcccgcaaga ggggctccaa gtccgcgaaa
61 tgtggctcga tttcccggg gggccgcgct ggcgggatga tgcgccgcgg ccagtacgct
121 cgccgcacatc gtgcctctgg cgccgtgtac ctggccgccg tgctggagta cctgacggcg
181 gagctgctgg agctgtccgt gaaggcggcc ggcagagcgc ggaagaagcg gtgccgcctg
241 aaccgcgcga ccgtgatgct ggccgcgcgc caccagcagc acatcgccat gttctgaag
301 aacgtgacct tgtctcacag cggcgttggt cggagcgtca gcaaggcggg ggcaaagaag
361 aaggcggcca agaagggcaa ggcgacaccg agcgcgtaa
//

ب

الشكل ٣٤. (أ) تسلسل جين H2A لدى سلالة الليشمانية المدارية (L.tropica, H2A).

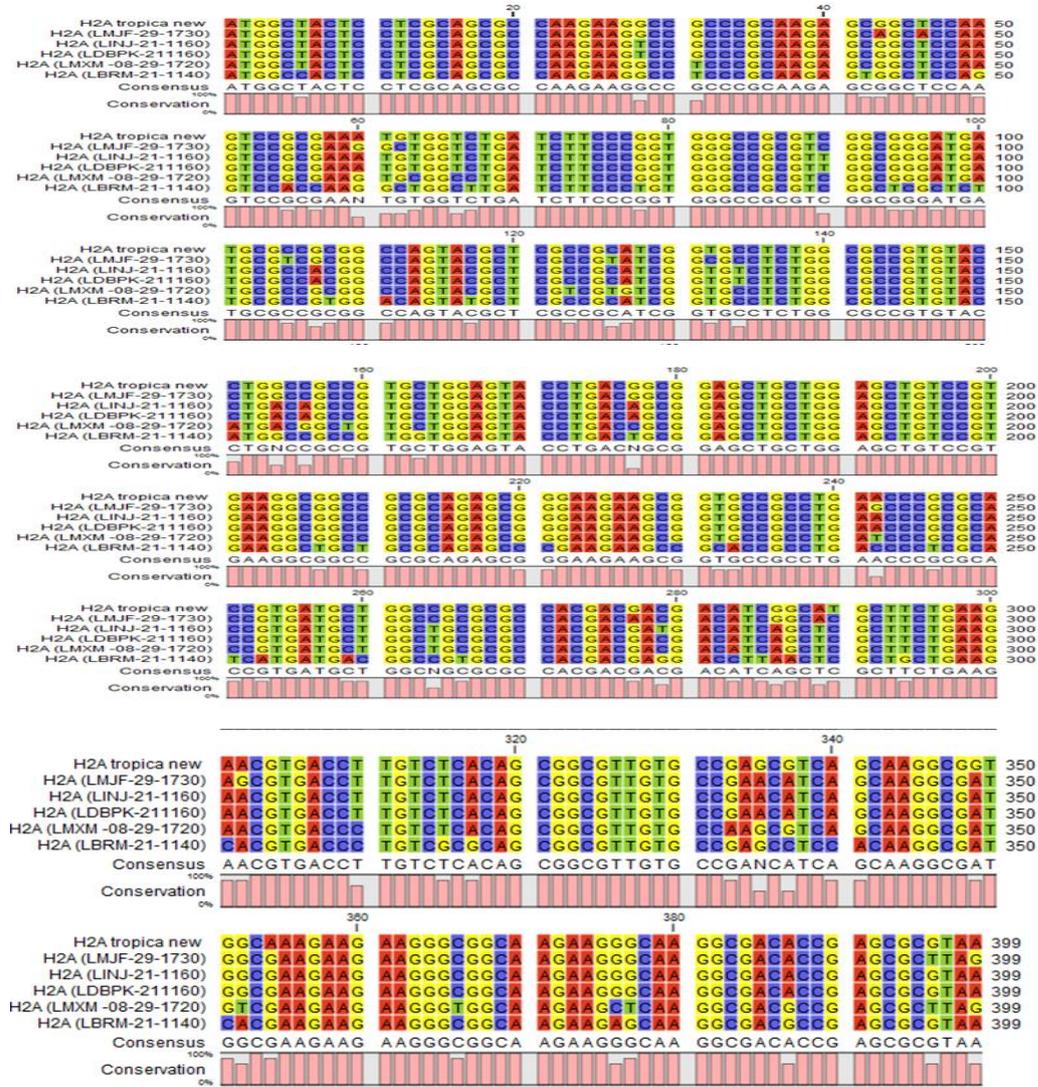
(ب) صورة عن معلومات تسجيل تسلسل الجين "L.tropica, H2A" في Gene bank.

أ- مقارنة تسلسل الدنا المتمم لجين H2A لدى سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا مع تسلسلاتها في أنواع الليشمانية الأخرى

يظهر تسلسل الدنا المتمم لجين "L.tropica, H2A" في سلالة الليشمانية المدارية

المستخدمة في دراستنا درجة كبيرة من التطابق، تراوحت نسبة التطابق بين ٩٣-

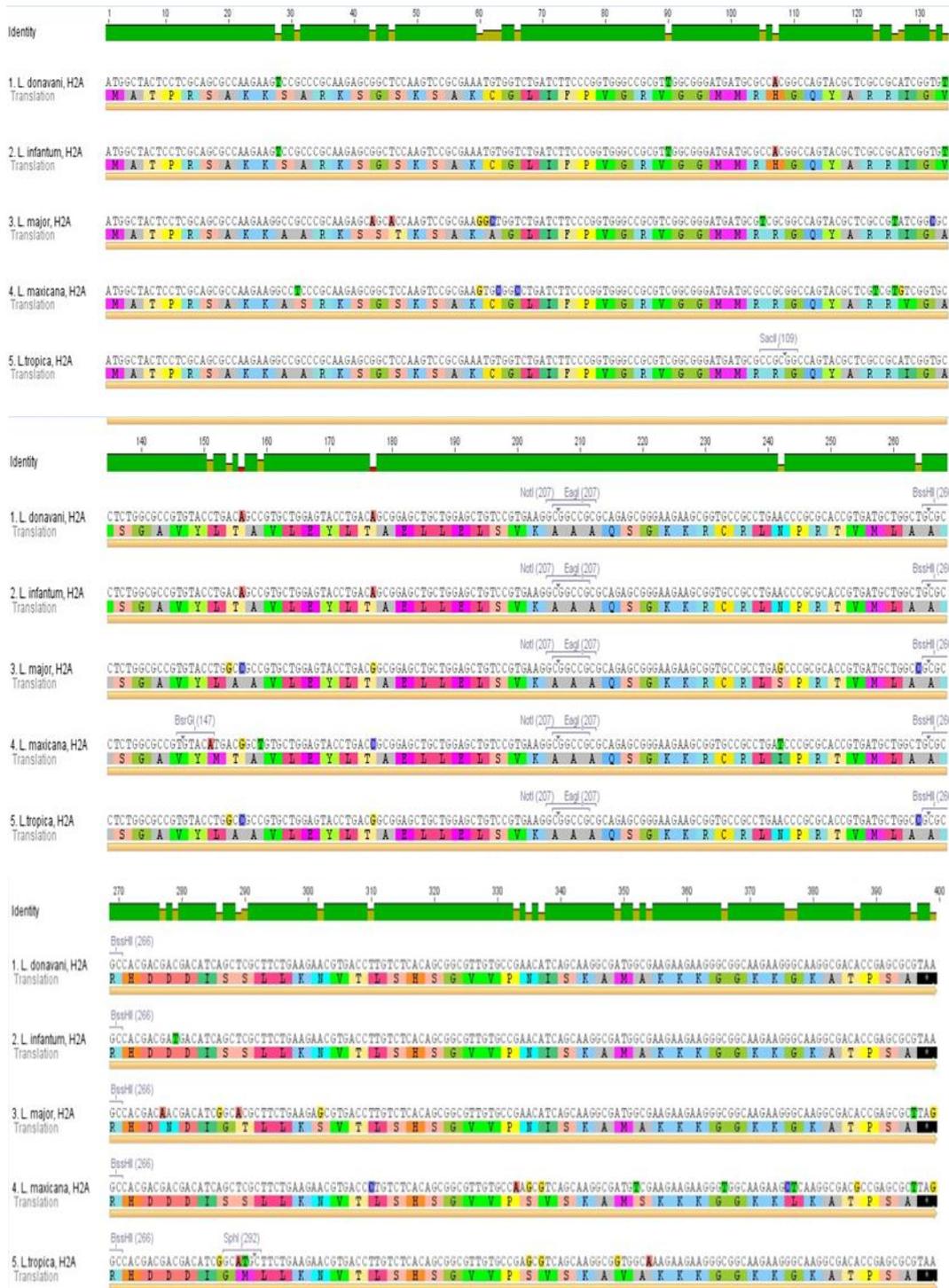
٩٦,٢%، مع تسلسل الجين لدى الأنواع الأخرى من الليشمانية مثل الليشمانية الطفلية والكبيرة والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية. ويظهر الشكل ٣٥ مدى تطابق تسلسل الجين CLC MAIN مع تسلسله في الأنواع الأخرى من الليشمانية وذلك باستخدام برنامج .work bench



الشكل ٣٥. ترصيف تسلسل الدنا المتمم لجين H2A لدى سلالتنا "L.tropica, H2A" والليشمانية الكبيرة، والطفلية، والدونوفانية، والمكسيكية، والبرازيلية.

ب- مقارنة تسلسل الحموض الأمينية لهيستون H2A المشفر من جين " L.tropica, H2A" مع أنواع الليشمانية الأخرى.

