مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (2) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (2) 2014

دراسة تعبير المورثة KMP-11 في الليشمانيا المدارية *L. tropica* بطوريها أمامي وعديم السوط

مؤيد مرعي*
الدكتور شادي سكرية**
الدكتور عبد القادر عبادي***

(تاريخ الإيداع 21 / 11 / 2013. قبل للنشر في 23 / 4 / 2014)

ملخّص

يعد البروتين الغشائي لمنشأ الحركة-11 (KMP-11)، الموجود في جميع وحيدات الخلية ذات الأسواط المدروسة إلى الآن، مرشحاً محتملاً ليكون لقاحاً ضد داء الليشمانيات. إذ أن الجزيئة المرشحة لتكون لقاحاً مناسباً ضد داء الليشمانيات يجب أن يعبر عنها في عديمات السوط، الأشكال المخمجة للثدييات. إلا أن التعبير عن KMP-11 في عديمات السوط ما يزال موضع جدل. في هذه الدراسة، قمنا أولاً بعزل وزراعة وتنميط عينة من الليشمانيا المدارية *L. tropica*، ومن ثم قمنا بدراسة التعبير عن KMP-11 في أماميات السوط وفي عديمات السوط لطفيلي هذه السلالة بوساطة تقانة RT-PCR مستخدمين شفعاً من البادئات النوعية. أظهرت النتائج أن RNA الرسول للمورثة KMP-11 موجود في أماميات وعديمات السوط من الليشمانيا المدارية. يتوافق التعبير عن هذه الجزيئة في عديمات السوط مع قدرة الحماية المناعية التي أظهرها سابقاً لقاح DNA تجريبي يقوم على المورثة KMP-11، كما ويتوافق مع حدوث استجابة مناعية خلطية وخلوية الوساطة اتجاه البروتين KMP-11 في الحيوانات المصابة بالليشمانيا.

الكلمات المفتاحية: الليشمانيا المدارية، KMP-11، التعبير، عديمات السوط، أماميات السوط

* طالب دراسات عليا(ماجستير)- قسم علم الحياة الحيوانية- كلية العلوم- جامعة دمشق- دمشق سورية
** مدرس- قسم علم الحياة الحيوانية- كلية العلوم- جامعة دمشق- دمشق سورية
*** باحث رئيسي- قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية- هيئة الطاقة الذرية- دمشق- سورية

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (2) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (2) 2014

Studying the Expression of KMP-11 Gene in Promastigotes and Amastigotes of Leishmania Tropica

Moaid Mary[*]
Dr. Abed Al-Qader Abbady[**]
Dr. Chadi Soukkarieh[*]

(Received 21 / 11 / 2013. Accepted 23 / 4 /2014)

□ ABSTRACT □

Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11), a protein present in all kinetoplastid protozoa studied up to date, is considered a potential vaccine candidate for Leishmaniasis. Such vaccine molecules must be expressed in amastigotes which represent the infective forms for mammals, while promastigotes are the flagellate forms found in the insect hosts. However, the expression of KMP-11 in amastigotes is still a subject of controversy. In this study, a strain of *L. tropica* was isolated, cultivated, and genotyped. The expression of KMP-11 gene in this strain was evaluated in promastigotes and in amastigotes by RT-PCR using specific primer pairs. The results proved the presence of mRNA of KMP-11 in both promastigotes and amastigotes forms of *L. tropica*. The expression of this molecule in amastigotes is consistent with the previously demonstrated immunoprotective capacity of KMP-11 DNA vaccine as well as the presence of humoral and cellular immune responses against KMP-11 in Leishmania-infected animals.

Keywords: *Leishmania tropica*, KMP-11, expression, amastigotes, promastigotes

[*] **Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University**
[**] **Department of molecular Biology and Biotechnology, The Atomic Energy Commission**

مقدمة:

يعد داء الليشمانيات بأشكاله السريرية الثلاثة: الداء الجلدي والداء الجلدي المخاطي والداء الحشوي، واحداً من أكثر الأمراض الطفيلية الخمجية انتشاراً في العالم، حيث سجل وجوده في أربع قارات هي أمريكا وآسيا وأفريقيا وأوروبا، ويقدر عدد الاصابات السنوية به نحو 2 مليون حالة، لكن الوقائع تشير إلى أن هذا الرقم أقل من الحالات المسجلة فعلياً 1][. وبحسب منظمة الصحة العالمية (WHO) [2] فإن 90% من الإصابات بالداء الجلدي تتركز في أفغانستان وإيران والبرازيل والمملكة العربية السعودية والجمهورية العربية السورية. وتسجل حالياً أعداد متزايدة من الإصابات بداء الليشمانيا الجلدية في كافة المحافظات السورية، مما يجعل من هذا الداء مشكلة صحة عامة.

