دراسة مقارنة لمستضدات طوري الليشمانيا الجلدية المدارية أمامي السوط Promastigote وعديم السوط Amastigote

بثينة درويش و محمود قويدر و سعاد العقلة

قسم البيولوجيا الحيوانية– كلية العلوم – جامعة دمشق– سورية

تاريخ الإيداع 2010/10/26
قبل للنشر في 2011/03/07

الملخص

ترمي هذه الدراسة إلى الوقوف على المحتوى البروتيني للطورين الرئيسين لليشمانيا: أمامي السوط promastigote وعديم السوط amastigote ولتعيين الأوزان الجزيئية للبروتينات الأكثر تعبيراً وذلك بوساطة تقنية الرحلان الكهربائي العمودي ومن ثم تحديد أهم مستضدات هذين الطورين بتقنية التبصيم المناعي وباستخدام أمصال فئران منعت بالخلاصات البروتينية لهذه الأطوار ومقارنتها ببعضها بهدف تحديد المستضدات المشتركة بينهما والمستضدات الخاصة بكل طور، وذلك بغية استخدامها في إطار استراتيجية تلقيحية تجاه الليشمانيا. ولتحقيق هذا الهدف قمنا بعزل عينات من مصابين بالليشمانيا الجلدية من مشفى الأمراض الجلدية بجامعة دمشق ثم تم استنباتها على وسطٍ نصف صلب ومن ثم على وسطٍ سائل عند درجة حرارة 26 مئوية حيث نحصل في هذه الشروط على الطور أمامي السوط. أما الطور عديم السوط فقمنا بتحضيره بطريقتين. الأولى خارج خلوية: تحضير بالحرارة، ويتم فيها استنبات الطفيلي في درجة حرارة 37 مئوية والطريقة الثانية داخل خلوية: يتم فيها تحضير عديمات السوط من خلال لحماج بالعات كبيرة، معزولة من بيرتوان الفأر ومزروعة في علب زرع خاصة، بالطور أمامي السوط للطفيلي. تم بعدها استخلاص البروتينات الخاصة بكل طور باستخدام دارئة حل مناسبة، وقمنا بقياس تركيز البروتينات في هذه الخلاصات بطريقة برادفورد Bradford. ثم حدد محتوى هذه الخلاصات من البروتينات وحسبت الأوزان الجزيئية لأهمها باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي العمودي SDS-PAGE. وتم التوصل إلى أهم مستضدات الطورين أمامي وعديم السوط بوساطة تقنية التبصيم المناعي باستخدام أمصال فئران منعت بالخلاصات البروتينية الخاصة بكل طور. إذ تم إيجاد مستضدات مشتركة بين كلا الطورين لها الأوزان الجزيئية التالية المعقد (63-67) و57 و36 و28 كيلو دالتون، ومستضدات خاصة بالطور عديم السوط ذات أوزان جزيئية 50 و44 و34 كيلو دالتون، وأخرى خاصة بالطور أمامي السوط بلغت أوزانها الجزيئية 43 و55 كيلو دالتون. كما وجدنا اختلافات في مستضدات طور عديمات السوط المحضرة بطريقة لحماج البالعات الكبيرة، وتلك المحضرة بالحرارة.

الكلمات المفتاحية: أماميات السوط، عديمات السوط الخارج والداخل خلوية، مستضدات.

Comparative Study For Promastigote & Amastigote Stages Antigens of Cutaneous Leishmania Tropica

B. Darwish; M. Kweider and S. Al-Okla

Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 26/10/2010

Accepted 07/03/2011

ABSTRACT

The parasitic antigens are of great interest in immune responses and in the strategies for developing vaccines. The aim of this study was to identify the major antigens which are expressed in the two *leishmania tropica* stages, promastigote & amastigote, employing the western blot analysis using the sera collected from mice immunized with the above mentioned parasite stages' total protein.

The parasites were harvested from patients with cutaneous leishmaniasis and cultured in N.N.N medium at 26°C to be transformed into promastigotes, then were passed to liquid medium RPMI-1640.

The extracellular amastigotes were produced by incubating the promastigotes at 37°C, while the intracellular amastigotes were prepared by infecting the murine peritoneal macrophages with stationary phase promastigotes. The total proteins were separated using suitable lysis buffer, the protein concentrations were estimated by the Bradford assay. The molecular masses of these proteins were evaluated using SDS-PAGE. The comparison of antigens in promastigotes, extracellular amastigotes and intracellular amastigotes, showed three types of antigens; similar antigens in the two stages their molecular weights are (67-63), 57, 36 and 28 KDa, amastigotes specific antigens 50, 44 and 34 KDa, and promastigotes specific antigens with the molecular weights 55 and 43 KDa. In addition, this study also presented differences in the antigens between extracellular and intracellular amastigotes.

Key words: Promastigotes, Extracellular and intracellular amastigotes, Antigens.

المقدمة

يعد داء الليشمانيات واحداً من الأمراض الطفيلية الرئيسية في الدول النامية (Grimaldi *et al.*, 1993)، فهو ينتشر في 88 دولة في أربع قارات آسية وأوروبية وأفريقية وأمريكا (WHO 1990)، ويقدر عدد الإصابات سنوياً بنحو 2 مليون إصابة حول العالم في حين يبلغ عدد المصابين به 20 مليون مصاباً. يسبب داء الليشمانيات طفيلي وحيدة خلية من جنس الليشمانيا ولهذا الداء أشكال مختلفة: الجادية والجادية-المخاطية والحشوية وذلك بحسب مكان الإصابة وتبعاً لنوع الطفيلي المسبب. شُخّص الداء في سورية منذ القرن الثامن عشر وينتشر حالياً في محافظات القطر كلّها وفي البيئات الساحلية والجبلية وشبه الجافة كلّها ولا يعرف لانتشاره حدود بين المدن والقرى السورية المختلفة. وبحسب إحصائيات وزارة الصحة السورية بلغ عدد الإصابات الجديدة في عام 2008 نحو 29000 إصابة.

تبدأ دورة حياة الطفيلي عندما تأخذ أنثى ذبابة الرمل العائدة لجنس الفاصدة phlebotomus وجبة دموية من المضيف الفقاري المصاب فينتقل الطفيلي بطوره عديم السوط مع الدم إلى معي الحشرة متحولاً إلى الطور أمامي السوط من النمط البدئي procyclic promastigotes المتطاول قليلاً، والذي يبدأ بالتكاثر بالانشطار الثنائي الطولي ضمن معي الحشرة. يعرف هذا الطور بكونه غير مخمج بالنسبة إلى المضيف الفقاري، وبعد عدة أيام يتوقف عن الانقسام ويتحول إلى الشكل المخمج من النمط الثانوي الذي يعرف بـ metacyclic promastigotes، مهاجراً إلى الغدد اللعابية آخذاً أشكالاً أمامية السوط متطاولة ونحيفة (Klaus S.N *et al.*, 1995; Tracy G and Simon L 2002). في هذه المرحلة تكون الحشرة عندها مهيأة لنقل الإصابة إلى مضيف فقاري آخر عند أخذ وجبة دموية جديدة، حيث تدخل الأشكال أمامية السوط من النمط الثانوي إلى الدم وترتبط بالبالعات الكبيرة، ثم تدخل ضمنها وتتحول إلى الشكل عديم السوط الذي يتكاثر بالانشطار العرضي حتى تنفجر البالعة محررة هذه الأشكال في الدم كي تصيب بالعات جديدة. يمكن إعادة دورة الحياة في الزجاج والحصول على الأطوار المختلفة للطفيلي، وذلك بزراعته بشروط مختلفة.

وربما أهم الاختلافات بين نمطي أطوار حياة الطفيلي على المستوى الجزيئي هو في طبيعة البروتينات التي يعبر عنها في كل نمط. من حيث المبدأ، تعطي هذه البروتينات لكل طور من أطوار حياة الطفيلي صفاته الشكلية والانقسامية والاخماجية، ولعل أكثر هذه البروتينات أهمية بالنسبة إلى الباحثين هي المستضدات antigens التي يحملها كل طور من الأطوار نظراً إلى أدوارها التي يمكن أن تؤديها في الاستجابة المناعية ضد الطفيلي.

وتشير الدراسات أنه من أهم البروتينات التي يعبر عنها في الطور أمامي السوط هو

البروتين السكري الغشائي Gp65 (المعروف أيضاً بـ Gp63). حيث يستخدم الطفيلي هـذا البروتين السطحي، بعد دخوله جسم المضيف الفقاري عن طريق لـدغ الحـشرة الناقلـة، للارتباط بالبالعات الكبيرة (Vinayak *et al.*, 1991) كما يعتقد أن له دوراً فـي الفوعـة الإمراضية للطفيلي وفي إخماجيته، وذلك بسبب زيادة التعبير عنه في الطور أمامي الـسوط المخمج بالنسبة إلى الطـور غيـر المخمـج (Sacks DL *et al.*, 1985, Kweider M *et al.*, 1987, 1989) . كما يعد المعقد الغشائي PSA-2، والذي يتألف من حوالي ثلاثـة بروتينات، مهماً في الفوعة الامراضية حيث يعبر عنه بشدة في الطور المخمج (Beetham *et al.*, 2003) كما يؤمن للطفيلي مقاومة الانحلال بالمتممة (Lincoln *et al.*, 2004).