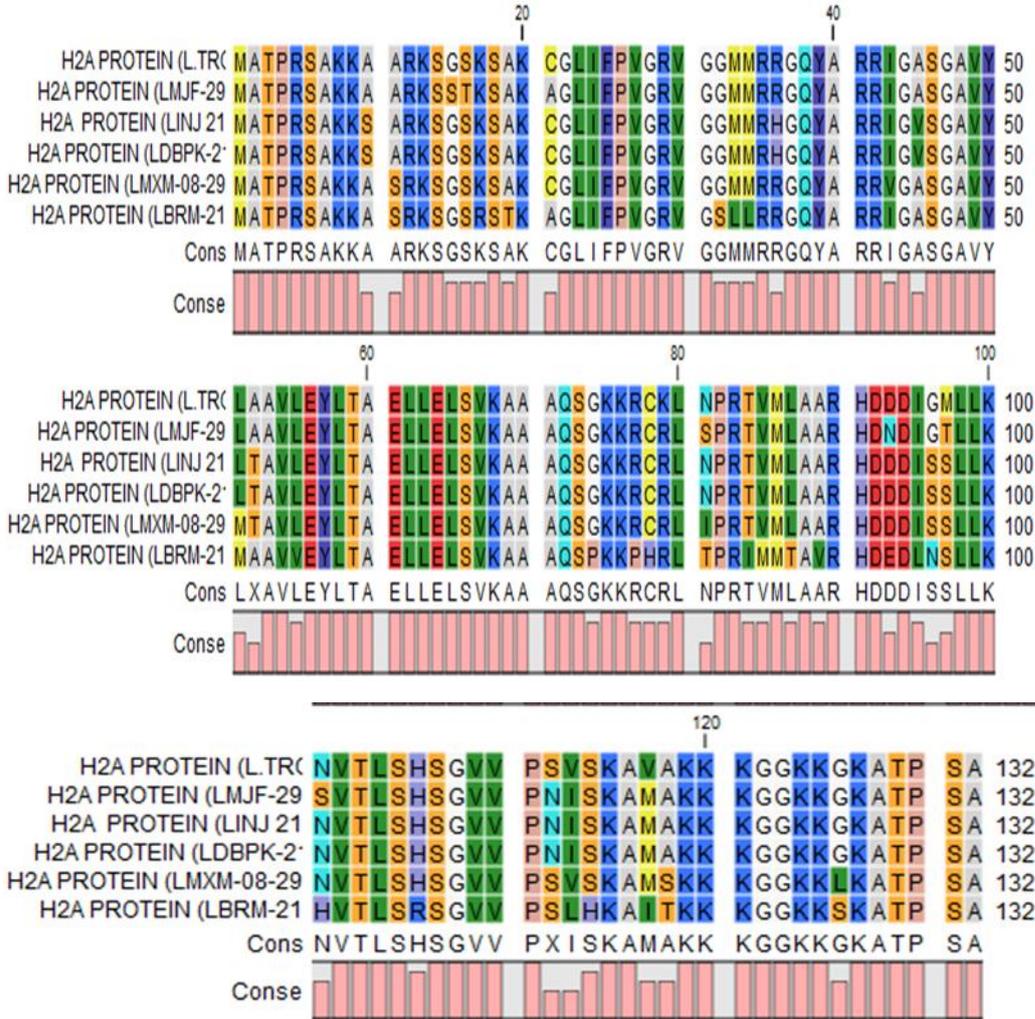
تمت دراسة التطابق باستخدام برنامج VECTOR NTI EXPRESS الذي يظهر تسلسل الدنا المتمم للجين مع تسلسل الحموض الأمينية للبروتين الذي تشفره وتطابقها، الشكل ٣٦.



الشكل ٣٦. تطابق كل من تسلسل الدنا المتمم للجين H2A وتسلسل الحموض الأمينية للبروتين الذي يشفره لدى كل من الليشمانية المدارية، والكبيرة، والطفلية، والدونوفانية، والميكسكية، والبرازيلية.

كما تمت دراسة التطابق باستخدام برنامج CLC Main work bench الذي يظهر تسلسل الحموض الأمينية للبروتين الذي يشفره الجين ومدى تطابقه بين أنواع الليشمانية.

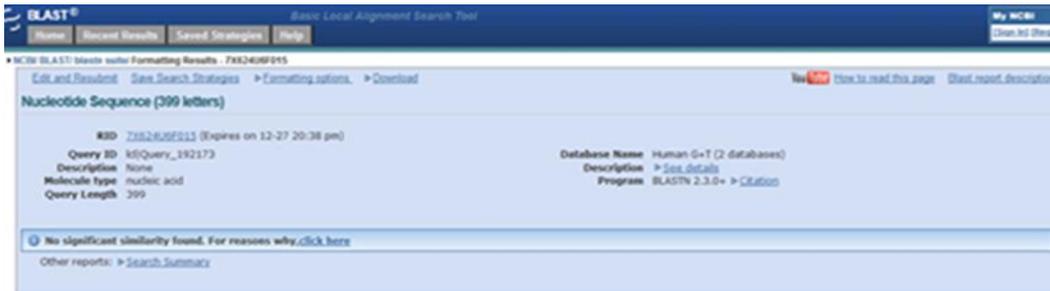
يظهر تسلسل الهيستون H2A المشفر من جين سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا "L.tropica, H2A" درجة كبيرة من التطابق مع تسلسل الهيستون H2A لدى كل من الليشمانية الكبيرة والطفلية والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية. بلغت نسبة تطابق الهيستون H2A المشفر من جين "L.tropica, H2A" مع نظيره في الليشمانية الكبيرة ٩١.٧%، ومع نظيره في الليشمانية الطفلية ٩٢.٤%، ومع نظيره في الليشمانية الدونوفانية ٩٢.٤%، ومع نظيره في الليشمانية المكسيكية ٩١.٧%، ومع نظيره في الليشمانية البرازيلية ٧٨%.



الشكل ٣٧. تطابق تسلسل البروتين H2A عند كل من الليشمانية المدارية، والكبيرة، والطفلية، والدونوفانية، والمكسيكية والبرازيلية.

ج- نسبة تطابق تسلسل جين H2A الناتج عن السلسلة مع الجينوم البشري

تهدف هذه الخطوة إلى تحري مدى تطابق تسلسل الجين "L.tropica, H2A" مع تسلسل الجينوم البشري، تم تحري هذا التطابق باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi.



الشكل ٣٨. عدم تطابق تسلسل الجين "L.tropica, H2A" مع تسلسل الجينوم البشري، باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi.

يسمح لنا عدم وجود التطابق، أو درجة منخفضة منه، بتجنب حدوث رد فعل مناعي تجاه الجينوم البشري عند التلقيح. بينت نتائجنا، الشكل ٣٨، عدم وجود تطابق ذي دلالة احصائية مع الجينوم البشري، مما يسمح لنا باستمرار العمل على هذا الجين وتصميم لقاح DNA يحوي هذا الجين.

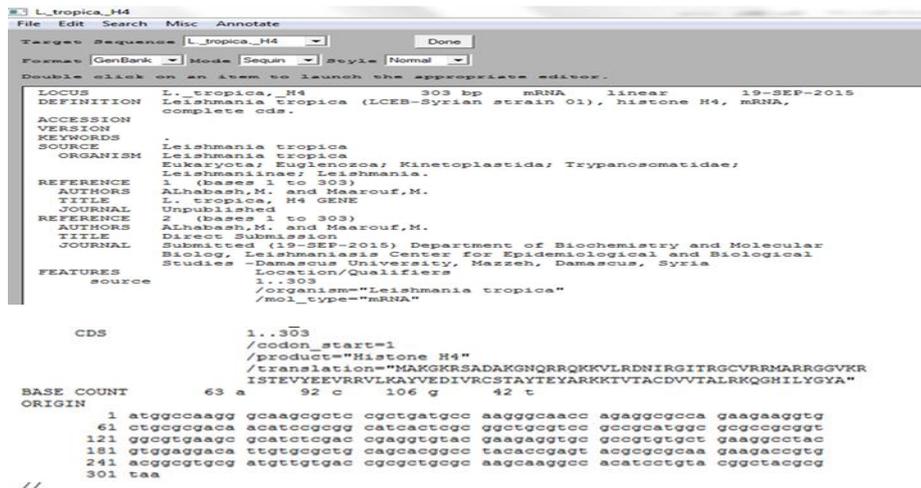
٦-٥-٢- نتائج سلسلة جين H4

```

1 atggccaagg gcaagcgctc cgctgatgcc aagggcaacc agaggcgcca gaagaaggtg
61 ctgctcgaca acatccggcg catcactcgc ggctgcgtcc gccgcatggc gcgccggcgt
121 ggcgtgaagc gcactctcgc cgaggtgtac gaagaggtgc gccgctgtgt gaaggcctac
181 gtggaggaca ttgtgcgctg cagcaaggcc tacaccgagt acgctgctca gaagaccgtg
241 acggcgtgcg atgttgtgac cgcgctgccc aagcaaggcc acatcctgta cggctacgcg
301 taa