يسبب داء الليشمانيات ما يقرب من 20 نوعاً من طفيلي وحيد خلية ينتمي إلى جنس الليشمانيا، إذ يعد نوعا الليشمانيا المدارية *L. tropica* والليشمانيا الكبرى *L. major* المسببين الرئيسيين للداء الجلدي [3].

إن التنوع الكبير في وبائية داء الليشمانيات، يجعل من غير الممكن للعلاجات الكيميائية مهما كانت واسعة الطيف، أن تعالج الأشكال المختلفة للداء، ولكن يمكن أن يكون إنتاج لقاح فعال طريقة أفضل وأشمل لتأمين الحماية من الإصابة بداء الليشمانيات 3][. اقترحت عدة لقاحات تجريبية تؤمن الدور الفعال في الحماية من الإصابة بهذا الداء، وهذه اللقاحات جمعت للتبسيط في جيلين؛ يضم الأول مجموعة من أشكال اللقاحات المؤلفة في معظمها من خلاصات خلوية كاملة أو مجزأة للأشكال أمامية السوط promastigotes، في حين يشمل الجيل الثاني على مجموعة من البروتينات المستخلصة أو المحضرة بطرائق البيولوجية الجزئية، بالإضافة إلى المورثات المرمزة لمجموعة من البروتينات ذات الأدوار المناعية [4]. حدد عدد من الجزيئات البروتينية لدى طفيلي الليشمانيا كلقاحات محتملة من الجيل الثاني، ومن هذه الجزيئات البروتين الغشائي لمنشئ الحركة−11 kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) [5].

اكتشف البروتين KMP-11 ضمن معقد بروتيني مرتبط بشدة إلى الليبوفوسفوغليكان Lipophosphoglycan (LPG)، المكون الرئيسي للجزيئات السطحية للأشكال أمامية السوط لطفيلي الليشمانيا [6]، حيث تبين أن استجابة الخلايا التائية التي لوحظت نحو الخلاصات المحضرة من الليبوفوسفوغليكان تعود في الحقيقة إلى البروتينات المرتبطة بهذه الجزيئات والتي كانت تعد كملوثات لهذه الخلاصات [7]. حددت فيما بعد هوية هذه الملوثات وتبين أن البروتين KMP-11 هو أحد البروتينات الذي يمكن وصفه بالبروتين المرتبط بالليبوفوسفوغليكان [8]، إذ بينت الدراسات قدرته على استثارة الخلايا التائية الفأرية والبشرية [8، 9]. سمي هذا البروتين بالبروتين الغشائي لمنشأ الحركة KMP-11 نظراً لوجوده على أغشية جميع الأوليات المسوطة kinetoplastid protozoa المدروسة ولوزنه الجزيئي المساوي لـ 11 kDa.

أهمية البحث وأهدافه:

مازال التعبير عن هذا البروتين ودوره المناعي في أنواع طفيليات الليشمانيا المسببة للداء الجلدي مجهولاً إلى حدٍ بعيد، إذ لا توجد حتى الآن أية دراسات تتحرى عن التعبير عن المورثة KMP-11 في طفيلي الليشمانيا المدارية *L. tropica* المسبب الرئيس للداء الجلدي في كثير من أنحاء العالم وفي سوريا بشكلٍ خاص. يهدف هذا البحث إلى دراسة التعبير عن البروتين KMP-11، في سلالة من الليشمانيا المدارية *L. tropica* المسببة للداء الجلدي والمعزولة

محلياً، في كلا طوري النمو أمامي وعديم السوط باستخدام تقانة RT-PCR ومرئسات نوعية صممت لكشف mRNA الذي تنتجه المورثة.

طرائق البحث ومواده:

1-الحصول على الطفيليات

عزل الطفيلي من مكان الإصابة مباشرة لأشخاص مراجعين لمشفى الأمراض الجلدية بجامعة دمشق بعد التأكد من إصابتهم بالليشمانيا الجلدية من خلال إجراء الفحص المجهري المباشر بتلوين لطاخة مرفوعة من مكان الإصابة بملون غيمزا.

2-الاستنبات

استنبتت هذه الطفيليات على الوسط نصف الصلب .N.N.N والمضاف له صادان حيويان penicillin و streptomycin (Cytogen) بتركيز 100 U/ml، حيث حضنت الزروع عند درجة حرارة 26 مئوية. تمت مراقبة الزروع يومياً بالفحص المجهري من أجل رؤية الأشكال أمامية السوط. عند ظهور هذه الأشكال بأعداد مناسبة في وسط الزرع تم نقل الطفيليات إلى وسط زرع سائل RPMI-1640 (Sigma) المدعم بـ10 % من مصل البقر الجنيني FCS (Sigma) والذي عطلت متممته بالتسخين لمدة نصف ساعة عند درجة حرارة 56 مْ، وتمت مراقبتها بالفحص المجهري وعدها بشكلٍ يومي حتى بلوغ الطفيليات طور الاستتباب وهو الطور الذي يحوي بشكلٍ رئيسي أماميات السوط عالية الإخماجية، التي استعملت في التجارب اللاحقة.