بينما يعبر الطفيلي في طور عديم السوط عن جزيئات بروتينية ضرورية للبقاء حيـاً داخل الوسط الحامضي للبالعات الكبيرة، وتكون هذه الجزيئات في معظمها مسؤولة عـن الإمراضية والإخماجية وإصابة بالعات جديدة بعد تدمير البالعات المـصابة. فقـد بينـت الدراسات وجود ثلاثة بروتينات يعبر عنها حصرياً في هـذا الطـور وهـي: البـروتين الـسيتوبلاسمي P2 الـذي يتـراوح وزنـه الجزيئـي بـين 45 و100 كيلـو دالتـون (Zhang *et al.*, 1996). يؤدي هذا البروتين دوراً في فوعة الطفيلي وتمـايزه ليأخـذ الشكل المخمج (Mottram *et al.*, 1988). البروتين الخلوي P4 بوزن 35 و33 كيلـو دالتون (Soong *et al.*, 2000) الذي يعمل علـى ثبـات DNA وRNA وإصـلاحه. (Sujata *et al.*, 2000). أما البروتين الثالث فهو مستضد غشائي يعرف بـ P8 ويتكون من معقدين لهما فعالية أنزيم سيرين بروتياز الأول بوزن جزيئي 56 كيلو دالتون والثاني بوزن 31 كيلو دالتون. يساعد البروتين الأخير الطفيلي بـشكله عـديم الـسوط بـدخول الفجوات البلعمية في البالعات الكبيرة (Clomenares *et al.*, 2001).

كان الهدف من معظم الدراسات العالمية التي أجريت لتحديد أهم مستضدات الأطـوار المختلفة لطفيلي الليشمانيا هو دراسة قدرتها على تشكيل مناعة وقائية تجاه أنواع الليشمانيا المختلفة في العـالم الحـديث كالدونوفانيـة *L. Donovani* والـشاغازية *L. chagasi* والبرازيلية *L. braziliensis*. في حين أن الدراسات المحلية على المستضدات الليشمانية للأنواع المنتشرة في سورية قليلة على الرغم من انتشار هذا المرض في معظم المنـاطق السورية، مع الأخذ بالحسبان الاختلافات المتوقع وجودها بين السلالات المختلفة العائـدة للنوع نفسه والمعزولة من مناطق مختلفة من العالم.

هدفَ هذا البحث إلى دراسة مستضدات طوري النمو الرئسيين لأحد أنواع طفيليـات الليشمانيا المعزولة محلياً وهو الليشمانيا المدارية *L. tropica* بوساطة تقنيـة الـرحلان الكهربائي والتبصيم المناعي بهدف تحديد المستضدات المشتركة بـين الطـورين وتلـك الخاصة بكل طور بغية استخدامها مستقبلاً في إطار استراتيجيات تلقيحية وقائيـة تجـاه الليشمانيا الجلدية.

مواد البحث وطرائقه

1- الحصول على الطفيليات:

عزلت الطفيليات في مشفى الأمراض الجلدية بجامعة دمشق من أشخاص تم التأكـد من إصابتهم بالليشمانية الجلدية من خلال الفحص المجهري المباشر للطاخة مرفوعة مـن مكان الإصابة ملونة بغيمزا. عزلَ الطفيلي من الآفة الجلدية للمصابين، وذلك بحقن كمية صغيرة من وسط الزرع RPMI-1640 بواسطة ممص باستور عقيم تحت الآفة الجلديـة مع التحريك قليلاً من أجل تحرير أكبر كمية ممكنة من الخلايا، ثم يسحب السائل المحقون مع قطرات الدم الناتجة ويوضع داخل أنابيب زرع تحوي وسطاً نصف صلب.

2 - الاستنبات:

استنبتت الطفيليات على الوسط نصف الصلب N.N.N المكون من الآغار المملح ودم أرنب منزوع الفيبرين مضافاً إليـه مـضادات حيويـة Streptomycin وpenicillin بنسبة 100 u/ml (Cytogen). ثم حضنت الزروع عند درجة حرارة 26 مئوية. روقبتِ الزروع يومياً بالفحص المجهري من أجل رؤية الأشكال أمامية السوط حيث بلـغ عـدد العينات الإيجابية بالاستنبات 13 عزلة. عند ظهور هذه الأشكال بأعداد مناسبة في وسـط الزرع نُقلتِ الطفيليات إلى وسط زرع سائل RPMI-1640 (Gibco) مدعم بـ 10% من مصل البقر الجنيني FCS (Cytogen) الذي عطلت متممته بالتسخين مـدة نـصف ساعة عند درجة حرارة 56 مئوية. في بداية الدراسة اِستُخدمت عدة تراكيز من الطفيلـي وهي 5×10^5 و10^6 و1.5×10^6 و2×10^6 طفيلي/مل بغية تحديد التركيز الأفضل الواجب وضعه في كمية ثابتة من وسط الزرع الذي يعطي منحنى نمو أمثل بهدف اعتمـاده فـي التجارب اللاحقة علماً بأن منحنى النمو المثالي يمر بالأطوار الآتية: طور الكمـون فـي بداية الزرع والطور اللوغاريتمي الذي يتكاثر فيه الطفيلي بالانشطار الطولي ثم يتوقـف عن الانقسام في طور الاستتباب والنضج، وفي الطور الأخير، طـور الانحـلال، يبـدأ الطفيلي بالموت. تم تنميط الطفيلي في مخابر كلية العلوم باستخدام تقنية الPCR وتبـين أنه من نوع الليشمانيا المدارية *L. tropica* (نشرة قيد الإنجاز). اعتمدت إحـدى هـذه السلالات في تجاربنا اللاحقة.

3-تحضير طور عديمة السوط Amastigote:

حضر هذا الطور بطريقتين: الأولى خارج خلوية أو ما يعرف بالتحضير بـالحرارة، تعتمد على استنبات الطفيليات أمامية السوط، المأخوذة من طور الاستتباب، عنـد درجـة حرارة 37 مئوية. وهذه الطريقة هي الأكثر استخداماً في البحوث والتجارب. قمنا بجمـع أماميات السوط من طور الاستتباب ووزعت على آبار علب الزرع الخلوي ثم حـضنت بدرجة 37 مئوية في حاضنة مزودة بغاز CO_2 بنسبة 5% (OSK) وفُحـصت يوميـاً

باستخدام المجهر المقلوب (OPTIKA) مدة خمسة أيام من أجل مراقبة ظهور الأشكال البيضوية عديمة السوط. أما الطريقة الثانية فهي طريقة جديدة مبتكرة حيث قمنا بعزل البالعات الكبيرة من بيرتوان فئران من سلالة BALB/c ووزعت على آبار علب الزرع الخلوي (12 بئراً) تحوي 1 مل من RPMI-1640 المدعم بـ 10% من مصل البقر الجنيني وضع فيها مسبقاً سواتر بلاستيكية (معقمة بالكحول الإيتيلي 70% مدة نصف ساعة) وذلك بمعدل 8 × 10^5 بالعة/بئر، ثم حضنت مدة ساعتين. أُضيفَ الشكل أمامي السوط إلى الطفيلي في وسط الزرع مباشرة بمعدل 5 طفيلي للبالعة، وحضنت عند الدرجة 37 مئوية وبوجود 5% منCO2.

صورت الأطوار المختلفة لطفيليات الليشمانيا والبالعات المخموجة باستخدام مجهر عادي (OLYMPUS) مزود بآلة تصوير رقمية (Optikam pro 5) مرتبطة بحاسب بوساطة برنامج أخذ صور (Optikam vision pro 5).

4- استخلاص المستضدات الليشمانية :

جمعت طفيليات الليشمانيا أمامية السوط المستنبتة في الوسط السائل من مرحلة الاستتباب، وكذلك الطفيليات عديمة السوط المحضرة بالطريقتين السابقتين، ثم ثفلت بسرعة دوران 3000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة عند الدرجة +4 مئوية، وأُزيل السائل الطافي وغُسلتِ الرسابة الناتجة ثلاث مرات بالدارئة الفوسفاتية PBS 1X (PH = 7.4) مع التثفيل بالشروط السابقة نفسها بعد كل غسيل. حلت الطفيليات المترسبة بوساطة 100 µl من دارئة الحلمهة المكونة من (Approtonin 0.1 u/ml, Tris 10 mM, Np40 0.5 %) وتُركت الأنابيب على هزاز دائري طوال الليل بدرجة حرارة +4 مئوية، بعد ذلك يثفل الناتج مدة 15 دقيقة بدرجة +4 وبمعدل 3000 دورة/دقيقة يؤخذ السائل الطافي الحاوي على الخلاصة البروتينية، ويعين تركيز البروتين فيها بطريقة برادفورد Bradford.

