

Review article

Development of *Leishmania* Parasite in Interaction with Sand Fly Vectors of Leishmaniasis

Nasibeh Hosseini-Vasoukolaei^{1*}Fatemeh Jafari²

- 1- Assistant Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, Faculty of Health, Health Science Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
- 2- MSc Student, Department of Medical Entomology and Vector Control, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

***Corresponding author:** Nasibeh Hosseini-Vasoukolaei, Department of Medical Entomology and Vector Control, Health Science Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Email: nasibeh.hoseini@gmail.com

Received: 23 July 2018

Accepted: 24 September 2018

ABSTRACT

Introduction and purpose: Leishmaniasis are neglected diseases that are endemic in more than half of the provinces of Iran. The causative agent of this disease is *Leishmania* protozoa and its transmission to human is through the bites of phlebotomine sand flies. This study reviews the growth and development of *Leishmania* in the body of sand flies at the molecular level.

Methods: In this study a narrative review was carried out. The corpus was collected by searching the keywords of *Leishmania*, sand fly, phlebotomus, lutzomyia in the databases of PubMed, Scopus, SID, Web of Science, Ovid Medline, and Google Scholar search engine. The studied articles were those which has been published on the interaction between the sand fly vectors and *Leishmania* parasite until 2018.

Results: The parasites grow when they encounter natural barriers in the body of the sand flies, including proteolytic enzymes, peritrophic membrane, excretion of the digestive system, and immune system in sand fly vectors. Attachment of *Leishmania* to sand fly digestive tract determines the ability of sand fly to support the development of parasite, which leads to the transmission of leishmaniasis.

Conclusion: Studies on the development and life cycle of *Leishmania* within the body of sand flies are of utmost importance due to the spread of leishmaniasis in Iran and the world, difficulty in their control, and lack of effective vaccine products against leishmaniasis. The findings of the current study aimed at identifying and enhancing the natural barriers to the development of *Leishmania* in sand fly vectors and introducing new strategies for the control of leishmaniasis.

Keywords: Immune system, Leishmania, Peritrophic membrane, Proteolytic enzymes, Sand fly

► **Citation:** Hosseini-Vasoukolaei N, Jafari F. Development of *Leishmania* Parasite in Interaction with Sand Fly Vectors of Leishmaniasis. Journal of Health Research in Community. Summer 2018;4(2): 68-77.

مقاله مروری

مروری بر رشد و نمو انگل لیشمانیا در تعامل با پشه خاکی های ناقل بیماری لیشمانیوز

چکیده

نصیبه حسینی واسوکلایی^{۱*}
فاطمه جعفری^۲

مقدمه و هدف: لیشمانیوز یکی از بیماری های فراموش شده ای است که در بیش از نیمی از استان های کشور آندمیک می باشد. عامل ایجاد کننده بیماری، پروتوزوئ های لیشمانیایی هستند و انتقال آلودگی به انسان توسط گزش پشه های خاکی فلبوتومینه می باشد. در این راستا، مطالعه حاضر در سطح مولکولی به بررسی رشد و نمو انگل در بدن پشه خاکی ناقل پرداخته است.

روش کار: در مطالعه حاضر که به روش مروری غیرنظام مند انجام شد، داده های منتشر شده با استفاده از کلمات کلیدی "لیشمانیا، پشه خاکی، فلبوتوموس و لوتزومیا" از پایگاه های اطلاعاتی PubMed، Scopus، SID، Web of Science، Ovid Medline و موتور جستجوگر Google Scholar جمع آوری شدند. در این پژوهش تمام مطالعات منتشر شده تا سال ۲۰۱۸ که مربوط به تعاملات بین پشه خاکی و انگل لیشمانیا بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: انگل برای رشد و نمو در بدن پشه خاکی به سدها و یا موانع طبیعی برخورد می کند که عبارت هستند از: آنزیم های پروتولیتیک، پرده اطراف غذا، دفع از دستگاه گوارش و سیستم ایمنی در ناقل. قابلیت اتصال انگل به دستگاه گوارش پشه خاکی تعیین کننده توانایی حمایت پشه خاکی از رشد و نمو انگل و در نتیجه انتقال عفونت می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به گسترش بیماری لیشمانیوز در ایران و جهان و کنترل دشوار بیماری و نیز اینکه تاکنون واکسن مؤثری علیه لیشمانیوز معرفی نشده است، پژوهش در ارتباط با رشد و نمو و چرخه زندگی انگل در بدن پشه خاکی حائز اهمیت می باشد. یافته های پژوهش حاضر در راستای شناسایی و تقویت موانع طبیعی رشد انگل در بدن پشه خاکی و روش های نوین مبارزه با لیشمانیوز می باشند.