3-تحضير عديمات السوط

حضرت عديمات السوط باستنبات الطفيليات أمامية السوط المأخوذة من طور الاستتباب عند درجة حرارة 37 مئوية، وتم فحصها بالمجهر المقلوب (OPTIKA) يومياً من أجل مراقبة ظهور الأشكال البيضوية عديمة السوط.

4-استفراد DNA

تبدأ هذه الطريقة باستخلاص DNA الكلي من كمية من الطفيلي، حيث يثفل 1 مل من وسط الزرع السائل الحاوي 10^6 طفيلي باستخدام مثفلة مبردة Hettich Universal 320R بسرعة دوران 4000 دورة/الدقيقة، عند درجة حرارة +4 مْ، مدة 10 دقائق. يزال السائل الطافي وتغسل الرسابة الطفيلية مرتين بدارئة ملحية فوسفاتية Phosphate buffered saline (PBS) بدرجة +4 مْ للتخلص من بقايا وسط الزرع والمصل. تم استخلاص DNA من خلايا الطفيلي باستخدام أعمدة كروماتوغرافيا مكروية تحوي على غشاء من السيليكا رابط لـDNA (شركة MN الألمانية). وقد تم إتباع الخطوات العامة للاستخلاص المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة. عندما يشطف DNA المرتبط على الغشاء بالماء المقطر الدافئ، ويجمع في أنابيب ابندورف، يحفظ عند الدرجة – 20 مْ.

5- استفراد RNA من الطورين أمامي السوط عديم السوط

جمعت طفيليات الليشمانيا أمامية السوط المستنبتة في الوسط السائل من مرحلة الاستتباب وكذلك الطفيليات عديمة السوط في أنبوبين بحجم مقداره 8 مل لكل منهما وتم تثفيل كل من الأنبوبين لمدة 10 دقائق لأعلى سرعة عند درجة حرارة +4 مْ، بعد ذلك تم التخلص من السائل الطافي، وعمد إلى استفراد RNA الكلي باستخدام طاقم خاص

Invisorb spin tissue RNA mini kit (Invitek). وضعت الرسابة في أنبوب 2 مل وأضيف لها 10 قطع من الكرات الزجاجية الصغيرة و600 مكل من محلول Dithiothreitol (DDT) رج الأنبوب لمدة دقيقة، ثم ثفل لأعلى سرعة مدة 2 دقيقة، ثم أخذ 500 مكل من السائل الطافي في أنبوب جديد حجمه 2 مل وأضيف لها 330 مكل من الإيتانول المطلق ومزجت باستخدام الميكروبيبيت، ينقل المزيج إلى عمود كروماتوغرافيا مكروي ويحضن لمدة 1 دقيقة في درجة حرارة المختبر، ثم يثفل على 8000 دورة/الدقيقة، ويغسل عدد من المرات بوساطة عدد من محاليل الغسل ومن ثم يحضن العمود مع كمية مناسبة من DNase ويشطف RNA بدارئة خاصة ويتم التأكد من نتائج استفراد RNA بإجراء رحلان كهربائي على هلامة من الأغاروز، وقدر تركيزه ونقاوته بقياس الامتصاصية على طول الموجتين 260 nm و280 nm في مجال الطيف فوق البنفسجي لمقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer T80. يجمد بعدها RNA عند الدرجة − 70 مْ.

6- الرحلان الكهربائي

تم التأكد من نتائج استفراد DNA وRNA الكلي بتقنية الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة أغاروز (Promega) بتركيز 0.8 % و 1.5 % (على الترتيب) في دارئة الرحلان TBE باستخدام جهاز رحلان (PeQlab)، وأضيف الاتيديوم بروماید إلى الهلامة قبل تصلبها بتركيز نهائي قدره 0.5µg/ml. مزجت العينات بدارئة تحميل العينة Loading Buffer بتركيز 6X (Promega)، ورحلت العينات وواسمات الأطوال المعيارية مختلفة المصدر Fast DNA Ladder و 2-log DNA ladder (Biolabs) بالإضافة إلى 100bp DNA ladder (Promega) بتطبيق تيار كهربائي قدره 100 فولت لمدة 30 دقيقة. وكشفت عصائب DNA باستخدام منبع أشعة فوق بنفسجية قصيرة الموجة 230 nm (Cleaver)، ووثقت الهلامة باستخدام جهاز موثق الهلام Gel documentation (Cleaver) مزود بآلة تصوير رقمية ذات مرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية.