5 – معايرة البروتين بطريقة برادفورد :

تمت معايرة البروتين بطريقة (Bradford MM 1976) كخطوة أساسية قبل فصلها بتقانة الرحلان الكهربائي. حيث استخدمت سلسلة معيارية ذات تراكيز معلومة ومتزايدة من ألبومين مصل البقر BSA وكاشف برادفورد (Bio basic) قِيست الامتصاصية للسلسلة السابقة عند طول موجة 595 نانومتراً بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer (PG IL-T80). رسم منحنى بياني يمثل العلاقة بين الامتصاصية وتركيز البروتين. ومن أجل تعيين تركيز البروتين في الخلاصة الطفيلية تم قراءة الامتصاصية لهذه العينات بعد إضافة كاشف bradford عند طول الموجة ذاته ونسقط القيمة الناتجة على المنحنى السابق فنحصل على تركيز البروتين الموافق لها.

6- تقانة الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد بوجود سلفات دوديـسيل الصوديوم SDS-PAGE:

استخدمت هذه التقانة حسب طريقة (Laemli, U.K. 1970). اِستُخدمتْ هلامة فصل من عديد الأكريلاميد بتركيز 15% وهلامة تركيز بتركيز 5% حضرت الهلامة بأبعـاد (7cm×10cm)، حفرت فيها عشرة آبار بوساطة أمشاط بلاستيكية خاصة. بعد أن تتبلمر الهلامة تنقل إلى جهاز رحلان كهربائي (BioRad) الذي يملأ بدارئة الرحلان المؤلفـة من Tris base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.1% تحمل العينات بمعـدل 2 ميكروغرام من الخلاصة البروتينية في كل بئر من الآبار المختلفة بعد معالجتها مـدة 3 دقائق عند الدرجة 100 مئوية بوساطة دارئة معالجة العينة المؤلفـة مـن (Tris – Hcl (PH 6.8) 16 mM, Glycerol 25%, SDS 10%, β- Mercaptoethanol 5%, Bromophenol blue 0.01%). اِسـتُخدمتْ واسـمات أوزان جزيئيـة معياريـة (Fermentas) وضعت في أحد الآبار. تم الرحلان بفرق كمون قدره 150V مدة سـاعة ونصف بدرجة حرارة الغرفة. عند انتهاء عمليـة الـرحلان نقـوم بإظهـار العـصائب البروتينية المختلفة بوضع الهلامة في محلول من أزرق الكومـازي (50g Coomassie blue G250, 80ml dH2O, 120ml Methanol, 200ml Glacial asetic acid 20%) طوال الليل بدرجة حرارة +4 مئوية، بعدها توضع الهلامة في محلول مزيل اللون مؤلف من 30% ميتانول و10% حمض الخل الثلجي حتى يزول اللون الأزرق غير النـوعي من الهلامة وتبقى فقط العصائب البروتينية ملونة. حددتِ الأوزان الجزيئيـة للبروتينـات التي تشكل العصائب المختلفة بمقارنها بواسمات الأوزان الجزيئية المعيارية.

7- أخماج الفئران:

قمنا باستخدام فئران من سلالة BALB/C بعمر ثلاثة أشـهر قـسمت إلـى أربـع مجموعات (4 فئران في كل مجموعة) حقِنت داخل البيرتوان بثلاث جرعـات متناقـصة التركيز من الخلاصات البروتينية المحضرة من الأطوار المختلفة (20µg, 10µg, 5µg) وبفاصل زمني مدته أسبوعان وبوجود مساعد فروند الكامل (Sigma). بينما حقنت فئران المجموعة الأولى بالخلاصة الخلوية المستخلصة من طـور أماميـة الـسوط، والثانيـة بالخلاصة الناتجة عن حل خلايا الطور عديمة السوط المحضرة بالحرارة، في حين حقنت فئران المجوعة الثالثة بالخلاصة الناتجة عن حل عديمات الـسوط المحـضرة بطريقـة أخماج البالعات، أما فئران المجموعة الرابعة فكانت شاهدة وحقنت بمساعد فروند الكامل فقط. بعد أسبوعين من الجرعة الثالثة قمنا بسحب الدم من الوريد العيني لهذه الفئران، وتم الحصول على المصل بعملية التثفيل ليوزع بعدها في أنابيب ابيندورف حفظت بدرجـة – 20 مئوية إلى حين الاستعمال.

8- التبصيم المناعي (Western blot) :

بعد انتهاء عملية الرحلان وفصل المستضدات الليشمانية على هلامة عديد الأكريلاميد قمنا بنقل البروتينات من الهلامة (دون تلوينها بأزرق الكومازي) إلى غشاء النتروسيللوز باستخدام جهاز تبصيم خاص (Bio- Rad) وبوجود دارئـة النقـل Transfer buffer المكونة من: Tris base 25mM, Glysine 192 mM, Methanol 20%. استخدمت شدة تيار 250 mA مدة ساعة وربع بدرجة حرارة +4 مئوية. بعد انتهاء عملية النقل تم التأكد من أن كامل البروتينات قد انتقلت إلى الغشاء وذلك إما بتلـوين الهلامـة بـأزرق الكومازي أو بتلوين الغشاء بأحمر بانسو، وفي هذه الحالة يجب إزالة اللون عن الغـشاء قبل متابعة خطوات العمل. بعد النقل نقوم بإقفال الغشاء (blocking) مـدة سـاعة فـي حرارة الغرفة أو طوال الليل عند الدرجة +4 مئوية باستخدام محلول يحـوي 3% مـن ألبومين مصل البقر المنحل في دارئة من TBS-T (pH=7.5) المكونة مـن المركبـات الآتية: Tris/ HCl 10 mM, NaCl 154 mM, Tween 20 0,1%. بعد ذلك يحضن الغشاء مع الأمصال الحاوية على الأضداد الأولية الفأرية الممددة بنـسبة 1: 1000 فـي محلول TBS-T مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة على هزاز دائري. بعـد ذلـك يغـسل الغشاء عدة مرات بمحلول TBS-T، من أجل التخلص من الأضداد غير المرتبطة. نقوم بعدها بحضن الغشاء مع الأضداد الثانوية الموسومة بالفوسفاتاز القلويـة، وهـي أضـداد الماعز الموجهة ضد أضداد الفأر (Bethyle)، وذلك بعد تمديدها بنسبة 1: 5000 فـي محلول TBS-T مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة وعلى هزاز أفقي. بعـد ذلـك يغـسل الغشاء من 3 – 4 مرات مدة 10 دقائق لكل مرة بمحلول TBS. بعد الغـسيل يحـضن الغشاء في الظلام في 10 مل من دارئة مكونـة مـن: Tris base 100mM, Nacl 100mM, Mgcl2 5mM تحوي 33 ميكروليتراً من نتروبلوتترازوليـوم NBT و33 ميكروليتراً من بروموـكلورو-اندوليل-فوسفات BCIP حتى ظهور عـصابات بـاللون البنفسجي تدل على مكان المستضدات الهدف على الغشاء، بعد ظهور هـذه العـصابات يوقفُ التفاعل مباشرة بالماء المقطر.

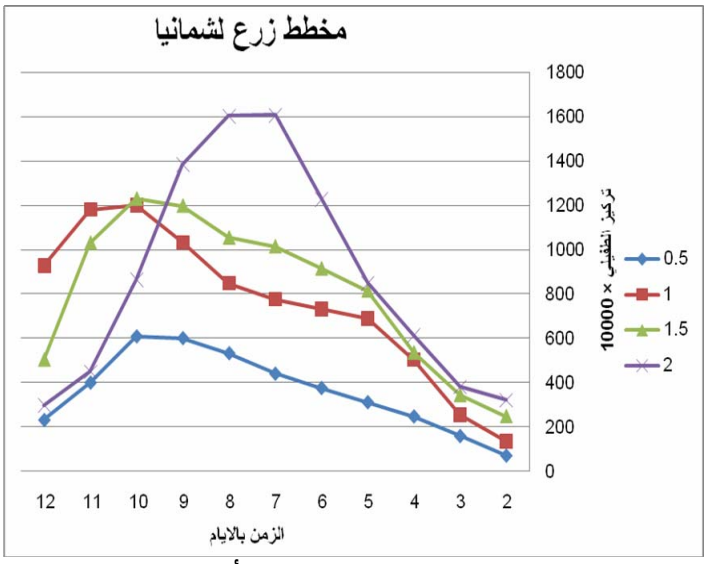
ملاحظة: كُررت التجارب جميعها ثلاث مرات.