کلمات کلیدی: آنزیم های گوارشی، پرده اطراف غذا، پشه خاکی، سیستم ایمنی، لیشمانیا

۱. استادیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، پژوهشکده اعتیاد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

* نویسنده مسئول: نصیبه حسینی واسوکلایی، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، پژوهشکده اعتیاد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

Email: nasibeh.hoseini@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۲

◀ **استناد:** حسینی واسوکلایی، نصیبه؛ جعفری، فاطمه. مروری بر رشد و نمو انگل لیشمانیا در تعامل با پشه خاکی های ناقل بیماری لیشمانیوز. مجله تحقیقات سلامت در جامعه، تابستان ۱۳۹۷؛ ۴(۲): ۷۷-۶۸.

مقدمه

جنس لیشمانیا (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) انگل های پروتوزایی هستند که طیف بیماری هایی مانند لیشمانیوز

را در میزبان مهره‌دار خود از جمله انسان ایجاد می‌کنند. حدود ۱۰ گونه لیشمانیا از اهمیت ویژه‌ای در سلامت عمومی برخوردار هستند. علائم لیشمانیازیس می‌تواند از ضایعات پوستی خفیف تا موارد احشایی کشنده باشد [۱]. عدم وجود یک واکسن انسانی، افزایش مقاومت به داروهایی که در حال حاضر استفاده می‌شوند و عوارض جانبی جدی نیاز به تحقیق در مورد لیشمانیوز را نشان می‌دهند. به‌طور خاص، مطالعات نه‌تنها بر روی انگل متمرکز هستند؛ بلکه باید بررسی تعاملات آن با میزبان و ناقلین را نیز بررسی نمایند.

انگل دارای یک چرخه زندگی انسانی است که در بین میزبان پستاندار و حشرات ناقل، پشه خاکی زیرخانواده فلبوتومینه (Diptera: Psychodidae) متناوب می‌باشد. انگل‌ها حشرات کوچکی (معمولاً ۱/۵ تا ۲ میلی‌متر طول بدن) هستند که به‌طور عمده در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری یافت می‌شوند [۲]. در خارج از بدن میزبان مهره‌دار، چرخه زندگی لیشمانیا محدود به دستگاه گوارش پشه خاکی می‌باشد. محل دقیق گذاردن چرخه زندگی انگل در دستگاه گوارش پشه خاکی بین دو زیرجنس انگل لیشمانیا و ویانیا (Viannia) متفاوت است. زیرجنس ویانیا در دنیای جدید؛ به‌عنوان مثال لیشمانیا برازیلینسیس (*Leishmania braziliensis*)، قبل از مهاجرت به معده میانی پشه خاکی (Midgut) به داخل معده عقبی (Hindgut) وارد می‌شود که این انگل را پری‌پیلارین (Peripylarian) می‌نامند. با این وجود، بیشتر گونه‌های زیرجنس لیشمانیا، انگل‌های سوپریلارین (Suprapylarian) هستند؛ زیرا رشد آن‌ها محدود به معده میانی و قسمت‌های جلویی دستگاه گوارش پشه خاکی می‌باشد [۳].

مرحله نمو انگل لیشمانیا در ناقلین زمانی آغاز می‌شود که پشه‌های خاکی ماده از میزبانی که دارای ماکروفاژهای آلوده به آماسیگوت می‌باشند، خون‌خواری می‌کنند. تغییر در شرایط محیطی از میزبان پستانداران به معده میانی پشه خاکی (مانند کاهش درجه حرارت و افزایش pH) باعث تغییرات مورفولوژیکی و رشد