7- تحويل RNA إلى cDNA

وذلك باستعمال مزيج من المرئسات العشوائية random primer لطقم First strand cDNA synthesis kit (Fermentas)، إذ يضاف 1 مكل منه إلى 10 مكل من RNA المستفرد ويحضن المزيج لمدة 5 دقائق على درجة حرارة 65 مْ ثم ينقل الأنبوب إلى الثلج مباشرة ونتركه لمدة 2 دقيقة ليتم التخلص من البنى الثانوية في RNA، ثم يضاف أنزيم النسخ العكسي مع الدارئة المناسبة وdNTPs وبعدها يحضن المزيج على التوالي مدة 5 دقائق عند درجة حرارة 25 مئوية، ثم مدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 40 مْ، ثم لمدة 5 دقائق تسخين بالدرجة 70 مْ.

8- التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR

أُجري نوعان من تفاعلات PCR،.

هدف الأول إلى تحديد نوع الطفيلي باستخدام المرئستين Primers CSB2xF:
5`CGAGTAGCAGAACTCCCGTTCA3` و CSB1xR:
5`ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG3` [10] بالإضافة إلى DNA مستخلص من سلالة مرجعية *L. tropica* مأخوذة من بنك مرجعي مونبلييه–فرنسا، بينما هدف التفاعل الثاني إلى كشف وجود mRNA للمورثة KMP-11 باستخدام مرئستين نوعيتين للمورثة، مصممتين وفق التسلسلات المأخوذة من البنوك الجينية (GenBank: AJ000078.1) KMP-F: 5'GAGGAGTTTTCGGCGAAGCT3' و KMP-R:
5'CTTCAAGCAGAAGTTCGCCG 3'، بالإضافة إلى cDNA. أنجزت تفاعلات PCR باستخدام جهاز

مدور حراري Thermocycler (PeQlab) وأنزيم Go Taq DNA Polymerase (Promega). تم اصطناع المرئسات المختلفة من قبل شركة Alpha DNA الكندية.

حضر حجم نهائي قدره 25µl لكل تفاعل PCR يحوي على دارئة خاصة بالأنزيم بتركيز 1X و1.5mM من $MgCl_2$ و0.2mM من كل نكليوتيد ثلاثي الفوسفات منزوع الأكسجين dNTPs (Promega) و25 pmol من كل بادئة و1.25U من أنزيم Taq بوليميراز (Promega) و 200 ng من DNA. تمت برمجة جهاز PCR لينجز 35 دورة تتألف كل منها من ثلاث مراحل مدة كل منها 30 ثانية. تم التسخين في المرحلة الأولى إلى الدرجة 95 مْ، وفي الثانية إلى الدرجة 56 مْ لمرئسات التنميط و60 مْ لمرئسات التحري عن mRNA المورثة، وفي الثالثة إلى الدرجة 72 مْ. ولتحليل نواتج تفاعل PCR رحلت العينات على هلامة أغاروز بتركيز 1.5%.

النتائج والمناقشة:

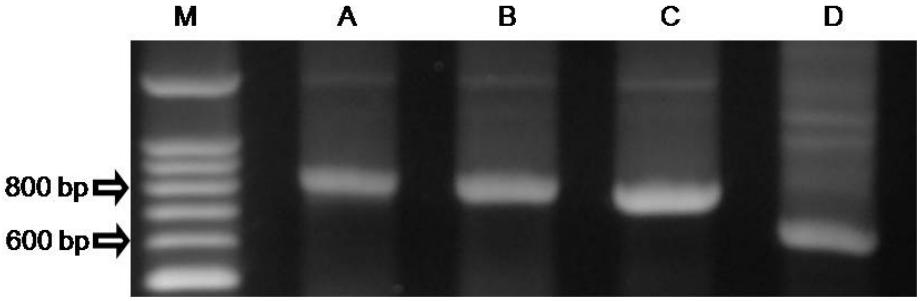
النتائج:

استنبات الطفيليات

استنبتت الطفيليات أمامية السوط وفقاً للطريقة المذكورة في مواد البحث وطرائقه، وحضرت عديمات السوط بحضن هذه الطفيليات عند درجة حرارة 37 مْ. ضمن هذه الشروط تبدأ الأشكال أمامية السوط بالتحول إلى الشكل البيضوي مع تناقص تدريجي في حركتها وابتداءً من اليوم الثالث تقريباً تصبح لهذه الطفيليات أشكال بيضوية عديمة السوط نموذجية.