النتائـــج

تحديد منحنى النمو المثالي:

تمت متابعة نمو طفيليات الليشمانيا المستنبتة عند الدرجة 26 مئوية على الوسط نصف الصلب N.N.N بشكلٍ يومي إذ تبين ظهور الأشكال أمامية السوط في معظـم العـزلات ابتداء من اليوم الثالث من الزرع. عدت الزروع سلبية في حال عدم ظهور الطفيلي فـي نهاية الأسبوع الثالث من الزرع. في حين استمرت متابعة الزروع الايجابية حتى بلـوغ

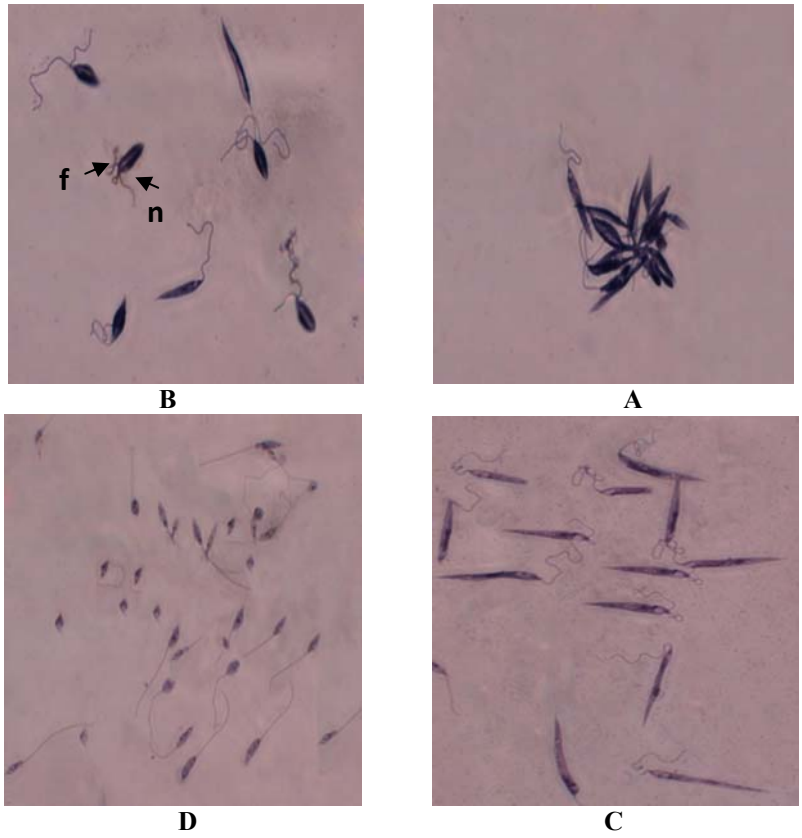
عدد الطفيليات في الزرع 2×10^6 طفيلي/ مل، بعدها نُقلت الطفيليات إلى الوسط الـسائل RPMI-1640 المدعم بـ10% من مصل البقر الجنيني وحضنتْ عند الدرجة 26 مئوية. حضرتْ أربع زروع تحوي أربعة تراكيز مختلفة مـن الطفيلـي وهـي 5×10^5 و10^6 و1.5×10^6 و2×10^6 طفيلياً/مل، وذلك بهدف تحديد التركيز الأمثل للطفيلي فـي وسـط الزرع الذي يعطي منحنى نمو نموذجي يتضمن أطوار النمو الأربعة بشكلٍ منفصل، وهي طور الكمون والطور اللوغاريتمي وطور الاستتباب وطور الانحلال بغية اعتمـاده فـي التجارب اللاحقة. تم تعداد الطفيليات في كل زرع بشكلٍ يومي وتم تمثيل النتـائج التـي حصلنا عليها بالمنحنيات المعروضة في الشكل (1). يبين هذا الشكل أن المنحنى الممثـل للتركيز البدائي 2×10^6 طفيلي/مل هو الأكثر نموذجية حيث مدة طور الثبات فيه تـستمر يومان والطور اللوغارتمي أربعة أيام وطور الاستتباب ليومين، يبلغ الطفيلي فيه تركيـزه الأعظمي وهو 16×10^6 طفيلياً/مل، بعدها يدخل الطفيلي طور الانحلال. بسبب نموذجية المنحنى الممثل لأطوار نمو الطفيلي عند التركيز 2×10^6 طفيلـي/مـل وبفـضل بلـوغ الطفيليات فيه عدداً أعظمياً في طور الاستتباب مقارنة بالتراكيز الأخرى، لذلك اِعتُمد هذا التركيز كتركيز بدائي في التجارب اللاحقة كلّها. وبفضل المراقبة اليومية لطفيلي في أثناء نموه حددت الأشكال المختلفة الذي يظهر بها الطفيلي عند كل طور من أطوار النمو. يبين الشكل 2 هذه الأشكال المختلفة للطفيلي.



الشكل (1) يبين منحنيات النمو للتراكيز الأربعة المستخدمة.

رسم كل منحنى يمثل تركيزاً معيناً بلون، كما هو موضح يمين الشكل. المنحنيات كلّها

تمر بأطوار النمو الأربعة طور الكمون ثم الطور اللوغارتمي ثم طور الاستتباب ومن ثم طور الانحلال. مدة طور الكمون نحو يومين في التراكيز جميعها في حين تختلف مدة الأطوار الباقية وعدد الطفيليات فيها بحسب التركيز الأولي للطفيلي. ويبين الشكل أن منحنى النمو النموذجي هو منحنى التركيز 2×10^6 طفيلياً/مل حيث يصل فيه عدد الطفيليات إلى 16×10^6 طفيلياً/مل في طور الاستتباب.

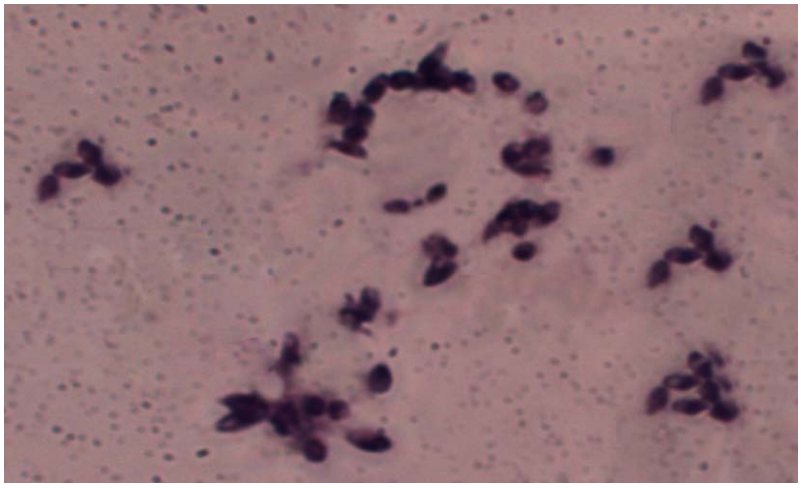


الشكل (2) التبدلات الشكلية لطفيلي الليشمانيا في أثناء نموه في وسط الزرع.

(A) طور الكمون تكون فيه الطفيليات قصيرة ومنتفخة. (B) الطور اللوغاريتمي يزداد فيه حجم الطفيليات نتيجة لتضاعف نواتها مشاراً إليها بالحرف n وتضاعف السوط ويدل عليه الحرف f لتأخذ بعدها بالانشطار الطولي. (C) طور الاستتباب والنضج يكون فيه عدد الطفيليات أعظمياً ويزداد طوله ليصبح نحيفاً وله سوط أمامي طويل جداً. (D) طور الانحلال حيث تأخذ الطفيليات شكلاً بيضوياً مجهزاً بسوط أمامي طويل جداً التكبير المستخدم في الصور جميعها × 1000

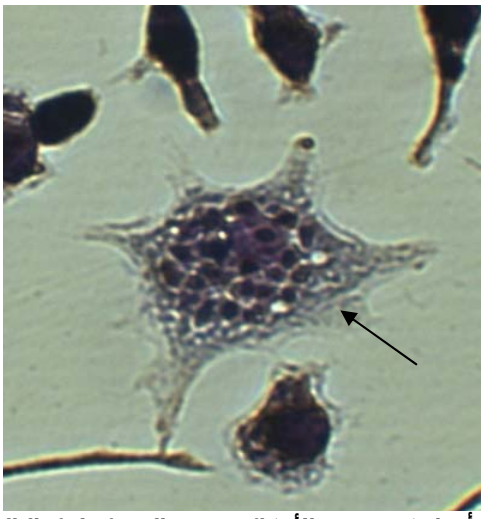
الحصول على الأشكال الطفيلية عديمة السوط.

