

Review Article

## A Review of Effectual Factors in the Pathogenesis of *Leishmania* Parasites

Mahami-Oskouei M<sup>\*1</sup>, Mohebbali M<sup>2</sup>, Spotin A<sup>1</sup>, Alizadeh Z<sup>1</sup>

1. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2. Department of Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* **Corresponding author.** Tel: +984133373745, Fax: +984133373745, E-mail: mahamim@tbzmed.ac.ir

Received: May 20, 2018 Accepted: Sep 21, 2018

### ABSTRACT

*Leishmania* parasites as the causative agent of leishmaniasis belong to Trypanosomatidae family. Parasite, vector, vertebrate host and environment are major factors in pathogenesis of *Leishmania*.

Parasite dependent factors are virulence factors which exist in *Leishmania* species such as LPG, GP63. In recent years, the importance of these factors in the field of vaccine and drug has been considered by researchers. Sand fly biting behavior and salivary gland proteins are vector dependent factors which are effective in the *Leishmania* pathogenesis. Age, gender, nutrition, immune system, infectious diseases, genetic, occupation, socio-economic characteristics, and habitat are vertebrate host mediated factors. Temperature, rainfall, wind and its speed, soil, and continuous changes in climate are also environmental factors. Therefore the aim of this study was to evaluate the pathogenesis of *Leishmania* parasites.

**Keywords:** *Leishmania*; Pathogenesis; Sand Fly

## مقاله مروری

## مروری بر عوامل مؤثر در بیماری‌زایی انگل‌های لیشمانیا

محمود محامی اسکویی<sup>۱\*</sup>، مهدی محبعلی<sup>۲</sup>، عادل اسپوتین<sup>۱</sup>، زهرا علیزاده<sup>۱</sup>

۱. گروه انگل‌شناسی و فارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. گروه انگل‌شناسی و فارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۳۳۳۷۳۷۴۵، فاکس: ۰۲۱۳۳۳۷۳۷۴۵، پست الکترونیک: mahamim@tbzmed.ac.ir

## چکیده

انگل‌های لیشمانیا تک‌یاخته‌هایی از جنس لیشمانیا و عضوی از خانوادهٔ تریپانوزوماتیده هستند که باعث ایجاد انواع لیشمانیوز می‌شوند. عوامل مؤثر در بیماری‌زایی انگل‌های لیشمانیا عبارتند از عوامل مربوط به انگل، پشهٔ ناقل، میزان مهره‌دار و محیط. عوامل مربوط به انگل شامل فاکتورهای ویروالانس موجود در انگل‌های لیشمانیا است که مهمترین آن‌ها GP63 و LPG می‌باشند. این عوامل از چندین سال پیش مورد توجه محققین به خصوص در زمینهٔ تولید واکسن و دارو بوده و مطالعات مختلفی نیز در این رابطه انجام شده است. تعداد گزش و پروتئین‌های غدد بزاقی پشه خاکی‌ها از عوامل مربوط به پشهٔ ناقل هستند که در بیماری‌زایی انگل‌های لیشمانیا نقش دارند. از عوامل مربوط به میزان مهره‌دار نیز می‌توان به سن، جنس، نژاد، تغذیه، سیستم ایمنی، بیماری‌های عفونی، ژنتیک، جایگاه تلقیح انگل، شغل، وضعیت اقتصادی و اجتماعی و عادات اهالی منطقه اشاره کرد. درجه حرارت و رطوبت نسبی هوا، میزان بارندگی و توزیع آن، باد و شدت آن، ارتفاع از سطح دریا، جنس خاک، نوع پوشش گیاهی و تغییرات دوره‌ای آب و هوا نیز از عوامل محیطی مؤثر در بیماری‌زایی انگل‌های لیشمانیا می‌باشند. عواملی که باعث افزایش پاتوژنیسیته و مقاومت انگل در مقابل عوامل مختلف می‌گردند در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است.