تحديد نوع طفيلي الليشمانيا بوساطة تفاعل PCR

جمعت الطفيليات من وسط الزرع بالتثفيل واستخلص DNA من الرسابة الطفيلية ورحل على هلامة الأغاروز حيث تبين وجود عصابة واحدة بطول يفوق 10 kb تشير إلى جودة الاستفراد (النتيجة غير معروضة). استخدم DNA المستفرد لتحديد نوع الطفيلي بتقنية PCR وبوجود شفع المرئسات (CSB1XR/CSB2XF) الذي يضخم شدفة بطول حوالي 600 شفع من الأسس في النوع *L. major* وحوالي 800 شفع من الأسس في النوع *L. tropica*. أظهرت السلالة المدروسة بعد عملية الرحلان الكهربائي على الهلام عصابة بطول 800 شفعاً من الأسس، وبمقارنة طول هذه الشدفة مع طول الشدفة المميزة للسلالة المرجعية (الشكل 1)، نستنتج أن السلالة المنمطة تنتمي لنوع الليشمانيا *L. tropica*.

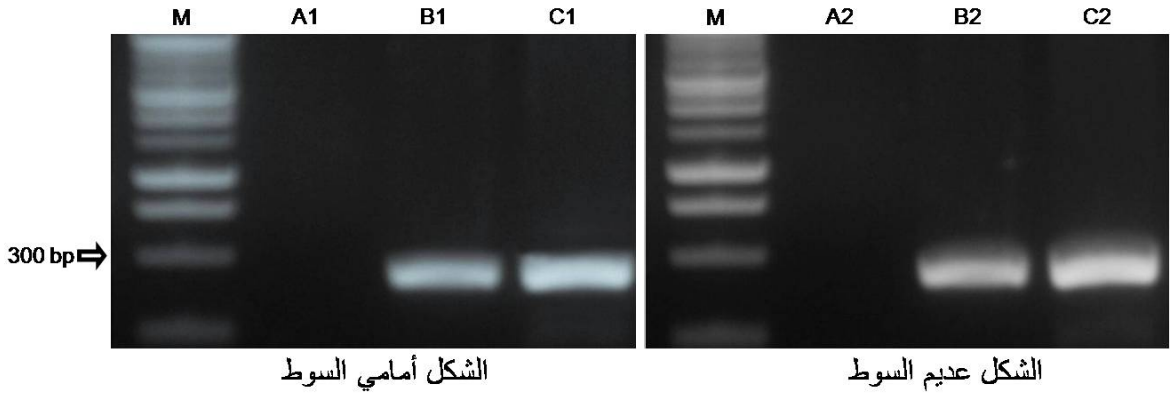


الشكل 1. نتائج تنميط السلالة المدروسة باستخدام تفاعل PCR

يمثل العمودان A و B ناتج تضخيم عينات DNA للسلالة المدروسة باستخدام المرئسات النوعية الخاصة بالتنميط ومن الملاحظ وجود عصابة بطول يقارب 800bp. يمثل العمود C ناتج تضخيم عينية DNA المستفرد من السلالة المرجعية *L. tropica* (عصابة بطول يقارب 800bp) والعمود D ناتج تضخيم عينية DNA المستفرد من السلالة المرجعية *L. major* (عصابة بطول يقارب 600bp). العمود M، واسمات أطوال معيارية DNA Ladder.

الكشف عن mRNA مورثة KMP-11 في أماميات وعديمات سوط بوساطة RT-PCR

بعد أن تم الحصول على RNA من كلا الطورين تم التأكد من جودة الاستفراد بالاعتماد على الرحلان الكهربائي على هلامة من الأغاروز حيث أظهرت العصائب المميزة للأنماط المختلفة للـ rRNA مما يدل على جودة الاستخلاص وعدم تدرك RNA أثناء التحضير (النتيجة غير معروضة). بعد أن حول RNA المستفرد من أماميات ومن عديمات السوط إلى cDNA باستخدام أنزيم النسخ العكسي ومجموعة من المرئسات العشوائية بحسب ما ذكر في الطرائق، أجري تفاعل PCR على cDNA المحضر باستخدام المرئسات النوعية للجين KMP-11 كما استعمل DNA المستفرد كشاهد ايجابي و RNA المستفرد كشاهد سلبي بهدف إظهار نقاوته وخلوه من أي تلوث بـ DNA الجينومي. رحلت النتائج على هلامة الأغاروز بتركيز 1.5 %. يظهر الشكل 2 وجود عصابة بطول يقارب 200 bp في كل من مسار البئر الحاوي نتائج التفاعل على cDNA وكذلك الحاوي على نتائج تفاعل الشاهد الايجابي مما يدل على أن المورثة تعبر عن نفسها في كلا طوري نمو الليشمانيا المدارية. في حين أن التفاعل المجرى على RNA المستفرد من الطورين سلبي مما يدل على نقاوة RNA المحضر وعدم تلوثة بـ DNA الجينومي.