اعتمدنا في تحضير الطور عديم السوط طريقتين تجريبيتين مختلفتين، الأولى: تعرف بالخارج خلوية أي لا يتم فيها استخدام الخلايا للحصول على الأشـكال عديمـة الـسوط، وتقوم على وضع الأشكال أمامية السوط ذات الحركة النشيطة والمأخوذة من بداية طـور الاستتباب عند درجة حرارة 37 مئوية بعد مرور 24 ساعة عند درجة الحـرارة هـذه تتباطىء حركة هذه الأشكال، وتبدأ بالتحول إلى الشكل البيضوي، وابتـداء مـن اليـوم الخامس تصبح لهذه الطفيليات أشكال بيضوية عديمة الـسوط نموذجيـة كمـا تظهرهـا الصورة في الشكل (3).



الشكل (3) أشكال عديمة السوط خارج خلوية التكبير المستخدم × 1000

أما الطريقة الثانية فهي طريقة خلوية استخدمت فيها خلايا البالعات الكبيرة المعزولـة من بيرتوان الفأر حيث عزلت وزرعت بمعدل 8×10^5 خلية/بئـر كمـا هـو وارد فـي الطرائق، وتم إخماجها بالأشكال أمامية السوط المأخوذة من طور الاسـتتباب بنـسبة 5 طفيليات/ بالعة، بدأت هذه الطفيليات بالارتباط على سطح البالعات الكبيرة مباشرة فـور إضافتها في وسط الزرع، وبعد ساعتين بدأت باختراق غشاء البالعات حيث تـم بعـدها غسل البالعات بتغير وسط الزرع عدة مرات للتخلص من كل الأشكال الطفيليـة أماميـة السوط التي بقيت خارج البالعات لتفادي تحولها إلى أشكال عديمة السوط خارج الخلايـا. تتحول الطفيليات التي دخلت البالعات بعد 24 ساعة إلى الأشكال عديمـة الـسوط كمـا يظهرها الشكل (4). بعدها تتكاثر هذه الطفيليات ضمن البالعـات بالانـشطار العرضـي لنحصل بعد 48 ساعة من الإخماج على بالعات ممتلئة بالأشكال عديمة الـسوط، والتـي ينفجر بعضها بعد مرور 72 ساعة على الإخماج نتيجة امتلائه بالطفيليات.



الشكل (4) يبين وجود أعداد كبيرة من الأشكال عديمة السوط داخل البالعات الكبيـرة التكبيـر المستخدم × 1000

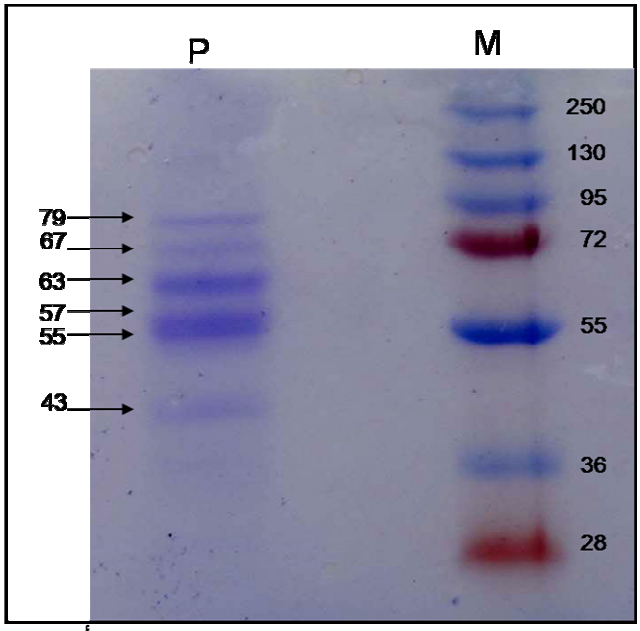
تحضير الخلاصة البروتينية من الأشكال أمامية السوط وعديمة السوط

حضرت الخلاصة البروتينية من الأشكال المختلفة للطفيليات أمامية السوط من طـور الإستتباب وعديمات السوط المحضرة بالطريقتين الداخل والخارج خلوية، وذلك باستخدام الدارئة Np40، استمرت عملية الحل ليلة كاملة عند الدرجة +4 مئوية باستخدام الـرج المستمر، تم التخلص من الحطام الخلوي بعملية التثفيل، ثم تمت معايرة الـسائل الطـافي الحاوي على البروتينات باستخدام طريقة برادفور، وبالاعتماد على سلسلة معياريـة مـن محاليل متدرجة التركيز من BSA.كما ورد في الطرائق .

فصل البروتينات المختلفة للخلاصة البروتينية المحضرة ابتداء من الأشكال أماميـة السوط وعديمة السوط

اِستُخدمت تقانة الرحلان الكهربائي على هلامة من عديد الأكريلاميد بوجود سـلفات دوديسيل الصوديوم أو ما يعرف بـ SDS-PAGE لفصل المحتوى البروتيني للخلاصات التي حضرت ابتداء من الأشكال أمامية السوط وعديمة الـسوط وذلـك بحـسب الأوزان الجزيئية لهذه البروتينات. بعد عملية تلوين الهلامة وجدنا في كل خلاصة بروتينية تابعـة لشكل معين من الطفيلي عدداً من العصائب اختلفت في أوزانها الجزيئية، وكان عدد منها أشد تلوناً من العصائب الباقية وهي تمثل البروتينـات الرئيـسية فـي هـذه الخلاصـة البروتينية. وقد حددت الأوزان الجزيئية للعصائب كلّهـا بالمقارنـة بواسـمات الأوزان الجزيئية المعيارية التي رحلت في بئرٍ مجاورةٍ لبئر العينة، وفق ما ذكر في الطرائق.

ففي الخلاصة المحضرة من طور أماميات السوط وجدنا نحو 10 عصائب راوحـت أوزانها الجزيئية بين 17 و95 كيلو دالتون، منها أربع عصائب شديدة التلون لها الأوزان الجزيئية الآتية: 79 و67 و63 و57 و55 و43 كيلو دالتون، وهي تمثل البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور من حياة الطفيلي. (الشكل 5).

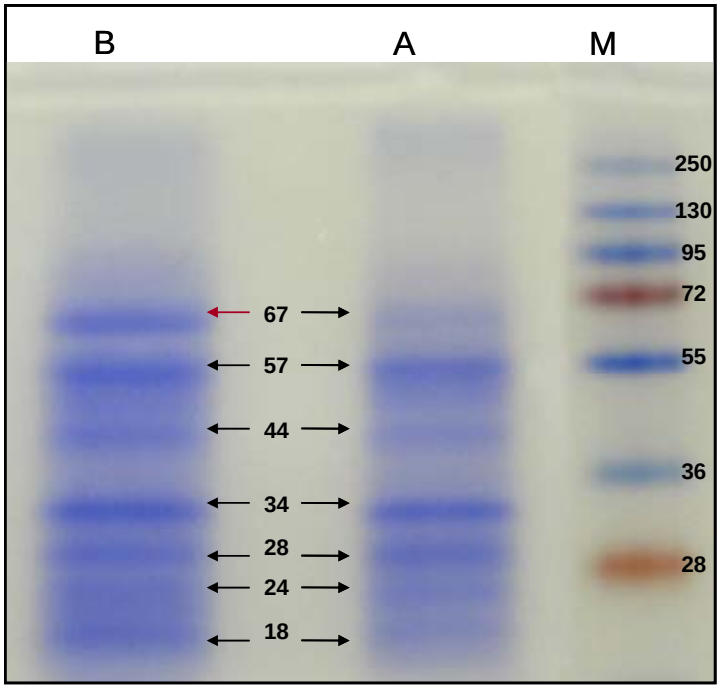


الشكل (5) يبين نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة الناتجة عن أماميات السوط

M تمثل الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية، P الخلاصة الخلوية لطور أمامية السوط

تشير الأسهم إلى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية

أما في الخلاصات الطفيلية الناتجة عن حلمهة طور عديمات السوط الخـارج خلويـة فوجدنا نحو 21 عصابة راوحت أوزانها الجزيئية بين 18 و95 كيلو دالتـون، وكانـت العصائب ذات الأوزان 67 و57 و44 و34 و28 الأكثر تلوناً، لـذلك تعـد البروتينـات الأكثر تعبيراً في هذا الطور (الشكل 6–A).



الشكل(6) يبين نتائج الرحلان الكهربائي لخلاصات خلوية للأشكال عديمة السوط من الليشمانيا

M الأوزان الجزيئية للواسمات، A الخلاصة الخلوية للأشكال عديمة السوط المحضرة بالحرارة، B الخلاصة الخلوية للأشكال عديمة السوط المحضرة باخماج البالعات الكبيرة. تشير الأسهم إلى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية.