```

أ



ب

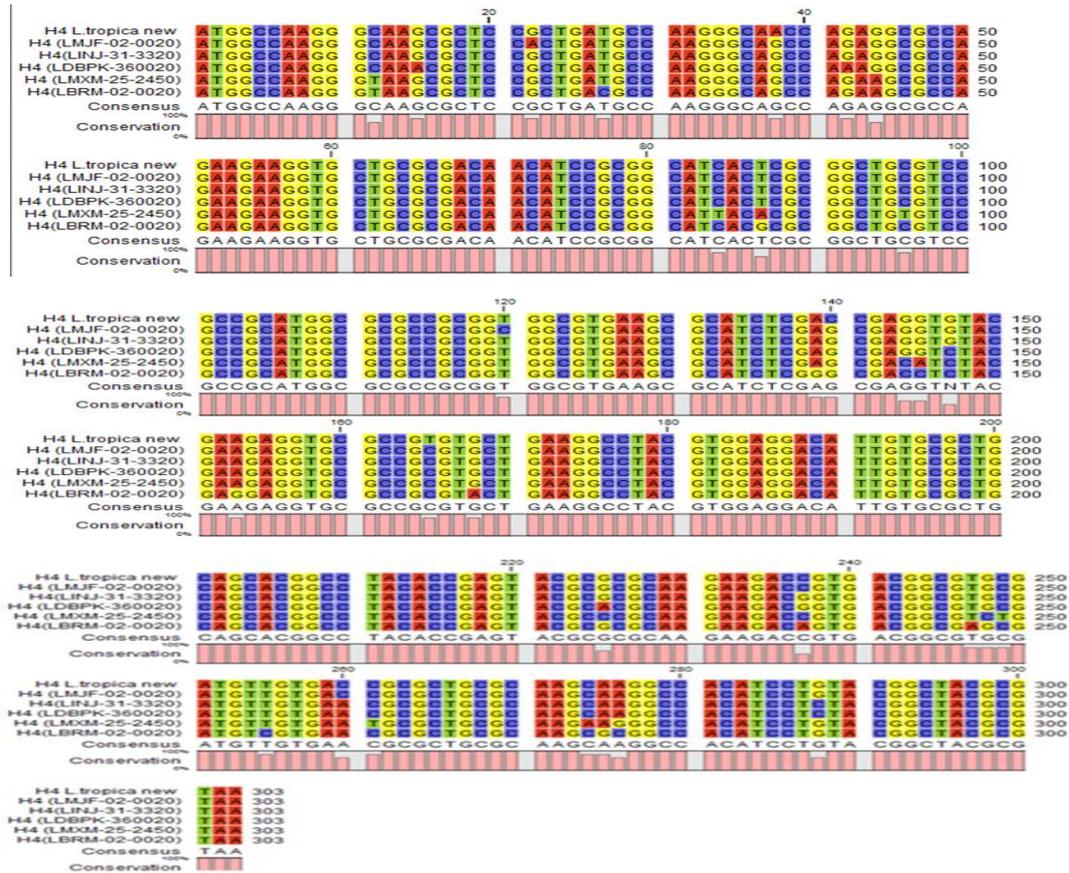
الشكل ٣٩. (أ) تسلسل جين H4 tropica الناتج عن تفاعل السلسلة.

(ب) معلومات تسجيل تسلسل الجين في Gene bank .

تم إرسال ناتج تنقية البلاسميد المؤشب بجين H4 للسلسلة وتمت السلسلة بطريقة sanger وحصلنا على تسلسل الجين الشكل ٣٩ (أ)، وتم تسجيل هذا التسلسل في Gene bank بعد إدخال المعلومات بواسطة برنامج sequin وأعطى رقم دخول من قبل Gene bank وهو KT956067 الشكل ٣٩ (ب).

أ- مقارنة تسلسل الدنا المتمم لجين H4 لدى سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا مع تسلسلاتها في أنواع الليشمانية الأخرى

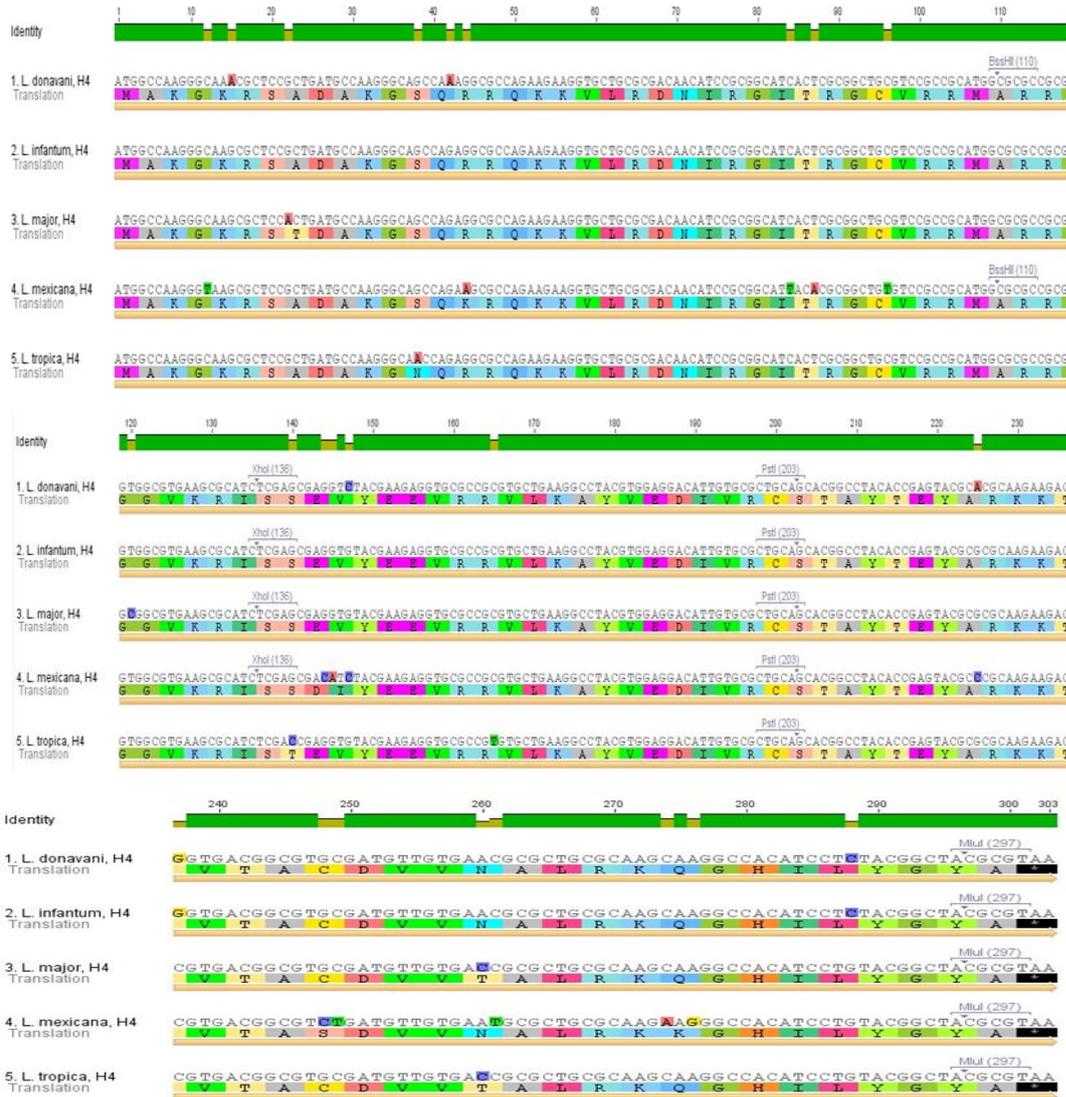
يظهر تسلسل الدنا المتمم لجين H4 في سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا تطابق هذا التسلسل مع تسلسل الجين لدى السلالات والأنواع الأخرى من الليشمانية الطفلية والكبيرة والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية. وتراوحت نسبة التطابق بين ٩٤,١% و ٩٨,٣% كما في الشكل ٤٠. أجري التطابق باستخدام برنامج CLC MAIN work bench.



الشكل ٤٠. تطابق تسلسل الدنا المتمم لجين H4 في دراستنا عند الليشمانية المدارية مع تسلسل الدنا المتمم لهذا الجين عند باقي أنواع الليشمانية الكبيرة، الطفلية، الدونوفانية، المكسيكية والبرازيلية.

ب- مقارنة تسلسل الحموض الأمينية للهيستون H4 لدى سلالتنا مع أنواع الليشمانية الأخرى

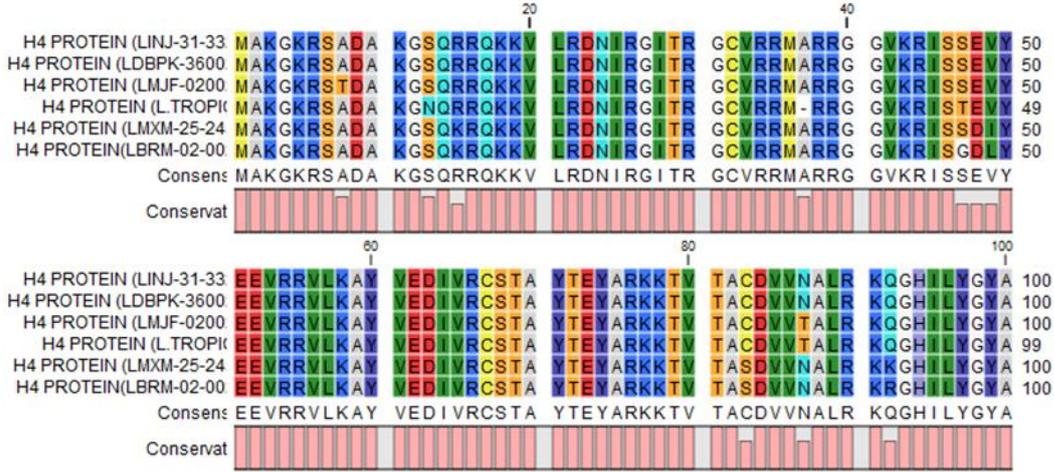
يظهر تسلسل الهيستون H4 في سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا تطابق هذه التسلسل مع تسلسل الهيستون H4 لدى السلالات والأنواع الأخرى من الليشمانية الكبيرة والطفلية والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية.



الشكل ٤١. تطابق تسلسل الجين H4 في سلالة الليشمانية المدارية التي أجرينا البحث عليها مع تسلسل الجين ضمن أنواع الليشمانية الأخرى الكبيرة، الطفلية، الدونوفانية، المكسيكية والبرازيلية وتطابق تسلسل البروتين المشفر من قبل هذا الجين مع البروتينات المشفرة من قبل باقي الأنواع.