انگل در ناقلین می‌شود. شایان ذکر است که فرم آماسیگوت به فرم پروماستیگوت - پروسیسیلیک تبدیل می‌شوند. این فرم‌ها اولین فرم‌های تکثیرشونده‌ای هستند که در خون خورده‌شده تکثیر می‌شوند و توسط غشای پروتروفیک نوع ۱ از دیواره اپیتلیال معده جدا می‌گردند. در سیکل زندگی خارج سلولی انگل لیشمانیا در بدن پشه خاکی فرم‌های پروسیکیلیک، نکتوموناد، لپتوموناد، هاپتوموناد و متاسیکیلیک مشاهده می‌شود که زمان متوسط جهت تکامل انگل‌ها به گونه آن‌ها و شرایط محیطی به‌ویژه درجه حرارت ۱-۲ هفته بستگی دارد [۴]. حدود ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد، تکثیر پارازیت‌ها کند می‌شود؛ اما تغییر شکل پیدا می‌کنند و به پروماستیگوت‌های نکتوموناد که بدنی کشیده دارند و متحرک‌هایی قوی می‌باشند، تبدیل می‌شوند [۴]. این نکتومونادها از غشای پری‌تروفیک به حفره سلولی معده میانی فرار می‌کنند. آن‌ها به سمت قدام دستگاه گوارش حرکت نموده و پس از آن به پروماستیگوت لپتوموناد تبدیل می‌شوند که بدنی کوتاه‌تر از نکتوموناد دارند [۵]. این نکتومونادها از غشای پری‌تروفیک به حفره سلولی معده میانی فرار می‌کنند. آن‌ها به سمت قدام دستگاه گوارش حرکت نموده و پس از آن به پروماستیگوت لپتوموناد تبدیل می‌شوند که بدنی کوتاه‌تر از نکتوموناد دارند. لپتومونادها نیز تکثیر می‌شوند [۶-۸]. جداسدن انگل از دیواره اپیتلیال معده، مهاجرت به سمت قسمت‌های جلویی لوله گوارش و قطعات دهانی و تجمع انگل در اطراف دریچه استومودیال (SV: Stomodaeal valve) برای انتقال مؤثر ضروری می‌باشد. در نهایت، انگل لیشمانیا به فرم آلوده‌کننده متاسیکیلیک عفونی تبدیل می‌شود و متاسیکلوژنز پایان می‌یابد و در طول تغذیه خون‌خواری بعدی به پوست میزبان مهره‌دار منتقل می‌شود [۹].

روش کار

در این مطالعه که به روش مروری غیرنظام‌مند (Narrative Review) انجام شد، با استفاده از کلیدواژه‌های "Sand fly"،

"Lutzomyia و Phlebotomus Interaction, Leishmania برای نشریات انگلیسی و کلیدواژه‌های "لیشمانیا، پشه خاکی، برهم کنش، فلبوتوموس و لوتزومیا" برای نشریات فارسی از طریق جستجو در پایگاه‌های علمی بین‌المللی شامل: PubMed، Web of Science، Elsevier، Scopus و Google Scholar و پایگاه‌های علمی داخلی شامل: سامانه دانش گستر برکت (Barakatks)، پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID)، کتابخانه پزشکی ایرانی (Medlib)، بانک اطلاعات نشریات کشور (Magiran) و مرجع دانش (Civilica) و جستجو در سایت سازمان جهانی بهداشت انجام شد. در نهایت تمام مقالات مجلات علمی منتشر شده تا سال ۲۰۱۸ به زبان فارسی و انگلیسی که در مورد انگل لیشمانیا، پشه‌های خاکی فلبوتوموس و لوتزومیا و تعاملات آن‌ها منتشر شده بود، جمع‌آوری گردید. شایان ذکر است که در فرایند بررسی و انتخاب مقالات، منابع و مقالات غیرمرتبط حذف شدند و نتایج مقالات مورد بررسی جمع‌بندی گردیدند.

یافته‌ها

طی چند روز اول پس از خون‌خواری آلوده، تعدادی سد یا مانع طبیعی برای رشد لیشمانیا در بدن پشه خاکی ناقل وجود دارد که این سدها شامل: آنزیم‌های پروتئولیتیک، غشای پری‌تروفیک در اطراف خون خورده‌شده و واکنش‌های ایمنی ذاتی در بدن پشه خاکی می‌باشند.

آنزیم‌های گوارشی

میزان ترشح آنزیم‌های گوارشی مانند پروتاز در معده میانی پشه‌های خاکی قبل از خون‌خواری کم می‌باشد. سطوح قابل توجهی از پروتازها شش ساعت پس از خون‌خواری (PBM: Post Blood Meal) تشخیص داده می‌شود و سطح پیک به ۱۸ تا ۴۸ ساعت PBM می‌رسد که این زمان به گونه پشه

خاکی بستگی دارد. pH مطلوب پروتازها در محدوده قلیایی است. براساس نتایج حاصل از آزمایشات می‌توان گفت که بیشتر آنزیم‌های پروتاز شامل آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین می‌باشند [۱۰]. اخیراً توالی ESTs کدکننده آنزیم‌های گوارشی در فلبوتوموس پاپاتاسی (*Phlebotomus papatasi*)، فلبوتوموس پرنیشوس (*P. perniciosus*) و لوتزومیا لانجیپالپس (*Lutzomyia longipalpis*) شناسایی شده است که بیشتر آن‌ها در واقع تریپسین و کیموتریپسین هستند [۱۵-۱۱].

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که در پشه‌های خاکی غیرناقل، در مرحله اولیه پس از خوردن خون آلوده به انگل که زمان بروز فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک است، انگل‌های خورده‌شده در مواجهه با این آنزیم‌ها تخریب شده و از بین می‌روند. علاوه بر این، مطالعات دیگر حاکی از آن هستند که حتی در پشه‌های ناقل بالای ۵۰ درصد، انگل‌های اماسیگوت خورده‌شده در روز اول پس از خون‌خواری کشته می‌شوند [۵].