وفي الخلاصة المحضرة من طور عديمة السوط الداخل خلويـة وجـدنا أيـضاً 21 عصابة راوحت أوزانها الجزيئية بين 18و95 كيلـو دالتـون، وكانـت العـصائب ذات الأوزان: 67 و57 و44 و34 و28 كيلو دالتون هي الأكثر تركيزاً وتعبيـراً فـي هـذا الطور، (الشكل 6–B).

وعند مقارنة البروتينات المعبر عنها في كلا الطورين وجدنا مجموعـة لهـا الأوزان الجزيئية نفسها هي: 95 67 63 57 36 28 كيلو دالتون.

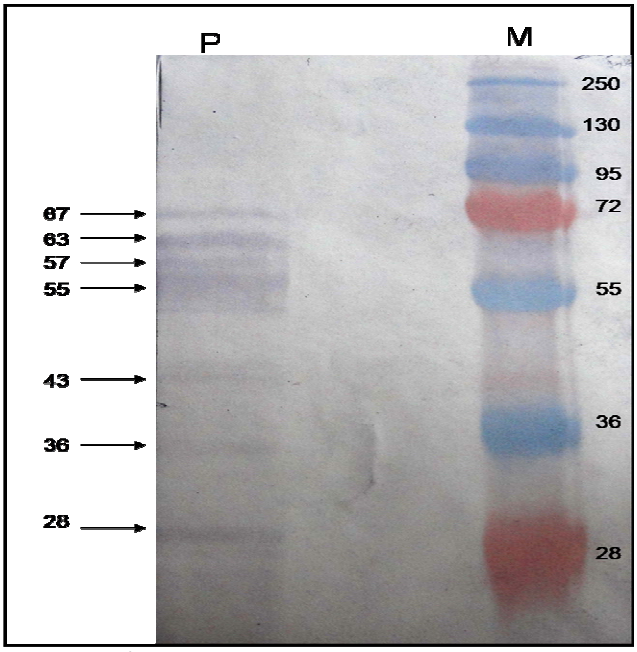
بينما وجد البروتين ذو الوزن الجزيئي 79 كيلو دالتون في طور أمامية السوط فقـط. أما البروتينات ذات الأوزان الجزيئية: 34 و28 و24 و18 كيلو دالتون فكانـت خاصـة بعديمات السوط.

ثم قمنا بمقارنة المحتوى البروتيني للطفيليات في الطور عديمـة الـسوط المحـضرة خارج خلويا مع المحضرة داخل خلويا، فوجدنا تشابهاً كبيراً بـين المحتـوى البروتينـي

للخلاصات المحضرة بالطريقتين مع اختلاف واحد، هو أن تركيـز البـروتينين 67 و18 كيلو دالتون في عديمات السوط المحضرة بطريقة الإخماج كان أكثر من تركيزه في تلـك المحضرة بالحرارة

التبصيم المناعي:

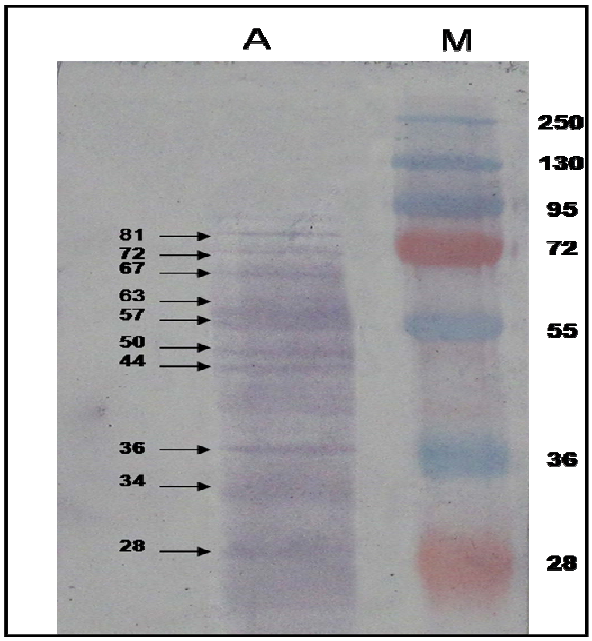
بهدف الكشف عن المستضدات التي حفزت تشكيل أضداد نوعية في أمصال الفئـران الممنعة بالخلاصات البروتينية الناتجة عن حل الطفيلي في أطواره المختلفة لجأنا إلى تقنية التبصيم المناعي، أو ما يعرف بتصيم وستيرن. حيث نُقلت البروتينـات الموجـودة فـي الخلاصات الخلوية بعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي إلى أغـشية مـن النتروسـيللوز وحضنت مع أمصال حضرت إبتداء من دم الفئران الممنعة مسبقاً. في النمط الأول مـن التجارب التي تم فيها الكشف عن مستضدات الطور أمامي السوط باستخدام مصل فئـران منعت ببروتينات الطور نفسه، تبين أن أضداد هذا المصل قد ارتبطت بمستـضدات لهـا الأوزان الجزيئية الآتية: 67 و63 و57 و55 و43 و36 و28 كيلـو دالتـون. وكانـت العصائب الموافقة لهذا الارتباط شديدة التلون، كما يظهرها الشكل (7).



الشكل (7) يظهر نتائج التبصيم المناعي لمستضدات أمامية السوط

M الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية، P مستضدات طور أمامية السوط. تشير الأسهم إلى العـصائب الرئيـسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية

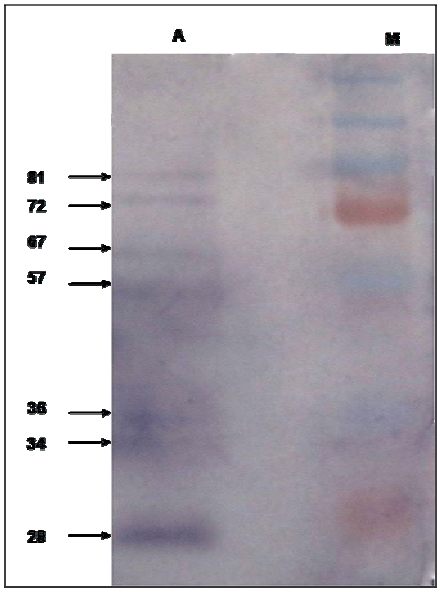
أما عند حضن الغشاء الذي نقلت إليه خلاصات عديمات السوط الخـارج خلويـة مـع أمصال الفئران الممنعة بهذه الخلاصة فظهرت عصائب شديدة التلون لها الأوزان الجزيئية: 81 و72 و67 و63 و57 و50 و44 و36 و34 و28 كيلو دالتون بحسب الشكل (8).



الشكل (8) يوضح نتائج التبصيم المناعي لمستضدات طور عديمات السوط المحضرة بالحرارة

M الكتل الجزيئية للواسمات المعيارية، A مستضدات عديمات السوط. تشير الأسهم إلى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية

في حين تفاعلت الأضداد الموجودة في أمصال الفئران الممنعـة.بخلاصـة عـديمات السوط الداخل خلوية بشدة مع المستـضدات ذات الأوزان الجزيئيـة 81 و72 و67 و57 و36 و34 و28 كيلو دالتون، كما يبين الشكل (9).



الشكل(9) يبين نتائج التبصيم المناعي لمستضدات طور عديمة السوط المحضرة بإخماج البالعات
M الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية، A مستضدات الأشكال عديمة السوط. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها الى أوزانها الجزيئية

تبين النتائج المختلفة للتبصيم المناعي وجود مستضدات مشتركة بين كـلا الطـورين أمامي وعديم السوط، وهي البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الآتية: 63 (لأن البروتينات ذات الأوزان الجزيئية 63 و65 و67 كيلو دالتون تشكل معقداً بروتينياً واحدا) و57 و36 و28 في حين كان المستضدان 43 و55 كيلو دالتون خاصين بالطور أمامي السوط. كمـا تبين أن هناك بعض الاختلافات في مستضدات الطور عديم السوط المحضرة بالطريقـة خارج الخلوية مع تلك المحضرة بالطريقة الخلوية. حيث اقتصر وجود المستـضدين ذوي الأوزان الجزيئية 50 و44 كيلو دالتون على الشكل عديم السوط الخارج خلوي في حـين كان التعبير عن المستضد 67 كيلو دالتون في الشكل عديم السوط الداخل خلوي أكثر منه في الشكل الخارج خلوي.

المناقشة

حددت في هذه الدراسة المستضدات الرئيسة في كلٍ من طوري الليشمانيا المداريـة، أمامية السوط وعديمة السوط. عزلت الطفيليات واستنبتت على أوساط زرع خاصة، ثـم استخلصت البروتينات الكلية من كلا الطورين لتستخدم في تمنيع فئران التجربة والحصول على أمصال مضادة. اختبرت هذه الأمصال تجـاه مستـضدات الطـورين المـذكورين باستعمال تقنية التبصيم المناعي.