بلغت نسبة تطابق H4 المستخدم في دراستنا مع نظيره في الليشمانية الكبيرة ٩٦% ومع نظيره في الليشمانية الطفلية ٩٦% ومع نظيره في الليشمانية الدونوفانية ٩٦%

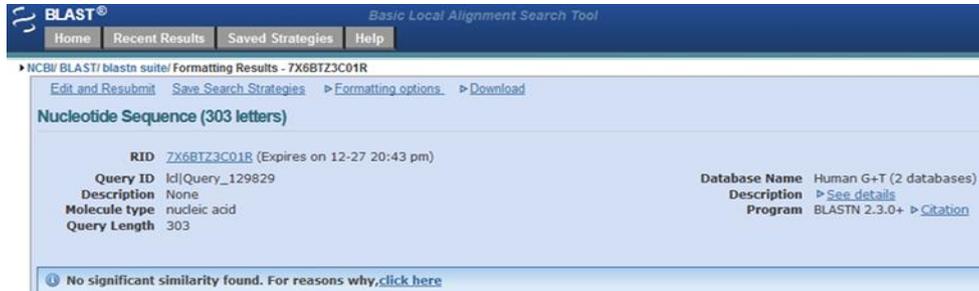
ومع نظيره في الليشمانية المكسيكية ٩١% ومع نظيره في الليشمانية البرازيلية ٩١%. أجري التطابق باستخدام برنامج VECTOR NTI EXPRESS كما في الشكل ٤١، وباستخدام CLC MAINWORK BENCH كما في الشكل ٤٢.



الشكل ٤٢. تطابق تسلسل البروتين H4 مع تسلسلاته في الليشمانية الكبيرة، الطفلية، الدونوفانية، المكسيكية والبرازيلية.

ج- نسبة تطابق تسلسل جين H4 الناتجة عن السلسلة مع الجينوم البشري

تهدف هذه الخطوة إلى تحري مدى تطابق تسلسل جين H4 الناتج عن السلسلة مع الجينوم البشري واستمرار العمل عليها في حال عدم وجود التطابق ونضمن بذلك عدم تشكل أي رد فعل مناعي تجاه الجينوم البشري عند التلقيح. تم تحري هذا التطابق باستخدام تطبيق Blast على موقع ncbi، وتبين عدم وجود أي تطابق مع الجينوم البشري كما في الشكل ٤٣ مما يسمح لنا باستمرار العمل على هذا الجين وتصميم لقاح DNA يحوي هذه الجين.



الشكل ٤٣. عدم تطابق جين H4 عند الليشمانية المدارية مع الجينوم البشري. حيث يظهر عدم وجود تطابق بين تسلسل جين H4 عند الليشمانية المدارية و تسلسل الجينوم البشري بعد إجراء تطبيق Blast على موقع ncbi.

المناقشة Discussion

تشكل لقاحات الدنا أحد الخيارات المهمة في استراتيجية البحث عن لقاح فعال ضد داء الليشمانيات. تمتاز هذه اللقاحات بقدرتها على تفعيل استجابة خلوية من نمط Th1 تساهم بشكل أساسي في شفاء العدوى بطفيليات الليشمانية (166) (157) (167). في الحقيقة يعتبر داء الليشمانيات وخاصة الجلدي داءً مستوطناً في سورية ومنطقة الشرق الأوسط منذ فترة طويلة وكان يسمى بحبة حلب وتسميات أخرى شملت حبة بغداد وغيرها. تعود معظم الإصابات في سورية لطفيليات الليشمانية المدارية بشكل رئيسي بينما يعود الباقي للإصابة بطفيليات الليشمانية الكبيرة. ترافقت الأزمة التي تعاني منها سورية مع تخريب في البنى التحتية مما أدى إلى زيادة انتشار العديد من العدوى الميكروبية وخاصة داء الليشمانيات (168). يعاني القيمون على مكافحة داء الليشمانيات من عدم وجود دواء نوعي آمن وفعال وعدم وجود لقاح فعال حتى الآن (169)، وبالتالي يشكل البحث عن لقاح فعال هدفاً هاماً للباحثين بشكل عام والسوريين منهم بشكل خاص. يشكل اللقاح الجيني خياراً جيداً لكنه يتطلب توفر معلومات مفصلة عن الجينات الهامة للطفيليات المنتشرة في سورية، بشكل خاص الليشمانية المدارية، ودورها الوظيفي. يعود اختيار الجينات التي يمكن استخدامها في اللقاح الجيني إلى أهميتها وقدرتها الاستمناعية وقدرتها على تحريض وقاية طويلة الأمد تجاه العدوى بطفيليات الليشمانية ووجودها لدى المشيقات والليشمانيات معاً. في الحقيقة سمح استخدام جينات الهيستونات بالوقاية من الإصابة بالعديد من طفيليات الليشمانية كالليشمانية الكبيرة والطفلية (166) (167) (160)، حيث أظهر التمنيع بلقاح دنا يشفر لهيستونات الليشمانية الطفلية الأربعة معاً قدرة عالية على توليد استجابة خلوية نوعية من نمط Th1 تجاه الإصابة بالليشمانية الجلدية وقدرة اتقائية دائمة تجاه الإصابة بالليشمانية الجلدية عند فئران BALB/c. أظهر اختبار التحدي بالليشمانية الكبرى للفئران الممنعة بلقاح دنا يشفر لهيستونات الليشمانية الطفلية الأربعة معاً، مقارنة مع المجموعة الشاهدة، حدوث انتفاخ ضئيل جداً في القدم خلال طور الإخماج، وانخفاضاً ذا دلالة احصائية في الحمل الطفيلي في العقد اللمفية النازحة إلى أن اختفت الطفيليات من الطحال بعد الأسبوع السابع، وارتفاعاً ذا دلالة احصائية في نسبة الخلايا التائية المنتجة للانترفيون غاما IF γ في العقد اللمفية النازحة، وانخفاضاً ذا دلالة احصائية بنسبة الخلايا التائية المنتجة للانترلوكين

٤ في العقد اللففية النازحة(١٦٦)، مما لفت انتباهنا لهذه الجينات وإمكانية استخدامها في الوقاية من طفيليات الليشمانية المدارية.

يتطلب استخدام جينات الهيستونات كلقاح دنا توافر معلومات عن وجود هذه الجينات لدى الليشمانية المدارية ودورها الوظيفي ولكن للأسف لم يتم حتى الآن نشر تسلسل جينوم الليشمانية المدارية بشكل كامل ولا توجد أي دراسة تشير إلى وجود جينات هذه الهيستونات في جينوم الليشمانية المدارية. بالتالي كان لا بد من القيام بدراسة منهجية لجينات هيستونات اللب النووي تعتمد أولاً على اثبات وجود هذه الجينات ضمن الجينوم الليشمانية المدارية لنتمكن من استخدامها لاحقاً في تصميم اللقاح المطلوب.

يتطلب اثبات وجود هذه الجينات استخدام مشاريع نوعية تسمح بتضخيمها بواسطة تفاعل PCR. قمنا بتصميم المشاريع بعد مقارنة تطابق تسلسلات الجينات لدى الأنواع الأخرى من الليشمانية. تطلب ما سبق إجراء دراسة حاسوبية لتسلسلات هذه الجينات عند الأنواع المختلفة من الليشمانية التي نشرت تسلسلات هذه الجينات لديها كالليشمانية الكبيرة، والدونوفانية، والطفلية، والبرازيلية، والمكسيكية. سمحت الدراسة الحاسوبية بمعرفة مدى التطابق بين تسلسلات الجين في هذه الأنواع، ومدى التطابق بين هذه التسلسلات والجينوم البشري، وتصميم المشاريع النوعية لتضخيم الجينات وبالتالي تمكنا من تصميم المشاريع لتضخيم هذه الجينات. بعد تصميم المشاريع كان لا بد من اختيار الشروط المثلى لتفاعل التضخيم التسلسلي فقمنا بإجراء تفاعل حراري متدرج لاختيار درجة الالتحام المثلى، وتمكنا من اختيار درجة الالتحام الملائمة للمشاريع المصممة لكل جين حيث بلغت درجة حرارة الالتحام المثلى لجين H2A 61,6 °م ولجين H2B 61 °م ولجين H3 58 °م ولجين H4 62 °م. ولم نتمكن من مقارنة شروط تفاعلنا مع باقي الدراسات المتعلقة بهذه الجينات نظراً لعدم نشر شروط تفاعل PCR في هذه الدراسات (١٦٦) (١٦٠). سمحت أمثلة شروط تفاعل PCR بالحصول على تضخيم مثالي للجينات مما اثبت نوعية المشاريع المصممة من قبلنا. حيث سمح ترحيل نواتج تضخيم الجينات بالحكم على نوعية هذه المشاريع نتيجة لوجود عصابة واحدة تمثل فقط الجين المطلوب تضخيمه حيث بلغ حجمه ٣٩٩ زوج أساس بالنسبة لجين H2A و٣٣٦ زوج أساس بالنسبة لجين H2B و٣٩٣ زوج أساس بالنسبة لجين H3 و٣٠٣ زوج أساس لجين H4 زوج أساس وتطابق حجم هذه

الجينات لدى الليشمانية المدارية مع نظائرها لدى باقي أنواع الليشمانية. وبهذا نكون قد أثبتنا وجود هذه الجينات في جينوم الليشمانية المدارية.

ولكن يبقى السؤال هل يتم التعبير عن الجينات السابقة أم لا. لتحقيق ذلك قمنا بعزل الرنا من طفيليات الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا وقمنا بتحويله إلى الدنا المتمم cDNA ومن ثم إجراء تفاعل PCR باستخدام الدنا المتمم كمرصاف وباستخدام المشارع النوعية لكل جين والتي صممناها وذكرت سابقاً. وكذلك الأمر بين رحلان نواتج تفاعل PCR السابق وجود عصابة واحدة لكل جين يمتلك نفس حجم الجين التي حصلنا عليه على مستوى الدنا. تطابق حجم هذه الجينات عند الليشمانية المدارية مع حجمها لدى الأنواع الأخرى من الليشمانية. وهكذا نكون قد أثبتنا حدوث الانتساخ الذي يشكل المرحلة الأولى من مراحل التعبير الجيني.