چندین مطالعه که با استفاده از روش‌های مختلف فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک را در معده پشه خاکی سرکوب نموده‌اند، آنزیم‌های گوارشی را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سدها جهت از بین بردن انگل در معده میانی شناسایی کرده‌اند؛ به‌عنوان مثال در یکی از این مطالعات افزودن مهارکننده آنزیم‌های تریپسین به وعده غذایی خون، بقای لیشمانیا دونوانی (*L. donovan*) را در فلبوتوموس پاپاتاسی افزایش داد. در شرایط عادی، غشای پریتروفیک به‌عنوان یک سد دفاعی می‌باشد که مانع قرار گرفتن انگل‌ها در معرض آنزیم‌های گوارشی در مراحل اولیه عفونت می‌شود [۱۶، ۳].

اخیراً مکانیسمی که انگل‌ها به کار می‌برند تا بر فعالیت پروتئولیتیک معده تأثیر بگذارند، شناسایی شده است. در پژوهش حاضر مهارکننده‌های سرین پروتاز (ISP: Serine Protease Inhibitors) در لیشمانیا ماژور (*L. major*) یافت شد. با وجود نبود آنزیم‌های بالقوه در ژنوم انگل، ISP دارای اثرات مهارکننده

می‌گذارند و اهداف جذابی را برای استراتژی قطع انتقال بر مبنای ناقلین (Vector Based Transmission Blocking Strategy) نشان می‌دهند.

پرده اطراف غذا

پرده اطراف غذا یا غشای پری تروفیک در دستگاه گوارش پشه خاکی به عنوان یک سد در برابر رشد و نمو انگل لیثمانیا مطرح می‌باشد. غشای پری تروفیک یک غشای کیتینی خارج سلولی است که در بسیاری از حشرات حفره سلولی را از اپیتلیوم میدگات جدا می‌کند. این کیتین از پروتئین و گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده است. در راسته دیپترا زیر راسته نماتوسرا در پشه‌های خاکی ماده، PM نوع یک توسط اپیتلیوم میدگات در پاسخ مستقیم پس از خون‌خواری تشکیل می‌شود [۲۱]. ساختار غشای پری تروفیک پشه خاکی پیچیده است. طی چندین ساعت PBM، یک PM نازک به طور عمده حاوی رشته‌های کیتینی تشکیل می‌شود که سطح خونی را پوشش می‌دهد. در مراحل بعد طی حدود ۱۲ ساعت تا ۲ روز PBM (با توجه به گونه‌های پشه خاکی) ضخیم‌تر و بالغ می‌شود. پس از گذشت ۳-۲ روز PBM، به نظر می‌رسد که ساختار PM چروک خورده و شروع به پاره شدن می‌کند [۲۲، ۲۳]. در سطح مولکولی، پروتئین‌های گوناگون در شکل‌گیری PM و پاره شدن آن در پشه خاکی شناسایی شده است. نقش اصلی در پاره شدن PM از آن کیتیناز می‌باشد. شایان ذکر است که فعالیت کیتینولیتیک در پشه خاکی پس از مصرف خون در میدگات پس از ۴۸ ساعت PBM افزایش می‌یابد [۲۴].

مطالعات متعدد نقش دوگانه‌ای را برای PM پشه خاکی در مورد توسعه لیثمانیا نشان داده‌اند. PM از انگل‌ها در برابر حمله پروتئولیتیک در ابتدای هضم محافظت می‌کند و مانع فرار انگل تا زمان بالغ شدن آن می‌شود. پرده PM موجب ایجاد مانع در انتشار سریع آنزیم‌های گوارشی می‌گردد؛ در نتیجه مواجهه انگل با آنزیم‌های پروتئولیتیک در طول زمانی که به طور خاص

بر پروتئازهای سرین ماکروفاژ مهره‌داران مانند نوتروفیل الاستاز می‌باشد که در ارتباط با یکی از آن‌ها به نام ISP2 (ISP2)، (GeneDB: LmjF.15.0510) نشان داده شده است که برای افزایش میزان زنده ماندن انگل در ماکروفاژهای موش صحرایی، این مهارکننده افزایش یافته است [۱۷، ۱۸]. علاوه بر این، ISP فعالیت تریپسین را در معده پشه خاکی مهار می‌کند [۱۹].