الشكل 2. الرحلان الكهربائي لنواتج RT-PCR يكشف التعبير عن mRNA مورثة KMP-11 في طوري نمو طفيلي الليشمانيا: أمامي وعديم السوط

العمودان A1 و A2 نواتج PCR المنجز على RNA المستفرد من سلالة الليشمانيا (شاهد سلبي)، العمودان B1 و B2 نواتج PCR المنجز على cDNA كقالب، العمودان C1 و C2 نواتج PCR المنجز على DNA (شاهد ايجابي). العمود M واسمات أطوال معيارية DNA Ladder.

المناقشة:

تم في هذا البحث عزل واستنبات سلالة من طفيلي الليشمانيا المسبب للداء الجلدي من أحد المرضى المراجعين لمشفى الأمراض الجلدية في دمشق، تبين بنتيجة تنميط هذه السلالة باستخدام تقانة PCR وبالمقارنة مع سلالة مرجعية أن الطفيلي ينتمي لنوع الليشمانيا المدارية *L. tropica*، ومن ثم درس تعبير المورثة KMP-11 في هذه السلالة، حيث وتم إثبات أن هذه المورثة تعبر عن نفسها في كلا طوري نمو الطفيلي المستنبت: أمامي السوط المأخوذ من طور الاستتباب (الطور المخمج للإنسان) وعديم السوط المحضر بالحرارة، حيث كشف عن mRNA الناتج عن هذه المورثة في كلا الطورين بعد تحويله إلى cDNA بوساطة تقانة RT- PCR.

لقد أثبتت العديد من الدراسات امتلاك جينوم الأنواع المدروسة من وحيدات الخلية المسوطة والتابعة لجنسي التريبانوزوما والليشمانيا، للمورثة المرمز للبروتين الغشائي KMP-11 فيما تباينت نتائج الدراسات التي اهتمت بتعبير هذه المورثة خاصة بين أطوار نمو الأنواع المختلفة لطفيلي الليشمانيا. لقد كشفت أول هذه الدراسات عن وجود البروتين KMP-11 مرتبط بشدة إلى جزيئات LPG في خلاصة الأغشية الخلوية المحضرة من طوري نمو النوع *L. donovani* أمامي السوط وعديم السوط، وهو أحد الأنواع المسببة للداء الحشوي [2]. بينما بينت دراسة [9] التي أجريت على النوع *L. infantun* المسبب للداء الحشوي، معتمدة على تبصيم نورثرن باستخدام مسبار محضر ابتداءً من شدفة من DNA ناتجة عن تفاعل PCR على المنطقة المرمزة للجين KMP-11، وجود mRNA في الطور أمامي السوط وغيابه في الطور عديم السوط، كما أظهرت هذه الدراسة أن كمية هذا الـ mRNA تختلف باختلاف طور نمو أماميات السوط، إذ تقل كميته بشكلٍ ملموس عند انتقال الطفيلي المستنبت من طور النمو (اللوغارتمي) وهو الطور قليل الإخماجية بالنسبة للمضيف الفقاري إلى طور الاستتباب وهو الطور عالي الإخماجية للمضيف الفقاري.

في حين أظهرت دراسة حديثة [11] أجريت على النوع *L. amazonensis* المسبب للداء المخاطي نتائج مغايرة، إذ أُثبت باستخدام تقانة التبصيم المناعي (تبصيم وستيرن) أن المورثة KMP-11 تعبر عن نفسها في طوري نمو الطفيلي أمامي وعديم السوط. وبعكس نتائج الدراسة السابقة يتبين من خلال هذه الدراسة أن التعبير عن هذه