قمنا بعد ذلك بتصميم لقاح دنا مكون من عدة بلاسميدات يحوي كل منها على إحدى جينات الهيستونات بغية تقييم القدرة الاستمناعية لهذا اللقاح ضد الإصابة بالليشمانية المدارية فيما بعد وهو أمر قيد التطبيق. تسمح سلسلة الجين ضمن البلاسميد من التأكد من دخول الجين بطريقة صحيحة ضمن البلاسميد وبالتالي قمنا بسلسلة جيني H2A و H4 ويجري العمل على سلسلة جيني H2B و H3. قمنا بنشر تسلسل جين H2A وتسجيله ضمن بنك الجينات Gene Bank برقم دخول KT956066. حيث بلغ طول الجين ٣٩٩ زوج أساس وتطابق ذلك مع طول الجين ببقية أنواع الليشمانية.

تطابق تسلسل الدنا المتمم لجين "**L.tropica, H2A**" في سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا بدرجة كبيرة مع تسلسل الجين لدى الأنواع الأخرى من الليشمانية مثل الليشمانية الطفلية والكبيرة والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية. بلغت نسبة التطابق ٩٦% مع نظيره في الليشمانية الطفلية و٩٥% مع نظيره في الليشمانية الكبيرة و٩٦,٢% مع نظيره في الليشمانية الدونوفانية و٩٣% مع نظيره في الليشمانية المكسيكية.

تمت دراسة التطابق بين الحموض الأمينية المشفرة من قبل جين H2A المستخدم في دراستنا وتسلسلات الحموض الأمينية المشفرة من قبل نظائره في باقي أنواع الليشمانية حيث أظهر تسلسل الهيستون H2A المشفر من جين سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا "**L.tropica, H2A**" درجة كبيرة من التطابق مع تسلسل الهيستون H2A

لدى كل من الليشمانية الكبيرة والطفلية والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية. بلغت نسبة تطابق الهيستون H2A المشفر من جين "L.tropica, H2A" مع نظيره في الليشمانية الكبيرة ٩١.٧%، ومع نظيره في الليشمانية الطفلية ٩٢.٤%، ومع نظيره في الليشمانية الدونوفانية ٩٢.٤%، ومع نظيره في الليشمانية المكسيكية ٩١.٧%، ومع نظيره في الليشمانية البرازيلية ٧٨%.

وكذلك الأمر تمكنا من سلسلة جين H4 وتسجيله ضمن بنك الجينات Gene Bank برقم دخول KT956067. بلغ طول الجين ٣٠٣ زوج أساس وتطابق ذلك مع طول الجين ببقية أنواع الليشمانية. تطابق تسلسل الدنا المتمم لجين "L.tropica, H4" في سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا بدرجة كبيرة مع تسلسل الجين لدى الأنواع الأخرى من الليشمانية مثل الليشمانية الطفلية والكبيرة والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية. بلغت نسبة التطابق ٩٨% مع نظيره في الليشمانية الطفلية و٩٨,٣% مع نظيره في الليشمانية الكبيرة و٩٦,٧% مع نظيره في الليشمانية الدونوفانية و٩٤,١% مع نظيره في الليشمانية المكسيكية.

تمت دراسة التطابق بين الحموض الأمينية المشفرة من قبل جين H4 المستخدم في دراستنا وتسلسلات الحموض الأمينية المشفرة من قبل نظائره في باقي أنواع الليشمانية حيث أظهر تسلسل الهيستون H4 المشفر من جين سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا "L.tropica, H4" درجة كبيرة من التطابق مع تسلسل الهيستون H4 لدى كل من الليشمانية الكبيرة والطفلية والدونوفانية والمكسيكية والبرازيلية. بلغت نسبة تطابق الهيستون H4 المشفر من جين "L.tropica, H4" مع نظيره في الليشمانية الكبيرة ٩٦%، ومع نظيره في الليشمانية الطفلية ٩٦%، ومع نظيره في الليشمانية الدونوفانية ٩٦%، ومع نظيره في الليشمانية المكسيكية ٩١%، ومع نظيره في الليشمانية البرازيلية ٩١%.

الاستنتاجات Conclusion

- ١- اثبات وجود جينات هيستونات اللب النووي H2A و H2b و H3 و H4 عند سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا.
- ٢- اثبات حدوث الانتساح لهذه الجينات في الرنا المستخلص من سلالة الليشمانية المدارية.
- ٣- سلسلة جيني H2A و H4 عند الليشمانية المدارية وادخالهما في بنك الجينات.

المقترحات والتوصيات Suggestions and Recommendations

- ١- سلسلة جيني H2B و H3.
- ٢- تقييم القدرة الاستمناعية والاتقائية لهذه الجينات عند فئران التجربة BALB\C.
- ٣- تحري البروتينات المشفرة من قبل هذه الجينات.

المخلص Abstract

يعد داء الليشمانيات الجلدي الذي تسببه الليشمانية المدارية أحد المشاكل الصحية الهامة في سورية والتي تفاقمت بعد الأحداث الأخيرة. تشكل الوقاية من هذا الداء هدفاً أساسياً لمكافحة انتشار العدوى في سورية، وتشكل اللقاحات الجينية أملاً واعداً في هذا المجال.

تعتبر جينات هيستونات اللب النووي H2A و H2B و H3 و H4 من أهم الجينات المستهدفة في أبحاث تصميم لقاح دنا تجاه الليشمانية نظراً لدورها الهام في حياة الطفيلي ولكونها من المستمنعات الهامة خلال طور العدوى.

بناءً على ذلك ونظراً لعدم وجود أي تسلسل منشور لهذه الجينات في الليشمانية المدارية، قمنا بدراسة منهجية هدفت إلى تحري وجود جينات هيستونات اللب النووي في سلالة سورية لليشمانية المدارية وتحري التعبير عنها لدى هذه الطفيليات وتصميم لقاحات يحوي كل منها دنا أحد الجينات الأربعة السابقة. وقمنا بتقييم القدرة الاستمناعية والاتقائية للقاحات السابقة تجاه العدوى بالليشمانية المدارية.

تطلب ذلك عزل الدنا والرنا من مشيقات طفيليات الليشمانية المدارية، واصطناع الدنا المتمم، وتصميم المشاريع النوعية الملائمة لتضخيم الجينات، وأمثلة شروط تفاعل التضخيم التسلسلي للبوليميراز، وتنسيل كل جين على حدى ضمن بلاسميد PCI ، وإجراء تفاعل السلسلة لهذه الجينات .

تم إثبات وجود هذه الجينات عند مشيقات سلالة الليشمانية المدارية المستخدمة في دراستنا وبلغ طولها ٣٩٩ و ٣٣٦ و ٣٩٣ و ٣٠٣ زوج أساس لجينات H2A و H2B و H3 و H4 على التوالي. كما أثبت حدوث التعبير عنها لدى هذه الطفيليات وتمت سلسلة جيني H2A و H4 وإدخالهما في بنك الجينات ويجري العمل حالياً على سلسلة جيني H2B و H3 وتقييم القدرة الاستمناعية والاتقائية لهذه الجينات لدى فئران BALB\c تجاه العدوى بالليشمانية المدارية.

الكلمات المفتاح: الليشمانية المدارية، جين H2A، جين H2B، جين H3، جين H4، سورية.

Abstract

Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* is one of the most important health issues in Syria which exacerbated after what happening in Syria. Prevention from Leishmaniasis is very important to prevent the high prevalence of infection in Syria. DNA vaccine is a promising hope in this field. Genes of nucleosomal core histones are considered as one of the most important genes in DNA vaccine researches against *Leishmania* because of their important role in the parasite life and their immunogenicity during the course of infection. As there is no published sequence for these genes in *L.tropica*, this study aimed to investigate the existence of nucleosomal core histones genes in our strain and their expression in these parasites. In addition four PCI plasmids have been prepared with the different four genes to sequence these genes and evaluate their immunogenicity and prophylactic value against infection with *L.tropica*.

DNA and RNA have been isolated from the promastigotes of *L.tropica* parasites, synthesized cDNA, design the specific primers for gene`s amplification, standardized of PCR conditions, cloned these genes separately to PCI plasmid and sequenced them.

These genes have been proved in *L. tropica* promastigotes. Their sizes were 399, 336, 393 and 303 bp Consecutively for H2A, H2B, H3 and H4 genes. Expression was also proved in these parasites. H2A and H4 have been

sequenced and submitted to Gene bank. Work is still continuing on sequencing H2B and H3 genes and evaluating the immunogenicity and prophylactic value of the four genes in Balb/c mice against the infection with *L.tropica*.

Key words: Leishmania tropica, H2A gene, H2B gene, H3 gene, H4 gene, Syria.

References قائمة المراجع

1. Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasser K, et al. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. *Vaccine*. 2008;26(52):6759–67.
2. Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunol*. Australasian Society for Immunology Inc.; 2014 Mar 14;3(3):e13.
3. Prevention C-C for DC and. CDC - Leishmaniasis - Epidemiology & Risk Factors [Internet]. [cited 2016 Jan 29]; Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>
4. Mutiso JM. Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. *J Biomed Res*. 2013;27(2):85–102.
5. Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in Leishmania. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1063–75.
6. KELLINA OI. [On the dimensions of the leishmanial forms of Leishmania tropica major and Leishmania tropica minor]. *Med Parazitol (Mosk)*. 2016;31:716–8.
7. Leishmania.org(it) – 3. Etiologia [Internet]. [cited 2016 Jan 22]. Available from: http://www.leishmania.it/?page_id=6
8. CDC - DPDx - Leishmaniasis - Images [Internet]. [cited 2016 Jan 30]. Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/gallery.html#amasti2>
9. Gupta S. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res*. 2011;133:27–39.

10. CDC - DPDx - Leishmaniasis - Images [Internet]. [cited 2016 Jan 22]. Available from:
<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/gallery.html>
11. Taxonomy of Leishmania species [Internet]. [cited 2016 Jan 22]. Available from: <https://www.msu.edu/course/zol/316/lspptax.htm>
12. Control of the Leishmaniases - WHO - OMS - [Internet]. [cited 2016 Jan 22]. Available from:
<http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=10&codcch=949>
13. WHO_TRS_701.pdf [Internet]. [cited 2016 Jan 22]. Available from:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38742/1/WHO_TRS_701.pdf
14. Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2000;14(2):109–22.
15. Morsy TA, Abou el-Ela RG, Rifaat MM, al Dakhil MA. The seasonal and daily activities of *Phlebotomus papatasi* in Riyadh, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol*. 1995;25(3):699–711.
16. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27(2):123–47.
17. Prevention C-C for DC and. CDC - Leishmaniasis. [cited 2016 Jan 29]; Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>
18. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. Elsevier; 2006 Sep 1;22(9):439–45.