**واژه‌های کلیدی:** لیشمانیا، بیماری‌زایی، پشه خاکی

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۳۰

دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۳۰

## مقدمه

مختلف پشه‌خاکی‌ها هستند [۳،۲]. این بیماری در انسان به صورت لیشمانیازیس جلدی، جلدی-منتشره، جلدی-مخاطی و احشایی مشاهده می‌شود [۱۰-۸]. انواع لیشمانیوزها به صورت یک بیماری اندمیک از قسمت‌های مختلف جهان و ایران گزارش شده است. لیشمانیوزها از مهمترین و شایع‌ترین بیماری‌های بومی ایران محسوب می‌شوند و سه شکل بالینی آن شامل لیشمانیوز جلدی شهری، لیشمانیوز جلدی

انگل‌های لیشمانیا<sup>۱</sup> تک‌یاخته‌هایی از جنس لیشمانیا و عضوی از خانوادهٔ تریپانوزوماتیده<sup>۲</sup> می‌باشند و گونه‌های مختلف آن‌ها عامل طیف وسیعی از بیماری‌هایی هستند که اصطلاحاً لیشمانیازیس نامیده می‌شود [۱]. ناقلین طبیعی برای لیشمانیاها گونه‌های

<sup>1</sup> *Leishmania*<sup>2</sup> *Trypanosomatidae*

شده بر اثر شوک حرارتی هستند [۲۰-۱۴]. بررسی‌ها نشان داده است که سیستمین پروتئازها در بیولوژی انگل‌های لیثمانیا نقش مهمی داشته و همچنین برای رشد انگل در داخل ماکروفاژ ضروری می‌باشند. تاکنون سه نوع از سیستمین پروتئازها (CPS) در انگل‌های لیثمانیا مشخص شده که شامل CPA، CPB و CPC می‌باشند. CPA و CPC دارای ژن‌های منفردی هستند ولی برای ژن CPB چندین کپی وجود دارد. در یک مطالعه مشخص شده که سیستمین پروتئاز B در لیثمانیا مکزیکانا بیشترین تعداد و توالی ژن CPB را داشته و نقش اساسی در ویرولانسی این انگل دارد. در لیثمانیا مکزیکانا بیان GP63 در فقدان آنزیم CPB مهار می‌شود و همچنین وجود این آنزیم برای کاهش بیان دو پروتئین VAMP3 و VAMP8 که در بیوژنز و عملکرد فاگولیزوزوم نقش دارند ضروری می‌باشد [۲۱].

#### LPG<sup>۲</sup> -

LPG یک گلیکولیپید ۹۵ کیلودالتونی سطح سلولی پیچیده‌ای است که حدود ۲۵ درصد سطح انگل را می‌پوشاند (۱۲۵۰۰۰۰ مولکول) و اولین بار در سال ۱۹۸۴ شرح داده شد. در ساختمان LPG چهار قسمت شناسایی شده است:

۱. 1-o-alkyl-2-lyso-phosphatidyl-(myo)-inositol-  
lipid] ۲. هسته گلیکان هپتاساکاریدی ۳. واحدهای تکرارپذیر دی ساکارید- فسفات ۴. کلاک کوچک الیگوساکاریدی.

#### - نقش LPG

تشکیل گلیکو کالیکس فشرده در سطح انگل، حفاظت انگل در برابر آنزیم‌های روده میانی پشه‌خاکی، نقش در واکنش متقابل لیثمانیا با اجزای سرم میزبان مهره‌دار، مهار پروتئین کیناز C، تأثیر بر روی لیپیدهای شناور، نقش در اتصال و ورود لیثمانیا به ماکروفاژ، ممانعت از اتصال فاگوزوم به اندوزوم و عدم تشکیل فاگولیزوزوم، نقش در زنده ماندن انگل

روستایی و لیثمانیوز احشایی در ایران سابقه طولانی دارند [۱]. در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که بسیاری از گونه‌های لیثمانیا توانایی تعدیل پاسخ‌های ایمنی بدن میزبان را داشته و در نتیجه باعث افزایش بقای انگل در بدن میزبان و افزایش بیماریزایی آن می‌شود [۱۱-۱۳]. عواملی که باعث افزایش پاتوژنیسیته و مقاومت انگل در مقابل عوامل مختلف محیطی مثل دستگاه گوارش پشه‌خاکی، خون انسان و فاگولیزوزوم‌های ماکروفاژ می‌گردد در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه تلاش شده است با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف، مقاله‌های مربوط به پاتوژنز انگل‌های لیثمانیا را بررسی و نتایج حاصل از مطالعات مختلف به صورت یک مقاله مروری ارائه گردد.