حددت الشروط المثلى لاستنبات الطفيليات في الزجاج، إذ تعد هذه المرحلة أساسية قبل القيام بأي دراسة مناعية أو جزيئية أو كيميائية حيوية. استنبتت الطفيليات بتراكيز أولية مختلفة (0.5×10^5 و1×10^6 و1.5×10^6 و2×10^6 طفيلياً/مل) في وسط الزرع السائل RPMI-1640 المدعم بـ 10 % من مصل البقر الجنيني منزوع المتممة. أظهرت نتائجنا أن التركيز 2×10^6 يسمح بالحصول على أفضل منحنى نمو نموذجي لتكاثر الطفيلي في الزجاج مشتملاً الأطوار الأربعة المعروفة، مما يسمح بالحصول على طفيليات أمامية السوط مأخوذة من طور محدد وهو طور الاستتباب الذي يوافق اليومين السابع والثامن من الزرع، حيث تكون الطفيليات في هذا الطور أكثر قدرة على الإخماج (Sacks DL *et al.*, 1985, Kweider M *et al.*, 1987,1989). استخدمت الخلاصة البروتينية المحضرة من طفيليات هذا الطور في تجارب التمنيع، والرحلان الكهربائي والتبصيم المناعي. بالمقابل استخدمت الخلاصة البروتينية للطور عديم السوط الذي حضر وفقاً لما ورد في الطرائق وحصلنا بالاستنبات في درجة حرارة 37 مئوية على طفيليات من الطور عديم السوط، مع العلم أن بعض الدراسات حصلت على هذه الطفيليات بضبط عاملي الحرارة ودرجة الحموضة (pH =4.5) المماثلة لحموضة الفجوات البالعة الحالة. ونجحنا بالإخماج التجريبي في الزجاج للبالعات الكبيرة في تحضير طفيليات طور عديم السوط، إذْ تعد هذه الطريقة مماثلة لشروط الإخماج الطبيعية.

وبهدف تعرف المكونات البروتينية لكلا طوري الليشمانيا أمامي السوط وعديم السوط المحضرين بالطريقتين المذكورتين (حرارياً وعن طريق الإخماج)، فُصلت مكونات الخلاصات البروتينية بتقنية الرحلان الكهربائي. فيما يتعلق بالطفيليات أمامية السوط، أشارت النتائج إلى وجود مجموعة من البروتينات تراوح أوزانها الجزيئية بين 17 و95 كيلو دالتون، مع العلم أن البروتينات ذات الأوزان 63 و57 و43 كيلو دالتون هي الأكثر تعبيراً. بينما بينت نتائج الرحلان للخلاصات البروتينية لطور عديمة السوط، المحضرة حرارياً، وجود عدد أكبر من العصائب تقع أوزانها الجزيئية بين 18 و95 كيلو دالتون، وأن العصائب ذات الأوزان الجزيئية 67 و57 و44 و34 و28 هي الأكثر تركيزاً في هذا الطور. وأظهر الرحلان الكهربائي لخلاصة عديمات السوط المحضرة بإخماج البالعات وجود عدد من العصائب تراوح أوزانها الجزيئية بين 18 و95 كيلو دالتون وكانت العصائب ذات الأوزان الجزيئية 67 و57 و44 و34 و18 أكثر وضوحاً، مما يدل على أن هذه البروتينات هي الأكثر تعبيراً في هذا الطور.

وبمقارنة المكونات البروتينية لكلا الطورين تبين وجود مجموعة من البروتينات المشتركة بينهما ومجموعة أخرى يتم التعبير عنها فقط في الطفيليات عديمة السوط. بينما تميز الطور أمامي السوط بوجود البروتينين 79 و55 كيلو دالتون. وباستخدام تقنية التبصيم المناعي باستعمال مصول الفئران الممنعة بمستضدات الطور أمامي السوط، تم

الكشف عن البروتينات المستـضدية ذات الأوزان الجزيئيـة 63 و57 و43 و28 كيلـو دالتون. وفي حالة التبصيم المناعي بوجود أمصال الفئران الممنعـة بخلاصـات عديمـة السوط الخارج خلوية تم الكشف عن المستضدات ذات الأوزان الجزيئيـة 81 و72 و67 و63 و57 و50 و44 و36 و34 و28 كيلو دالتون. وتفاعلت الأضـداد الموجـودة فـي أمصال الفئران الممنعة بخلاصة عديمات السوط الـداخل خلويـة وبـشكل قـوي مـع المستضدات ذات الأوزان الجزيئية 81 و72 و67 و57 و36 و34 و28 كيلو دالتون.

يتضح من تحليل نتائج التبصيم المناعي لمختلـف الخلاصـات الطفيليـة أن هنـاك مستضدات مشتركة بين طوري الليشمانيا، وأهمها المعقد ذو الوزن الجزيئي 63-67 كيلو دالتون، وكذلك المستضدات ذات الأوزان 57 و36 و28 كيلو دالتون، ومن الجدير بالذكر أن هناك بعض المستضدات كانت خاصة بطور معين دون الآخر إذ تبين أن المستضدين 43 و55 كيلو دالتون مرافقان للطور أمامي السوط. بينت نتائجنا أيضاً ارتبـاط وجـود بعض المستضدات بطريقة تحضير الطور عديم السوط ، حيث ارتبط وجود المستضد ذي الوزن 50 كيلو دالتون بالأشكال عديمة السوط الخارج خلوية (المحضرة بالحرارة). يعتقد أن ظهور هذا المستضد ينتج عن تحفيز الجين المرمزة له بوساطة الحرارة. كمـا بينـت نتائجنا أن التعبير عن المستضد 67 كيلو دالتون يزداد فـي الأشـكال عديمـة الـسوط المحضرة بطريقة إخماج البالعات؛ مما يؤكد الدور الذي يؤديه هذا البروتين في ارتبـاط الطفيلي إلى البالعات الكبيرة.

بينت الدراسات السابقة التي أجريت على أماميات السوط لأنواع مختلفة من طفيليـات الليشمانيا وجود معقد مستضدي مشترك بينهما يراوح وزنه الجزيئي بين 60–67 كيلـو دالتون (Etages *et al.*, 1985)، يتوضع على سـطح الطفيلـي وفـي قمـة الـسوط (Vinayak *et al.*, 1991)، ويؤدي دوراً مهماً في ارتباط أماميات السوط على سـطح البالعات الكبيرة (Russell *et al.*, 1988) . يعد هذا المستضد مـسؤولاً عـن الفوعـة والإخماجيـة (Sacks DL *et al.*, 1985, Kweider *et al.*, 1987, 1989)، وهـذا يتوافق مع نتائجنا الخاصة بالتبصيم المناعي لطور أمامية الـسوط لليـشمانيا الداريـة المعزولة محلياً.

أشارت كثير من الدراسات إلى وجود المعقد الغشائي الـذي يعـرف بـ PSA-2، والمكون من ثلاثة مستضدات أوزانها الجزيئية بحدود 50 و80 و90 كيلو دالتون، بشكل رئيسي في طور أماميات السوط. يؤدي هذا المعقد دوراً كبيراً في الفوعـة والإخماجيـة وفي توليد استجابة مناعية وقائية تجاه الليشمانيا الكبـرى (Handman *et al.*, 1995, Willy *et al.*, 2004). ركزت بعض الدراسات على المستضد M2 ذي الوزن الجزيئي 46 كيلو دالتون الذي ينتمي لعائلة المعقد PSA -2 والذي يعد من أبرز مستضدات الطور أمامي السوط لليشمانيا الأمازونية، ويتمتـع باسـتمناعية عاليـة (Champsi J *et al.*,

(1988, McMahon *et al.*, 1993). أشارت دراسات أخرى على الليشمانيا الكبرى إلى دور المستضد الغشائي ذي الوزن الجزيئي 36 كيلو دالتون في تحفيز استجابة مناعية وقائية تجاه الخمج بهذا النوع من الليشمانيا (Gurunathan *et al.*, 1997). كما أظهرت نتائج التبصيم المناعي تفاعل الأضداد الموجودة في أمصال مصابين بالليشمانيا الحشوية بشكل شديد مع المستضدات الليشمانية الدونوفانية ذات الأوزان 70 و65 و50 و36 كيلو دالتون (Promond Kumar *et al.*, 2002). وهذه النتائج تتوافق مع نتائج دراستنا التي أجريت على الليشمانيا المدارية، وبينت وجود مستضدات ذات أوزان جزيئية مماثلة.