المورثة يزداد أثناء انتقال الطفيلي من طور النمو (اللوغارتمي) إلى طور الاستتباب كما يكون التعبير عنه في عديمات السوط أكثر من أماميات السوط. لقد أثبت في هذه الدراسة لأول مرة أن المورثة KMP-11 تعبر عن نفسها في كلا طوري نمو النوع *L. tropica* وهو المسبب الرئيس للداء الجلدي في سوريا، وإن كان ذلك على مستوى الناتج الأولي للمورثة (mRNA) حيث تعذر كشف البروتين بالطرق المناعية بسبب عدم توفر ضد تجاري يتعرف بشكل نوعي البروتين KMP-11. يمكن أن يعود الاختلاف بين نتائج دراستنا ونتائج دراسة [12] التي لم تلحظ تعبير عن المورثة في عديمات السوط، رغم أنها كشفت عن mRNA كما هي حال دراستنا، إلى اختلاف نوع الطفيلي المدروس. وبشكلٍ عام بمقارنة الدراسات السابقة فيما بينها وبمقارنتها بدراستنا يمكن افتراض أن اختلاف النتائج يعود لاختلاف نوع الطفيلي المدروس أو لاختلاف الطريقة المستخدمة لكشف التعبير عن هذه المورثة. يمكن الاشارة إلى أنه من الصعب ايجاد توافق بين نتائج دراسة [12] التي أظهرت أن المورثة KMP-11 لا يستمر في التعبير عن نفسه عند انتقال الطفيلي من الطور أمامي السوط إلى الطور عديم السوط، علماً أن هذا الطور هو السائد في المضيف الفقاري، إذ بينت نتائج دراسات سابقة وجود أضداد موجهة ضد هذا البروتين في مصل كلاب مصابة بالطفيلي من نوع *L. infantum* [12]، وفي مصل أشخاص مصابين بداء الليشمانيا الحشوية وتظهر عليهم أعراض الإصابة بالطفيلي وحتى في مصل أشخاص مصابين بالليشمانيا ولكن غير عرضيين [13]. كما أن هذه النتيجة لا تتوافق مع نتائج دراسة [9] التي بينت استجابة الخلايا التائية لهذا البروتين لدى الأشخاص المصابين بالداء الحشوي.

يمكن أن يشير التعبير عن المورثة KMP-11 في أماميات السوط المأخوذة من طور الاستتباب والمخمجة للمضيف الفقاري وفي عديمات السوط التي تعيد إخماج البالعات في هذا المضيف إلى الدور الذي يمكن أن يؤديه هذا البروتين في إخماج بالعات المضيف أو في مقاومة الحل ضمن فجوات البالعات وبالتالي في بقاء الطفيلي حياً في خلايا المضيف النهائي.

تأتي أهمية المورثة KMP-11 من نتائج بعض الدراسات التي استخدمته في استراتيجيات تلقيحية متنوعة حيث أعطى نتائج مشجعة جداً في إحداث استجابة مناعية من النمط المفيد، أدت إلى وقاية حيوانات التجربة من الإصابة عند إصابتها بأنواع الطفيلي المسبب للداء الحشوي. فقد أظهرت إحدى أول التجارب، التي استعملت المورثة KMP-11 لنوع *L.donovani* المسبب لداء الليشمانيا الحشوية كلقاح DNA في دراسة أجريت على الفئران، توليد استجابة مناعية خلوية من النمط Th1 وإنتاج الانترفيرون غاما بالإضافة إلى تحريض الخلايا التائية من النمط +CD8 على التمايز إلى CTL مما أنتج وقاية كاملة عند إخماج هذه الفئران تجريبياً بالطفيلي [5]، وتوافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة أخرى استخدم فيها KMP-11 كلقاح معد من خلايا هجينة تعبر عنه، ضد النوع *L.donovani* حيث أظهرت تمايز الخلايا التائية من النمط +CD8 إلى CTL بالإضافة إلى خفض مستوى الانترلوكين 10 مانعاً حدوث تثبيط لاستجابة مناعية من نمط Th1 وبالتالي حدوث استجابة مختلطة Th1/Th2 أدت إلى وقاية الفئران الممنعة من الإصابة بالطفيلي [14]. كما أن نتائج الدراسات الحديثة التي استخدمت KMP-11 كلقاح والتي نشرت هذا العام [15] تؤكد النتائج المشجعة المنشورة سابقاً. حيث يمكن أن يؤدي تمنيع الفئران والهامستر باستخدام فيروس يحمل في جينومه المورثة KMP-11 إلى حماية هذه الحيوانات من الاصابة بالداء الحشوي المحرض تجريبياً. ارتبطت هذه الحماية بتوليد استجابة مناعية قوية خلطية وخلوية الوساطة، وبإنتاج خلايا تائية من نمط CD8 متعددة الوظائف والتي تعد من أهم متطلبات اللقاح الناجح ضد الليشمانيا الحشوية، وترافق ذلك مع إنتاج مجموعة من السيتوكينات الفاعلة أهمها الانترفيرون غاما والانترلوكين−2 و TNF-α [16] كما أظهر استعمال البروتين KMP-11 المؤشب المحمل على

جزيئات مكروية من البوليستر قدرة على تحريض قتل طفيليات الليشمانيا داخل الخلوية عن طريق تفعيل استجابة مناعية طبيعية تمثلت في تحريض للبالعات الكبيرة وربما الأسيسات على التخلص من الطفيلي، وذلك بتفعيل مسارات عديدة منها مسارات إنتاج كميات كبيرة من أوكسيد النتريك، ومن فوق الأوكسيد ومن TNF-α. من كل هذه النتائج المشجعة تظهر أهمية KMP-11 كلقاح واعد إذا ما استخدم في استراتيجيات تلقيحية مختلفة بشكله المورثي أو البروتيني ضد الداء الحشوي.