19. Oms CDE. The Leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. 1984.
20. Garnier T, Croft SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs* [Internet]. 2002 Apr;3(4):538–44.
21. Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2016;17(3):257–60.
22. WHO | World Health Organization publishes an updated edition of the Technical Report Series on control of the leishmaniases. World Health Organization; [cited 2016 Jan 29]; Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media/integrated_media_2010_leishmaniasis_2/en/
23. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2012 31;7(5):e35671.
24. Douba M, Mowakeh A, Wali A. Current status of cutaneous leishmaniasis in Aleppo, Syrian Arab Republic. *Bull World Health Organ*. 1997;75(3):253–9.
25. Bari A u, Bari A ul, Ejaz A. Fissure leishmaniasis: A new variant of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Online J*. 2009;15(10):13.
26. WHO | World Health Organization [Internet]. [cited 2016 Jan 29]. Available from: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html
27. Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*. 2006;133 Suppl:S87–112.

28. Schroeder J. Selection of novel antigens from *Leishmania* spp. and design of live recombinant salmonella vaccines against experimental visceral leishmaniasis. 2011, page 3. PhD Thesis.
29. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005;309(5733):436–42.
30. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res*. 2011;21(12):2129–42.
31. Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin Chromosome 1 Initiates in Both Directions within a Single Region. *Mol Cell*. Elsevier; 2003;11(5):1291–9.
32. Myler PJ, Stuart KD. Recent developments from the *Leishmania* genome project. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3(4):412–6.
33. Gopal S, Cross GAM, Gaasterland T. An organism-specific method to rank predicted coding regions in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(20):5877–85.
34. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck H-P, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46(2):115–24.
35. Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect*. 2003;5(13):1231–40.
36. Liang X -h., Haritan A, Uliel S, Michaeli S. trans and cis Splicing in *Trypanosomatids*: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryot Cell*. 2003;2(5):830–40.

37. Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda a B, Lopes UG, Degraive WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania* (Viannia). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(3):279–84.
38. Lukes J, Lys Guilbride D, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryot Cell*. 2002;1(4):495–502.
39. Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, Vengerov YY. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1656–7.
40. Kinetoplast and kDNA [Internet]. [cited 2016 Jan 29]. Available from: http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/kdna/subchapters/kdna1.htm
41. Santarém N, Silvestre R, Tavares J, Silva M, Cabral S, Maciel J, et al. Immune response regulation by leishmania secreted and nonsecreted antigens. *J Biomed Biotechnol*. 2007;2007(6):85154.
42. Kutner S, Pellerin P, Breniere SF, Desjeux P, Dedet JP. Antigenic specificity of the 72-kilodalton major surface glycoprotein of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Clin Microbiol*. 1991;29(3):595–9.
43. Zand M, Narasu M lakshm. *Leishmania* Mechanisms of Evasion. *Intl J Mol Med Adv Sci*. 2014;8(4):419–25.
44. Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1543.

45. Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JY. Protective Vaccination with Promastigote Surface Antigen 2 from *Leishmania major* Is Mediated by a TH1 Type of Immune Response. 1995;63(11):4261–7.
46. Ilg T, Stierhof YD, Etges R, Adrian M, Harbecke D, Overath P. Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: a filamentous phosphoglycoprotein polymer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(19):8774–8.
47. Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. Microbes Infect. 1999;1(8):589–99.
48. Brooks DR, Tetley L, Coombs GH, Mottram JC. Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. J Cell Sci. 2000;113 (Pt 2):4035–41.
49. Mitchell GF, Curtis JM, 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(5):521–32.
50. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. Annu Rev Immunol. 1995;13:151–77.
51. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145–73.
52. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. 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(10):1497–506.
53. Rolland-Burger L, Rolland X, Grieve CW, Monjour L. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Leishmania donovani* infantum polypeptides in human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1991;29(7):1429–35.
 54. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(11):845–58.
 55. Selvapandiyan A, Duncan R, Debrabant A, Lee N, Sreenivas G, Salotra P, et al. Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):455–66.
 56. Scott P. Th cell development and regulation in experimental cutaneous leishmaniasis. *Chem Immunol.* 1996;63:98–114.
 57. Schariton 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):567–77.
 58. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):229–43.
 59. Park AY, Hondowicz BD, Scott P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2000;165(2):896–902.
 60. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999;112 Pt 18:2993–3002.

61. Green MS, Kark JD, Greenblatt CL, Londner M V, Frankenburg S, Jacobson RL. The cellular and humoral immune response in subjects vaccinated against cutaneous leishmaniasis using *Leishmania tropica* major promastigotes. *Parasite Immunol.* 1983;5(4):337–44.
62. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000;173:17–26.
63. Rao JB, Chamberlain RS, Bronte V, Carroll MW, Irvine KR, Moss B, et al. IL-12 is an effective adjuvant to recombinant vaccinia virus-based tumor vaccines: enhancement by simultaneous B7-1 expression. *J Immunol.* 1996 May 1;156(9):3357–65.
64. Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1994;179(4):1367–71.
65. Liew FY, Millott S, Li Y, Lelchuk R, Chan WL, Ziltener H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 1989;19(7):1227–32.
66. Chatelain R, Varkila K, Coffman RL. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J Immunol.* 1992;148(4):1182–7.
67. Salhi A, Rodrigues V, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008;180(9):6139–48.

68. Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2005;75-76:115–30.
69. Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.* 2000;22(7):319–31.
70. Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 2009;25(11):505–10.
71. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):183–91.
72. Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:72.
73. Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol.* 2009;47(6):412–23.
74. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol.* 2000;165(2):969–77.
75. Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1087–96.

76. Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun.* 1993;61(4):1553–8.
77. Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2000;191(6):1063–8.
78. Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol.* 1992;31:175–254.
79. Awasthi A, Mathur RK, Saha B, Leishman W, Donovan C. Immune response to *Leishmania* infection. 2004;(June):238–58.
80. Muraille E, De Trez C, Pajak B, Torrentera FA, De Baetselier P, Leo O, 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):2704–15.
81. Von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med.* 1998;188(8):1547–52.
82. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol.* 1998;28(1):121–34.
83. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol.* 2004;5(12):1260–5.

84. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, et al. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:23–45.
85. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767–811.
86. Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* . 2007;17(2):115–22.
87. Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc γ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med*. 2006;203(1):177–88.
88. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502–7.
89. Alvar J, Croft SL, Kaye P, Khamesipour A, Sundar S, Reed SG. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*. 2013;31:B244–9.
90. Taheri T, Rafati S. Leishmaniasis: recombinant DNA vaccination and different approaches for vaccine development. *Clin Investig (Lond)*. Future Science Ltd London, UK; 2013;3(11):1023–44.
91. Veras P, Brodskyn C, Balestieri F, Freitas L d, Ramos A, Queiroz A, et al. A dhfr-ts- *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(4):491–6.

92. Titus RG, Gueiros-Filho FJ, de Freitas LA, Beverley SM. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(22):10267–71.
93. Uzonna JE, Späth GF, Beverley SM, Scott P. Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol*. 2004;172(6):3793–7.
94. Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):423–38.
95. Olobo JO, Anjili CO, Gicheru MM, Mbatia PA, Kariuki TM, Githure JI, et al. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania* “major surface glycoprotein” (gp63). *Vet Parasitol*. 1995 Dec;60(3-4):199–212.
96. Jaafari MR, Badiie A, 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(32):6107–17.
97. McMahon-Pratt D, Rodriguez D, Rodriguez JR, Zhang Y, Manson K, Bergman C, et al. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun*. 1993;61(8):3351–9.
98. Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, et al. Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect Immun*. 2003;71(7):3988–94.

99. Stäger S, Smith DF, Kaye PM. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2000;165(12):7064–71.
100. Masina S, M Gicheru M, Demotz SO, Fasel NJ. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *J Infect Dis.* 2003;188(8):1250–7.
101. Badiie A, Jaafari MR, Khamesipour A. *Leishmania major*: immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. *Exp Parasitol.* 2007;115(2):127–34.
102. Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, Dougan G, Liew FY. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). *Immunology.* 1995;85(1):1–7.
103. Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11473–7.
104. Ramírez JR, Gilchrist K, Robledo S, Sepúlveda JC, Moll H, Soldati D, et al. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine.* 2001;20(3-4):455–61.
105. Gonzalo RM, del Real G, Rodriguez JR, Rodriguez D, Heljasvaara R, Lucas P, et al. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine.* 2002;20(7-8):1226–31.

106. Sjölander A, Baldwin TM, Curtis JM, Bengtsson KL, Handman E. Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine*. 1998;16(20):2077–84.
107. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1997;186(7):1137–47.
108. Walker PS, Scharon-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, et al. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther*. 1998;9(13):1899–907.
109. Carter KC, Henriquez FL, Campbell SA, Roberts CW, Nok A, Mullen AB, et al. DNA vaccination against the parasite enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase confers protection against *Leishmania donovani* infection. *Vaccine*. 2007;25(22):4502–9.
110. Aguilar-Be I, da Silva Zardo R, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Rosado-Vallado M, Mut-Martin M, et al. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005;73(2):812–9.
111. Samant M, Gupta R, Kumari S, Misra P, Khare P, Kushawaha PK, et al. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 2009;183(1):470–9.

112. Xu D, Liew FY. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine*. 1994;12(16):1534–6.
113. Dumonteil E, Maria Jesus RS, Javier EO, Maria del Rosario GM. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine*. 2003;21(17-18):2161–8.
114. Evans KJ, Kedzierski L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *J Trop Med*. 2012;2012:892817.
115. Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, et al. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med*. 2001;194(3):331–42.
116. Morris R V, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol*. 2001;167(9):5226–30.
117. Submicron emulsions as vaccine adjuvants. 1999. Available from: <http://www.google.com/patents/US5961970>
118. Misra A, Dube A, Srivastava B, Sharma P, Srivastava JK, Katiyar JC, et al. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. *Vaccine*. 2001;19(25-26):3485–92.
119. Dunning N. *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Biosci Horizons*. 2009;2(1):73–82.
120. Chang K-P, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop*. 2003;85(3):375–90.

121. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G-H, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in Sera from Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):1037–43.
122. Santarém N, Tomás A, Ouaiissi A, Tavares J, Ferreira N, Manso A, et al. Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. *Immunol Lett.* 2005;101(1):18–23.
123. Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, et al. Differential Decline in *Leishmania* Membrane Antigen-Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG Subclass Antibodies in Indian Kala-Azar Patients after Chemotherapy. *Infect Immun.* 1999;67(12):6663–9.
124. Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(3):312–20.
125. Soto M, Requena JM, Garcia M, Gómez LC, Navarrete I, Alonso C. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *J Biol Chem.* 1993;268(29):21835–43.
126. MacFarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Miles MA, Kelly JM. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem.* 1990;190(2):377–84.

127. Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, et al. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(2):342–9.
128. Requena JM, Alonso C, Soto M, Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily Conserved Proteins as Prominent Immunogens during *Leishmania* Infections. 2000;16(6).
129. Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol.* 1988;28(5):553–61.
130. Da Silva AC, Espinoza AG, Taibi A, Ouaisi A, Minoprio P. A 24,000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B-cell activator. *Immunology.* 1998;94(2):189–96.
131. Avrameas S. Natural autoantibodies: from “horror autotoxicus” to “gnosthi seauton”. *Immunol Today.* 1991;12(5):154–9.
132. SOTO M, REQUENA JM, QUIJADA L, PEREZ MJ, NIETO CG, GUZMAN F, et al. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(2):342–9.
133. Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. During canine visceral leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology.* 1996;112 (Pt 3):277–84.
134. Galanti N, Galindo M, Sabaj V, Espinoza I, Toro GC. Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today.* 1998;14(2):64–70.

135. Soto M, Requena JM, Gomez LC, Navarrete I, Alonso C. Molecular characterization of a *Leishmania donovani* infantum antigen identified as histone H2A. *Eur J Biochem.* 1992;205:211–6.
136. Soto M, Requena JM, Quijada L, García M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1995;48(3):209–14.
137. SOTO M, REQUENA JM, QUIJADA L, GOMEZ LC, GUZMAN F, PATARROYO ME, et al. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(3):454–61.
138. Van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(37):13837–42.
139. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G-H, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):1037–43.
140. Ghosh AK, Dasgupta S, Ghose AC. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2(3):291–6.
141. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):293–305.

142. Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, et al. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996;173(6):1515–8.
143. Reiner NE, Ng W, McMaster WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol.* 1987;138(6):1926–32.
144. Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 2002;9(1):53–64.
145. H2A - Histone H2A - *Leishmania infantum* - H2A gene & protein [Internet]. [cited 2016 Jan 30]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BJC8>
146. Lodish H. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman; 2008. 1150 p.
147. Mariño-Ramírez L, Jordan IK, Landsman D. Multiple independent evolutionary solutions to core histone gene regulation. *Genome Biol.* 2006;7(12):R122.
148. Rectal Bleeding - Biochemistry | Fastbleep. [cited 2016 Jan 30]. Available from: <http://www.fastbleep.com/biology-notes/40/116/119>
149. Sullivan WJ, Naguleswaran A, Angel SO. Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* 2006;8(12):1850–61.
150. h2a in UniProtKB [Internet]. [cited 2016 Jan 30]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=H2A&sort=score>

151. H2B - Histone H2B - *Leishmania major* - H2B gene & protein. [cited 2016 Jan 30]. Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9U8C0>
152. h2b in UniProtKB [Internet]. [cited 2016 Jan 30]. Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=h2b&sort=score>
153. H3 - Histone H3 - *Leishmania donovani* - H3 gene & protein. [cited 2016 Jan 30]. Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/G9CU80>
154. h3 in UniProtKB. [cited 2016 Jan 30]. Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=h3&sort=score>
155. H4 - Histone H4 - *Leishmania infantum* - H4 gene & protein. [cited 2016 Jan 30]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/O00913>
156. h4 in UniProtKB. [cited 2016 Jan 30]. Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=h4&sort=score>
157. Carrión J, Folgueira C, Alonso C. Development of Immunization Strategies against Leishmaniosis based on the *Leishmania* Histones Pathoantigens . 2009;1(1):101–3.
158. Chang K-P, McGwire BS. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2002;1:1.
159. Carrión J, Nieto A, Soto M, Alonso C. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniosis in BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2007;9(6):735–43.
160. Iborra S, Soto M, Carrión J, Alonso C, Requena JM. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of

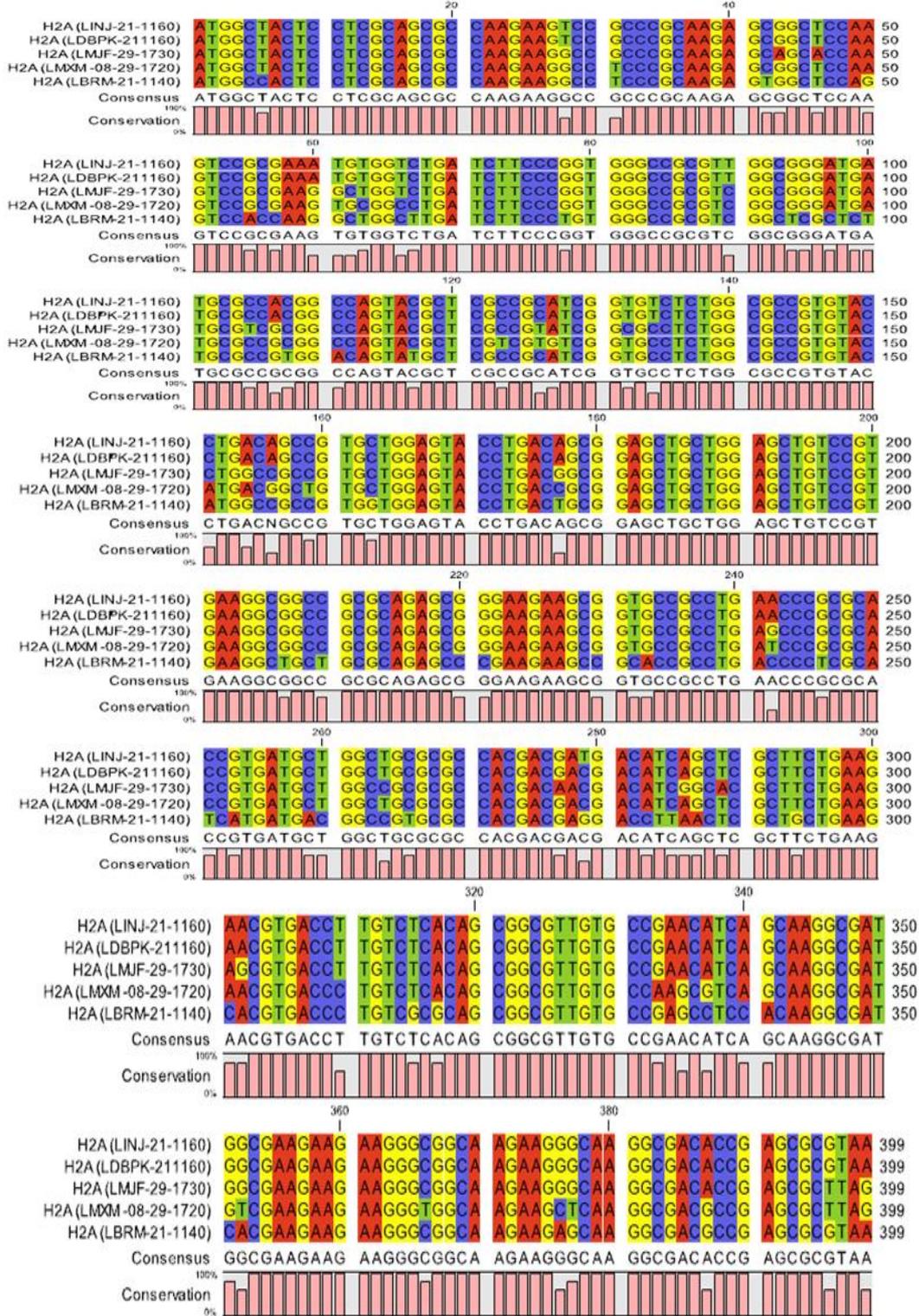
Leishmania confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2004;22(29-30):3865–76.

161. Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;67(2):117–30.
162. Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, et al. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1999;115(2):342–9.
163. Chenik M, Louzir H, Ksontini H, Dilou a., Abdmouleh I, Dellagi K. Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. *Vaccine*. 2006;24(14):2521–9.
164. Morales G, Carrillo G, Requena JM, Guzman F, Gomez LC, Patarroyo ME, et al. Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 1997;114 (Pt 6):507–16.
165. Soto M, Quijada L, Alonso C, Requena JM. Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;90:439–47.
166. Carrión J, Folgueira C, Alonso C. Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: The result of immunogenicity and multicomponent properties of histone DNA vaccines. *Vaccine*. 2008;26(9):1155–65.

167. Carneiro MW, Santos DM, Fukutani KF, Clarencio J, Miranda JC, Brodskyn C, et al. Vaccination with *L. infantum* chagasi Nucleosomal Histones Confers Protection against New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. PLoS One. 2012;7(12).
168. Hayani K, Dandashli A, Weisshaar E. Cutaneous Leishmaniasis in Syria: Clinical Features, Current Status and the Effects of War. Acta Derm Venereol. 2015;95(1):62–6.
169. Dumonteil E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. J Biomed Biotechnol. 2007;2007(6):90520.

الملحق Appendix

ملحق ١. مقارنة تسلسل جين H2A عند أنواع الليشمانية الطفيلية، والدونوفانية، والكبيرة، والمكسيكية والبرازيلية.