أما في مجال دراسة مستضدات طور عديمة السوط فإن الدراسات السابقة التي أجريت على الليشمانيا البيفانوية *L. pifanoi*، بينت وجود ثلاثة مستضدات رئيسة هي: المستضد P2 (A2) وهو بروتين داخل خلوي يحوي مجالاً يتألف من تكرارات لتتالي مكون من 10 حموض أمينية، وبناء على عدد هذه التكرارات فإن وزنه الجزيئي يتراوح بين 45 و100 كيلو دالتون (Zhang *et al.*, 1996). يؤدي هذا البروتين دوراً فعالاً في توليد الاستجابة المناعية تجاه الخمج بالليشمانيا الجلدية (Soong L., 1995, Maasho *et al.*, 2003, Nylen *et al.*, 2003). يسهم المستضد الثاني P4 الذي يتراوح وزنه الجزيئي بين 33–35 كيلو دالتون أيضاً في توليد الاستجابة المناعية (Soong L *et al.*,1995, Coutinho S G *et al.*, 1996). أما المستضد الثالث P8 فيوجد على سطح عديمات السوط ويتألف من معقدين الأول بوزن 31 كيلو دالتون والثاني بوزن 56 كيلو دالتون، وهو المكون الأكثر استمناعي، فقد أعطى نتائج واعدة في تجارب التمنيع (Soong L *et al.*, 1995, Coutinho S G *et al.*, 1996, Clomenares *et al.*, 2001, Maasho *et al.*, 2003). وبمقارنة هذه البحوث بالنتائج التي حصلنا عليها بالتبصيم المناعي، يتضح وجود مستضدات خاصة بالطور عديمة السوط في سلالة الليشمانيا المدارية المحلية تتوافق أوزانها الجزيئية مع معظم المستضدات المدروسة في الأنواع الأخرى للليشمانيا.

يعتقد أن للمستضدات المشتركة بين طوري الليشمانيا دوراً في آليات ارتباط الطفيلي ودخوله إلى البالعات الكبيرة، فضلاً عن دورها في الفوعة، بينما يكون للبروتينات الخاصة بالطور عديمة السوط دوراً في بقاء الطفيلي حياً داخل الوسط الحمضي للبالعات الكبيرة وفي مقاومة الوسائط التأكسدية الفعالة، كما تعد أيضاً مسؤولة عن الإمراضية وعن الأعراض المصاحبة للمرض. ويبدو أن الجينات المرمزة لهذه البروتينات يتم تحفيزها تجريبياً ضمن شروط مماثلة للوسط داخل البالعات الكبيرة من حيث قيمة الـpH الحامضية ودرجة حرارة المضيف الفقاري. تشير نتائج هذه الدراسة إلى أهمية المستضدات الرئيسة التي تم تحديدها في كلا طوري الليشمانيا المدارية، لذلك نرى أنه من المفيد استفراد تلك المستضدات ودراسة دورها في توليد استجابة مناعية فعالة، وانتقاء المستضدات الأكثر استمناعية بغية استخدامها في أغراض وقائية أو تشخيصية.

REFERENCES المراجع

1. Beetham J. K, Donelson J. E, and Dahlin R. R. (2003). Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short-and long-term culture of leishmania chagasi. Mol Biochem Parasitol 131(2): 109-117.
2. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
3. Champsi J and McMahon-Pratt. (1988). Membrane glycoprotein M-2 protects against leishmania amazonensis infection. Infect. Immun.56:3272-3279.
4. Clomenares M, Tiemeyer M, Kima P, and McMahon-Pratt D. (2001). Biochemical and biological characterization of the protective leishmania pifanoi amastigote antigen P-8. Infection and Immunity. 69(11):6776-6784.
5. Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonca SC, Bertho AL, Soong L. and McMahon-Pratt D. (1996). T- cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified leishmania pifanoi amastigote antigens and leishmania braziliensis promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. Exp Parasitol. 84(2):144-55.
6. Etges R. J., Hoffman R. and Bordier C. (1985). Evidence that the major surface proteins of three Leishmania speices are structurally related. Mol. Biochem. parasitol. 14:141-149.
7. Grimaldi, G., Jr. and R. B. Tesh. (1993). Leishmaniases of the new world: current concepts and implications for future research. Clin. Micribiol. Rev. 6:230-250.
8. Gurunathan S., D. L. Sacks, D. R. Brown, S.L. Reiner, H. Charest, N. Glaichenhaus, and R. A. Seder. (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with leishmania major. J. Exp. Med. 186:1137-1147.
9. Handman E, Osborn A. H, Symons F, Van Driel R. and Cappai R. (1995). The leishmania promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. Mol. Biochem. Parasitol. 74(2):189-200.
10. Handman E, Symons F. M, Baldwin T. M, Curtis J. M and Sacheerlinck J. P. (1995). Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from leishmania major is mediated by a TH1 type of immune response. Infect. Immun. 63, No.11:4261-4267.
11. Klaus SN, Frankenburg S, and Ingber A. (1999). Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. Clin. Dermatol. 17:3:257-260.
12. Kweider M. Lemesre J. L. Darcy F. Kusnierz J. P. Capron A. and Santoro F. (1987). Infectivity of Leishmania braziliensis promastigotes is dependent on the increasing expression of 65000 dalton surface antigen. J. immunol. 138:299-305.
13. Kweider, J. L. Lemesre, F. Santoro, J. P. Kusnierz, M. Sadigursky and A.Capron. (1989). Development of metacyclic Leishmania promastigotes is associated with the increasing expreasing of Gp65KDa as a major surface antigen. Parasite Immunol. 11(3):197-209.
14. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
15. Lincoln L. M, Ozaki M, Donelson J. E. and Beetham J. K. (2004). Genetic complementation of leishmania deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. Mol. Biochem. Parasitol. 137(1):185-189.

16. Maasho K, McMahoon-Pratt D, Raita J, Raud M, Britton S, Soong L, and Akuffo H. (2003). Evaluation of amastigote reactive cells in human cutaneous leishmaniasis caused by leishmania aethiopica. Clin. Exp. Immunol. 132(2):316-22.
17. McMahon-Pratt, D. D Rodriguez, J. R. Rodriguez, Y. Zhang, K. Manson. C. Bergman, L. Rivas, J. F.Rodriguez, K.L.Lohman, and N. H. Ruddle. (1993). Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against leishmania infection. Infect. Immun. 61:3351-3359.
18. Mottram JC, Brooks DR, and Coombs GH. (1988). Roles of cystein proteinases of trypanosomes and leishmania in host- parasite interactions. Curr opin. Microbiol. 1(4):455-60.
19. Nylen S, Maasho K, McMahon-Pratt, and Akuffo H. (2003). Leishmania amastigote antigen P-2 induces major histocompatibility complex class II-dependent natural killer-cell reactivity in cells from healthy donors. Scandinavian Journal of Immunology. 59 issue 3:294-304.
20. Promond Kumar, Kalpana Pai, Kiran Tripathi, and H. P. Pandey. (2002). Immunoblot analysis of the humoral immune response to leishmania donovani polypeptides in cases of human visceral leishmaniasis: its usefulness in prognosis. Clin. Diagn. Lab. Immumol. 9(5):1119-1123.
21. Russell D. G, and Wright S. D. (1988). Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg – Gly – Asp - containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of leishmania promastigotes. J. Exp. Med. 168(1):279-92.
22. Sacks D. L, Heiny S, and Sher A. (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between non-infective and infective development stages of leishmania major promastigotes. J. Immunol. 135:564-9.
23. Soong L, Duboise S. M, Kima P and McMahon-Pratt D. (1995). Leishmania pifanoi amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. Infect. Immun. 63, No.9 3559-3566.
24. Sujata Kar, Lynn Soong, Maria Clomenares, Karen Goldsmith-pestana and Diane McMahon - Pratt. (2000). The immunologically protective P-4 antigen of leishmania amastigotes a developmentally regulated single strand-specific nuclease associated with the endoplasmic reticulum. The journal of Biological Chemistry. 275:37789-37797.
25. Tracy Garnier and Simon L Croft. (2002). Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. Current Opinion in Investigational Drug. 3:4:1472-1478.
26. Vinayak V. K, Singla N, Dutt P, and Mahajan D. (1991). Isolation of the 66-Kilodalton polypeptide from promastigotes of leishmania donovani as a ligand molecule for binding to macrophages. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 44(3):109-21.
27. (WHO) world health organization (1990). Potential health effects of climate change, Geneva, Switzerland.
28. Willy K. Tonui, J. Santiago Mejia, Lisa Hochberg, M. Lamine Mbow, Jeffrey R. Ryan, Adeline S.T.Chan, Samuel K. Martin, and Richard G. Titus. (2004). Immunization with leishmania major exogenous antigens protects susceptible BALB/C mice against challenge infection with L. major. Infection and Immunity. 72, No. 10:5654-5661.
29. Zhang, W. W, H. Charest, E. Ghedin, and G. Matlashewski. (1996). Identification and overexpression of the A2 amastigote specific protein in leishmania donovani. Mol. Biochem. Parasitol. 78:79-90.