الاستنتاجات والتوصيات:

تم التوصل في هذه الدراسة إلى إثبات أن المورثة KMP-11 تعبر عن نفسها في طفيلي الليشمانيا من النوع *L. tropica*، وذلك في كلا طوري النمو أمامي السوط وعديم السوط. وفي غياب الدراسات عن الدور الذي يمكن أن يؤديه KMP-11 كلقاح ضد الأنواع المسببة لداء الجلدي كالنوع *L. tropica* الذي بات المسبب الرئيس لداء الليشمانيات في سوريا، تبقى الأفاق مفتوحة لتحضيره بطرق مختلفة يمكن معها استخدامه في استراتيجيات تلقيحية ضد داء الليشمانيات الجلدية.

المراجع:

[1] Croft, S. L., Sundar, S. and Fairlamb, A. H. *Drug resistance in leishmaniasis*. Clin Microbiol Rev, 19, 1 , 2006, 111-126.

[2] WHO, W. H. O. *Technical Report Series Control of the Leishmaniasis* : Report of WHO Expert Committee, 1990, 158.

[3] Desjeux, P. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 27, 5 , 2004, 305-318.

[4] Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F. and Modabber, F. *Leishmaniasis vaccine candidates for development* :a global overview. Indian J Med Res, 123, 3, 2006, 423-438.

[5] Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T. and Roy, S. *Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of Leishmania donovani that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis*. J Immunol, 174, 11, 2005, 7160-7171.

[6] King, D. L., Chang, Y. D. and Turco, S. J. *Cell surface lipophosphoglycan of Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 24, 1, 1987, 47-53.

[7] Mendonca, S. C., Russell, D. G. and Coutinho, S. G. *Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of Leishmania: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63)*. Clin Exp Immunol, 83, 3 ,1991, 472-478.

[8] Jardim, A., Funk, V., Caprioli, R. M. and Olafson, R. W. *Isolation and structural characterization of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein*. Biochem J, 305, 11995, 307-313.

[9] Russo, D. M., Turco, S. J., Burns, J. M., Jr. and Reed, S. G. *Stimulation of human T lymphocytes by Leishmania lipophosphoglycan-associated proteins*. J Immunol, 148, 1 (Jan 1 1992), 202-207.

[10] Noyes, H. A., Chance, M. L., Croan, D. G. and Ellis, J. T. *Leishmania (sauroleishmania): a comment on classification*. Parasitol Today, 14, 4, 1998, 167.

[11] Matos, D. C., Faccioli, L. A., Cysne-Finkelstein, L., Luca, P. M., Corte-Real, S., Armoa, G. R., Lemes, E. M., Decote-Ricardo, D. and Mendonca, S. C. *Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of Leishmania amazonensis and its surface expression increases during metacyclogenesis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 105, 3, 2010, 341-347.

[12] Berberich, C., Machado, G., Morales, G., Carrillo, G., Jimenez-Ruiz, A. and Alonso, C. *The expression of the Leishmania infantum KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific*. Biochim Biophys Acta, 1442, 2-3, 1998, 230-237.

[13] Ramirez, J. R., Berberich, C., Jaramillo, A., Alonso, C. and Velez, I. V. *Molecular and antigenic characterization of the Leishmania (Viannia) panamensis kinetoplastid membrane protein-11*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 93, 2, 1998, 247-254.

[14] Basu, R., Bhaumik, S., Haldar, A. K., Naskar, K., De, T., Dana, S. K., Walden, P. and Roy, S. *Hybrid cell vaccination resolves Leishmania donovani infection by eliciting a strong CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response with concomitant suppression of interleukin-10 (IL-10) but not IL-4 or IL-13*. Infect Immun, 75, 12, 2007, 5956-5966.

[15] Santos, D. M., Carneiro, M. W., de Moura, T. R., Soto, M., Luz, N. F., Prates ،D. B., Irache, J. M., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M., Espuelas, S., Borges, V. M. and de Oliveira, C. I. *PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of Leishmania. Nanomedicine*, 9, 7, 2013, 985-995.

[16] Guha, R., Das, S., Ghosh, J., Naskar, K., Mandala, A., Sundar, S., Dujardin, J. C. and Roy, S. *Heterologous priming-boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of Leishmania (Leishmania) donovani*. Vaccine, 31, 15, 2013, 1905-1915.