باید خاطر نشان ساخت که انگل لیثمانیا دارای مکانیسم‌های مقاومتی در مقابل حمله پروتئولیتیک می‌باشد که حتی ممکن است نیازی به مهار آنزیم‌های پروتئولیتیک در ناحیه میگات پشه نداشته باشند. در پژوهشی در شرایط آزمایشگاهی انگل لیثمانیا ماژور را در مواجهه با لوله گوارش لیز شده استخراج شده از پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی که خون‌خواری کرده بود مورد بررسی قرار دادند. انگل‌هایی که به شکل آماسیگوت و پروماسیگوت کامل بودند، در برابر آنزیم‌های گوارشی مقاومت نمودند؛ اما در فرم‌های بینابینی بین تبدیل آماسیگوت به پروماسیگوت مقاوم نبودند و لیز شدند. نتایج حاصل از این مطالعات منجر به شناسایی مولکول‌هایی شده است که ممکن است در حفاظت از انگل در مقابل آسیب‌های پروتئولیتیک نقش داشته باشند. این حفاظت به طور ویژه بر عهده یک خانواده از گلیکوکونژوگات‌ها به نام فسفوگلیکان‌ها (PG) متمرکز شده است که دارای یک ساختار مشترک از واحدهای تکرارشونده [Gal-Man-PO4] می‌باشند. این مولکول‌های سطحی انگل لیثمانیا از طریق گلیکوزیل فسفات فسفاتیدیل اینوزیتول لیپید انکور از جمله لیپوفسفوگلیکان (LPG) و پروتئو فسفوگلیکان (PPG) به سطح سلول انگل متصل می‌شوند. پروتئین حاوی فسفوگلیکان‌ها شامل پروتئو فسفوگلیکان ترشح شده (PPGs) و اسید فسفاتازها نیز از این دسته مولکول‌ها می‌باشند. مولکول سطحی PPG در لیثمانیا ماژور به عنوان مولکول کلیدی باعث ایجاد مقاومت در پروماسیگوت‌های پروسیکلیک می‌شود [۲۰]. با توجه به مطالب گفته شده، آنزیم‌های پروتئولیتیک یکی از عوامل حیاتی هستند که بر رشد لیثمانیا در ناقلین تأثیر

آسیب‌پذیر هستند، محدود می‌شود [۲۵].

در مراحل بعد، PM به‌عنوان مانعی برای رشد و نمو انگل عمل می‌کند. نکتوموناد طولانی باید از فضای اندوتروفیک (Endoperitrophic) داخل PM فرار کند تا مانع انتقال و یا دفع همراه با باقی‌مانده‌های غذای هضم‌شده خون شود. از سوی دیگر، افزودن آلوزامیدین به‌عنوان مهارکننده کیتیناز به غذای خون‌آلود منجر به ضخیم‌شدن PM و تجمع لیشمانیا ماژور در فضای پری‌تروفیک گردیده و مانع توسعه بیشتر انگل در ناقلین طبیعی فلبوتوموس پاپاتاسی می‌شود. نتایج نشان می‌دهند که بخشی از PM که در میدگات سینه ترشح و تشکیل می‌شود، به‌عنوان مانع مهاجرت لیشمانیا به سمت قسمت‌های جلویی دستگاه گوارش و دریچه SV در پشه خاکی عمل می‌کند [۲۳].

فرار لیشمانیا از PM با یک کیتیناز انگلی انجام می‌شود. آنزیم کیتیناز لیشمانیا با حضور هموگلوبین مهار می‌گردد. انگل لیشمانیا از انتهای خلف PM باز در پایان هضم خون خورده‌شده فرار می‌کند. باید توجه داشت که پرده PM نقش مهمی در توسعه انگل دارد و پروتئین‌هایی که در تشکیل، بلوغ و تجزیه آن‌ها دخیل هستند، یک هدف امیدوارکننده برای واکسن‌های مسدودکننده انتقال می‌باشند [۲۶].

واکنش‌های ایمنی

واکنش‌های ایمنی نقش مهمی در کنترل عفونت‌های باکتریایی و انگلی در میدگات بند پایان ناقل دارند [۲۷]. در پشه‌های خاکی فاکتورهای ایمنی به نام دفسین (Defensin)، پپتیدهای ضد باکتریایی کاتیونی هستند که در چربی بدن و میدگات وجود دارند. در فلبوتوموس دوبوسکی (*P. duboscqi*) یک پپتید نوترکیب دفسین (Swiss-Prot: P83404) در نتیجه هر دو دسته عفونت‌های باکتریایی و انگلی لیشمانیا القا شده و این پپتید نوترکیب با فعالیت ضد انگلی به میزان قابل توجهی در برابر لیشمانیا ماژور ایجاد می‌گردد. فاکتورهای دیگری که در ایمنی ذاتی نقش دارند