الملحق ٢. مقارنة تطابق تسلسل جين H2A عند كل من الليشمانية الكبيرة (أ) والليشمانية الطفلية (ب)، والجين H2B عند كل من الليشمانية الكبيرة (ج) والليشمانية الطفلية (د)، مع تسلسل الجينوم البشري بعد إجراء تطبيق Blast على موقع ncbi.

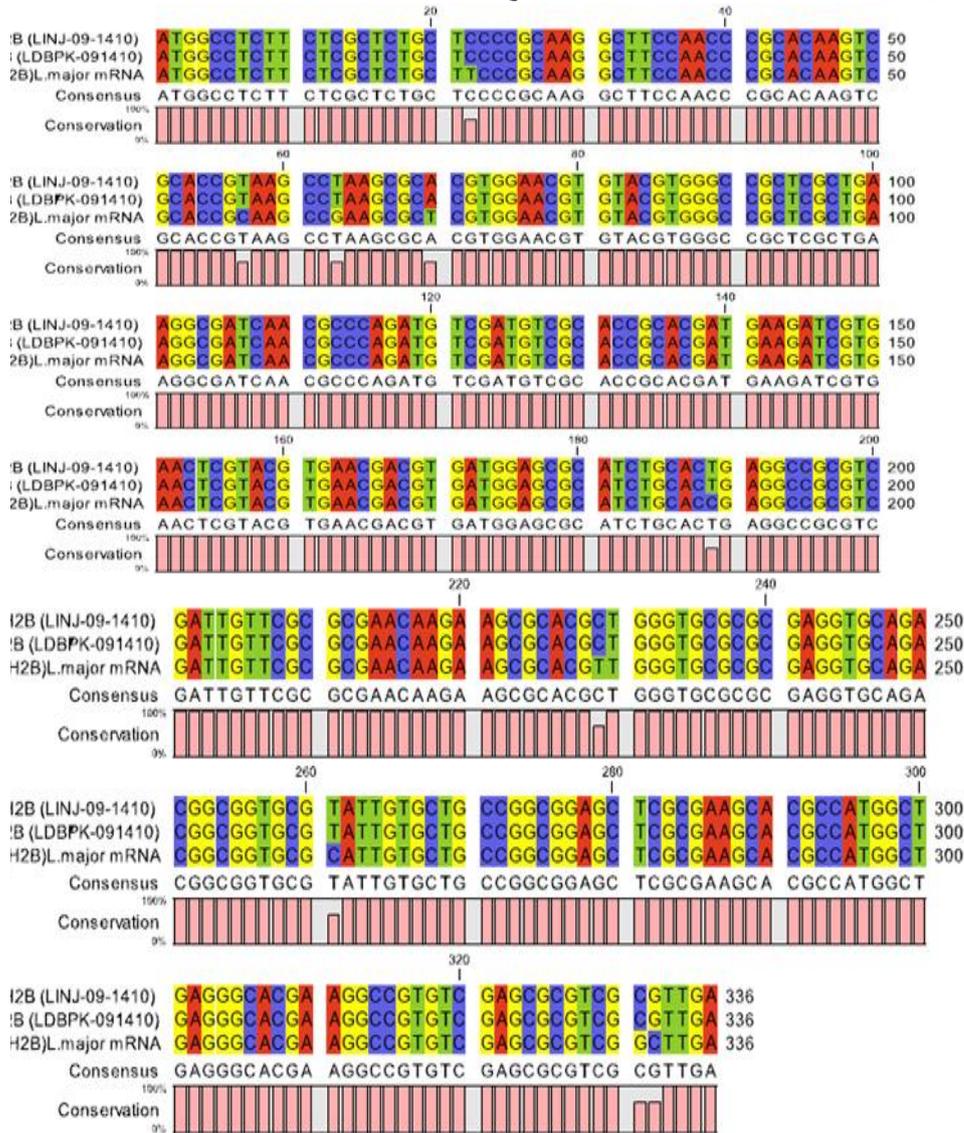
أ

ب

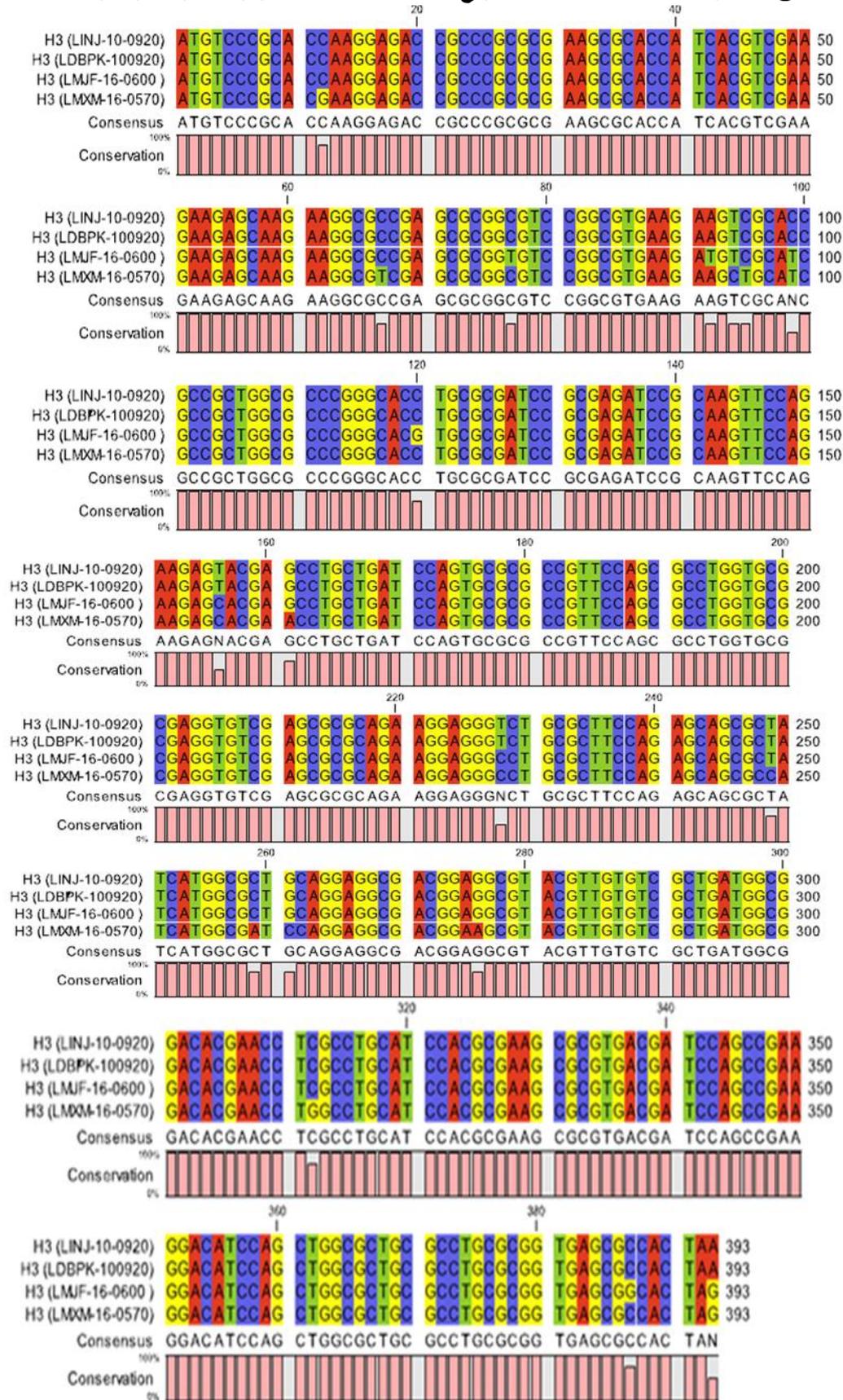
ج

د

الملحق ٣. مقارنة تسلسل جين H2B عند أنواع الليشمانيا الطفيلية، الدونوفانية والكبيرة.



الملحق ٤. مقارنة تسلسل جين H3 عند أنواع الليشمانيا الطفيلية، الدونوفانية والكبيرة، والمكسيكية.



الملحق ٥. مقارنة تطابق تسلسل جين H3 عند كل من الليشمانية الكبيرة (أ) والليشمانية الطفلية (ب)، والجين H4 عند كل من الليشمانية الكبيرة (ج) والليشمانية الطفلية (د)، مع تسلسل الجينوم البشري بعد إجراء تطبيق Blast على موقع ncbi.

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - 5PR40V55015

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Nucleotide Sequence (393 letters)

RID [5PR40V55015](#) (Expires on 12-01 03:13 am)

Query ID Id|Query_110825 Database Name Human G+T (2 databases)

Description None Description [See details](#)

Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.3.0+ [Citation](#)

Query Length 393

No significant similarity found. For reasons why, click here

أ

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - 5PR9PGXN01R

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Nucleotide Sequence (393 letters)

RID [5PR9PGXN01R](#) (Expires on 12-01 03:16 am)

Query ID Id|Query_69095 Database Name Human G+T (2 databases)

Description None Description [See details](#)

Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.3.0+ [Citation](#)

Query Length 393

No significant similarity found. For reasons why, click here

ب

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - 5PRVFERB014

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Nucleotide Sequence (303 letters)

RID [5PRVFERB014](#) (Expires on 12-01 03:26 am)

Query ID Id|Query_116367 Database Name Human G+T (2 databases)

Description None Description [See details](#)

Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.3.0+ [Citation](#)

Query Length 303

No significant similarity found. For reasons why, click here

ج

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - 5PRZM47M015

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Nucleotide Sequence (303 letters)

RID [5PRZM47M015](#) (Expires on 12-01 03:28 am)

Query ID Id|Query_135397 Database Name Human G+T (2 databases)

Description None Description [See details](#)

Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.3.0+ [Citation](#)

Query Length 303

No significant similarity found. For reasons why, click here

د

الملحق ٦. مقارنة تسلسل جين H4 عند أنواع الليشمانية الطفيلية، الدونوفانية والكبيرة، والمكسيكية، والبرازيلية.