عبارت هستند از: پروتئین غنی از گلیسین (Glycin-rich Protein) و سرین‌ها. علاوه‌براین، همولوگ‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان مولکول‌های تنظیم‌کننده ایمنی اپیتلیال معده میانی و مؤثر بر عفونت‌های باکتریایی و انگلی در پشه‌ها شناسایی شده‌اند [۲۸]. اخیراً در پژوهشی نشان داده شده است که در لوتزومیا لانجیپالپس، کاهش ترشح فاکتور ایمنی Caspar (GenBank: AM093416) یک تنظیم‌کننده منفی در کنترل سیستم ایمنی منجر به کاهش قابل توجه جمعیت لیشمانیا مکزیکانا (*L. mexicana*) و لیشمانیا اینفنتوم (*L. infantum*) می‌شود که این امر نشان می‌دهد که فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی می‌تواند رشد لیشمانیا در ناقلین را کنترل کند [۲۹]. باید عنوان نمود که تاکنون بررسی‌های اندکی در این زمینه صورت گرفته است و مطالعات گسترده در راستای شناسایی سیستم ایمنی پشه‌های خاکی و ازبین‌بردن عفونت‌های انگلی لیشمانیایی حائز اهمیت می‌باشد.

ایجاد عفونت

همان‌طور که هضم غذا ادامه دارد، انگل‌ها باید به دیواره اپیتلیال معده میانی متصل شوند تا از خروج آن‌ها با باقی‌مانده خون خورده‌شده جلوگیری شود. پس از فرار از فضای آندوتروفیک، انگل‌ها خود را به معده میانی پیوند می‌زنند و از طریق فلاژل در میکروویلی‌های اپیتلیال قرار می‌گیرند. اهمیت مسأله در این است که اتصال یا عدم اتصال، تعیین‌کننده اصلی ناقل و انگل خاص می‌باشد [۳۱، ۳۰].

اخیراً در مطالعه‌ای مشخص شده است که اتصال لیشمانیا به معده پشه خاکی به شدت وابسته به مرحله است. این ویژگی در فرم‌های نکتوموناد و لپتوموناد مربوط به فاز میانی رشد انگل مشاهده می‌شود؛ اما در مراحل ابتدایی خون خورده‌شده و مراحل نهایی در فرم‌های پروسیکلیک و متاسیلیک، اتصال لیشمانیا به دیواره معده وجود ندارد [۳۲]. براساس اتصال یا عدم اتصال لیشمانیا به دیواره معده، پشه‌های خاکی به دو دسته ناقلین اختصاصی یا سخت‌گیر

(Restricted) و ناقلین آسان گیر (Permissive) دسته‌بندی می‌شوند. در ناقلین اختصاصی فقط گونه خاصی از انگل قادر به اتصال به دیواره معده می‌باشد. در مقابل، برخی از گونه‌های پشه خاکی از رشد گونه‌های مختلف لیثمانیا حمایت می‌کنند؛ به همین دلیل ناقلین آسان گیر نامیده می‌شوند. به نظر می‌رسد که تنوع تکاملی نزدیکی بین ناقلین اختصاصی با انگل مانند فلپوتوموس پاپاتاسی و فلپوتوموس دوبوسکی با لیثمانیا ماژور و فلپوتوموس سرزنتی (*P. sergenti*) با لیثمانیا تروپیکا (*L. tropica*) وجود دارد [۳۳، ۳۴].

اتصال انگل به دیواره معده پشه خاکی

بیشترین مطالعات در ارتباط با بررسی برهم‌کنش بین پشه خاکی و انگل در مورد نحوه اتصال و استقرار لیثمانیا ماژور در ناقل اختصاصی خود فلپوتوموس پاپاتاسی انجام شده است. نقش مولکول لیپوفسفوگلیکان (LPG: lipophosphoglycan) سطح انگل توسط برخی از مطالعات نشان داده شده است. LPG یکی از فراوان‌ترین مولکول‌های سطحی انگل با ساختار گلیکولیپیدی می‌باشد که در تمام سطوح انگل و در تمام مراحل رشد و نمو آن وجود دارد [۳۵].

ساختار اصلی LPG در تمام گونه‌های انگل حفاظت شده می‌باشد و انگل توسط گیرنده گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول انکور مولکول سطحی LPG به غشای پلازما می‌چسبد. مهم‌ترین مولکول‌های سطحی انگل متصل به GPI عبارت هستند از: لیپوفسفوگلیکان (LPG)، پروتئو فسفوگلیکان (PPG)، گلیکوزیل اینوزیتول فسفولیپید (GIPL)، اسید فسفاتاز (AP)، گلیکو پروتئین ۶۳ (GP63) لیثمانولیسین و سیستمین پروتئاز. مهم‌ترین فراوان‌ترین مولکول LPG است که باعث اتصال و استقرار انگل لیثمانیا به دیواره اپیتلیال معده می‌شود. ساختار مولکولی LPG در گونه‌های مختلف و مراحل گوناگون نمو انگل اختصاصی می‌باشد. LPG شامل چهار قسمت گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول انکور

(PI Anchor)، حلقه هگزاساکارید (Glycancore)، واحدهای تکرارشونده فسفوگلیکان (PG Repeating Unit) و کلاهک الیگوساکاریدی (Cap) است. در فرایند تبدیل فرم LPG تغییرات مولکول، پروسیکلیک انگل به فرم متاسیکلیک آلوده‌کننده، در قسمت‌های واحدهای تکرار و کلاهک می‌باشد [۳۶].

به‌منظور ایجاد عفونت قابل انتقال در پشه خاکی، انگل باید بتواند از اپیتلیوم میدگات جدا شود و متاسیکلیک آزاد شناور تشکیل دهد. در ترکیب فلپوتوموس پاپاتاسی- لیثمانیا ماژور، پیوستگی با تغییرات خاصی در ساختار LPG به‌دست می‌آید. پیوند انگل توسط مولکول LPG است که در واحدهای تکرار حاوی زنجیره‌های جانبی گالاکتوز می‌باشد. در طول متاسیکلوژنز، مولکول LPG اصلی توسط LPG متاسیکلیک جایگزین می‌شود که در متاسیکلیک، تعداد واحدهای تکرار PG افزایش و زنجیره‌های جانبی کاهش می‌یابد. به این ترتیب LPG فرم متاسیکلیک قابلیت اتصال به میدگات فلپوتوموس پاپاتاسی را ندارد [۳۷].

براساس یافته‌های مربوط به نقش باقی‌مانده‌های قندها در فرضیه اتصال، مولکول گالکتین (PpGalec) به‌عنوان گیرنده‌ای برای LPG در میدگات پشه خاکی فلپوتوموس پاپاتاسی شناسایی گردیده است [۳۸]. مولکول PpGalec یک گالاکتین ۳۵ کیلودالتونی حاوی دو دومین کربوهیدرات می‌باشد که نقش آن در اتصال لیثمانیا ماژور در سطح لومینال سلول‌های اپیتلیال میدگات ثابت شده است [۳۸]. در نهایت، لیثمانیا به مراحل متاسیکلیک آلوده‌کننده تبدیل می‌شود و تحویل آن‌ها به پوست میزبان مهره‌دار باید برای انتقال مؤثر تضمین گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب بیان‌شده و گسترش بیماری لیثمانیوز در ایران و جهان، پژوهش در راستای کنترل این بیماری حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به کمپلکس بودن بیماری لیثمانیوز، کنترل دشوار

تحقیقاتی قرار دارند، تاکنون واکسن مؤثری جهت پیشگیری از این بیماری معرفی نشده است.

قدردانی

بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و همچنین سرکار خانم جعفری به دلیل همکاری در راستای انجام این مطالعه ابراز می‌نمایم.

بیماری، شکست درمان و عدم وجود واکسن ضد لیشمانیوز، مطالعات شناسایی مسیر رشد و تکمیل چرخه زندگی انگل در بدن پشه خاکی ناقل لیشمانیوز حائز اهمیت است تا با شناسایی این موانع و سدهای طبیعی و به نحوی تقویت آن‌ها بتوانیم در جهت شناسایی روش‌های نوین از جمله شناسایی ترکیبات دارویی جدید و واکسن مؤثر در راستای قطع مسیر رشد انگل و کنترل بیماری لیشمانیوز گامی مؤثر برداریم. با توجه به اینکه تمام ترکیبات و مشتقات شناسایی شده به‌عنوان واکسن ضد لیشمانیوز در محدوده

References

1. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(3):e0004349.
2. Yaghoobi-Ershadi MR. Control of phlebotomine sand flies in Iran: a review article. *J Arthropod Borne Dis* 2016; 10(4):429-44.
3. Dostalova A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* 2012; 5:276.
4. Veysi A, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Hosseini-Vasoukolaei N, Jeddi-Tehrani M, Rezaee-Node A, et al. Rearing and biology of phlebotomus sergenti, the main vector of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *J Arthropod Borne Dis* 2017; 11(4):504-14.
5. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. *Parasitology* 2002; 124(5):495-507.
6. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 2003; 33(10):1027-34.
7. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 2006; 22(9):439-45.
8. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007; 37(10):1097-106.
9. Hosseini-Vasoukolaei N, Jeddi-Tehrani M, Akhavan AA. Salivary transcript expression profiles of Phlebotomus papatasi: antigenic variation of phlebotomus papatasi salivary glands regarding some biological and environmental factors. Germany: Lap Lambert Academic Publishing; 2016.
10. Telleria EL, de Araújo AP, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM. Trypsin-like serine proteases in Lutzomyia longipalpis—expression, activity and possible modulation by Leishmania infantum chagasi. *PloS One* 2010; 5(5):e10697.
11. Dillon RJ, Ivens AC, Churcher C, Holroyd N, Quail MA, Rogers ME, et al. Analysis of ESTs from Lutzomyia longipalpis sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics* 2006; 88(6):831-40.
12. Ramalho-Ortigão M, Jochim RC, Anderson JM, Lawyer PG, Pham VM, Kamhawi S, et al. Exploring the midgut transcriptome of Phlebotomus papatasi: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and Leishmania major-infected sandflies. *BMC Genomics* 2007; 8(1):300.
13. Jochim RC, Teixeira CR, Laughinghouse A, Mu J, Oliveira F, Gomes RB, et al. The midgut transcriptome of Lutzomyia longipalpis: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and Leishmania infantum chagasi-infected

- sand flies. BMC Genomics 2008; 9(1):15.
14. Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Ortigão-Farias JR, Dávila AM, Souza AA, et al. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. Mol Genet Genomics 2009; 282(3):307-17.
 15. Dostalova A, Votypka J, Favreau AJ, Barbian KD, Volf P, Valenzuela JG, et al. The midgut transcriptome of *Phlebotomus* (Larroussius) perniciosus, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. BMC Genomics 2011; 12(1):223.
 16. Rogers ME, Hajmova M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, et al. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cell Microbiol 2008; 10(6):1363-72.
 17. 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.
 18. Eschenlauer SC, Faria MS, Morrison LS, Bland N, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, et al. Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. Cell Microbiol 2009; 11(1):106-20.
 19. Morrison LS, Goundry A, Faria MS, Tetley L, Eschenlauer SC, Westrop GD, et al. Ecotin-like serine peptidase inhibitor ISP1 of *Leishmania major* plays a role in flagellar pocket dynamics and promastigote differentiation. Cell Microbiol 2012; 14(8):1271-86.
 20. Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, et al. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. Cell Microbiol 2010; 12(7):906-18.
 21. Sadlova J, Myskova J, Lestinova T, Votypka J, Yeo M, Volf P. *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: Comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections. Parasitology 2017; 144(4):403-10.
 22. Secundino N, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. J Med Entomol 2005; 42(6):928-38.
 23. Sadlova J, Volf P. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. Cell Tissue Res 2009; 337(2):313-25.
 24. Dinglasan RR, Devenport M, Florens L, Johnson JR, McHugh CA, Donnelly-Doman M, et al. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. Insect Biochem Mol Biol 2009; 39(2):125-34.
 25. Hosseini-Vasoukolaei N, Idali F, Khamesipour A, Yaghoobi-Ershadi MR, Kamhawi S, Valenzuela JG, et al. Differential expression profiles of the salivary proteins SP15 and SP44 from *Phlebotomus papatasi*. Parasit Vectors 2016; 9(1):357.
 26. Coutinho-Abreu IV, Sharma NK, Robles-Murguia M, Ramalho-Ortigao M. Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(11):e901.
 27. Feldhaar H, Gross R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. Microb Infect 2008; 10(9):1082-8.
 28. Kumar S, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C. A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. Science 2010; 327(5973):1644-8.
 29. Diaz-Albiter H, Sant'Anna MR, Genta FA, Dillon RJ. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. J Biol Chem 2012; 287(28):23995-4003.
 30. Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol 2008; 11(4):340-4.
 31. Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. Proc Natl Acad Sci 2000; 97(1):406-11.
 32. Wilson R, Bates MD, Dostalova A, Jecna L, Dillon RJ, Volf P, et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(9):e816.
 33. Ramalho-Ortigao J, Traub-Csekö Y. Molecular characterization of Lchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. Insect Biochem Mol Biol 2003; 33(3):279-87.
 34. Hosseini-Vasoukolaei N, Mahmoudi AR, Khamesipour A, Yaghoobi-Ershadi MR, Kamhawi S, Valenzuela JG, et al. Seasonal and physiological variations of *Phlebotomus papatasi* salivary gland antigens in central Iran. J Arthropod Borne Dis 2016; 10(1):39-49.
 35. Hosseini-Vasoukolaei N. Sand fly saliva: toward a

- vaccine against leishmaniases. *Vaccine Res* 2015; 2(2):86-92.
36. Lima JB, Araujo-Santos T, Lazaro-Souza M, Carneiro AB, Ibraim IC, Jesus-Santos FH, et al. Leishmania infantum lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- γ expression via activation of Toll like receptors 1 and 2. *Sci Rep* 2017; 7(1):14321.
37. Forestier CL, Gao Q, Boons GJ. Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 4:193.
38. Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, et al. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 2004; 119(3):329-41.