#### عوامل مؤثر در بیماریزایی انگل‌های لیثمانیا

عوامل مؤثر در بیماریزایی انگل‌های لیثمانیا عبارت‌اند از: عوامل مربوط به انگل، عوامل مربوط به پشه‌خاکی، عوامل مربوط به میزبان مهره‌دار و عوامل مربوط به محیط.

#### الف- عوامل مربوط به انگل

- مولکول‌های سطحی انگل لیثمانیا را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد:

۱. مولکول‌هایی که به تعداد زیاد در سطح انگل بوده و مهمترین و بیشترین مولکول‌های سطحی را در انگل لیثمانیا تشکیل می‌دهند که شامل مولکول‌های لیپیدی با شاخه GPI یا گلیکوفسفاتیدیل اینوزیتول مثل: LPG و گروه کوچکی به نام گلیکواینوزیتول فسفولیپیدها یا GIPLs، پروتئین‌های با شاخه GPI مثل GP63 و پروتئوفسفو گلیکان‌ها یا PPGs (عامل واکوئولیزاسیون در داخل ماکروفاژها) می‌باشند.

۲. مولکول‌هایی که به تعداد کم در سطح انگل بوده و به وسیله عملی که انجام می‌دهند شناخته می‌شوند. این‌ها شامل آنزیم‌ها، ترانسپورترها و پمپ‌های یونی مثل سیستمین پروتئازها، SAP<sup>۱</sup> و پروتئین‌های آزاد

<sup>۱</sup> Secreted Acid Phosphatase

<sup>۲</sup> Lipophosphoglycan

سه پروتئین از این خانواده در ماکروفاژها وجود دارد که در عمل فاگوسیتوزیس توسط ماکروفاژ و همچنین در بیوژنز فاگولیزوزوم نقش ایفا می‌کنند [۳۴]. gp63 در اتصال انگل به دیوارهٔ رودهٔ میانی پشه ضروری می‌باشد و بررسی‌ها نشان داده است که در فقدان gp63 توانایی اتصال به دیوارهٔ رودهٔ پشه را ندارد [۳۵].

#### – آنزیم‌ها، ترانسپورترها و پمپ‌های یونی

۱. ATPase: در حفظ هموستاز pH انگل دخالت دارد و در اسیدی شدن لیزوزوم شرکت می‌کند. همچنین شیب انتقال دهندهٔ پروتون، انتقال قند و اسیدهای آمینه را که برای بقا و رشد انگل حیاتی هستند هدایت می‌کند.

۲. پروتئین کینازها: انگل‌های لیشمانیا دارای سطوح بالایی از فعالیت پروتئین کینازی در غشاء خارجی خود هستند. میزان فعالیت پروتئین کینازها در مرحلهٔ ایستایی از بقیهٔ مراحل بیشتر است. انواع مختلفی از این آنزیم‌ها در گونه‌های مختلف لیشمانیا وجود داشته و با فسفریله کردن پروتئین‌های بدن میزبان در تعدیل پاسخ‌های ایمنی بدن علیه انگل نقش مهمی دارند. CK1<sup>۴</sup> در لیشمانیا ماژور با فسفریله کردن پروتئین‌های بدن میزبان از جمله پلی پپتید C3a کمپلمان و IFNAR1 که به عنوان گیرندهٔ مهم برای سیگنالینگ INF- / می‌باشد، باعث تعدیل پاسخ‌های ایمنی بدن میزبان شده و می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی مورد توجه قرار گیرد [۳۶].

۳. SAP: اسید فسفاتاز یکی از فاکتورهای ویرولانسی در تمام گونه‌های انگل لیشمانیا بوده و چندین شواهد وجود ارتباط بین فعالیت اسید فسفاتاز و شدت بیماری ناشی از این انگل را اثبات کرده است. محل فعالیت این اسید سطح پروماستیگوت و آماستیگوت انگل می‌باشد. میزان فعالیت این آنزیم در فاز ایستایی رشد پروماستیگوت در مقایسه با فاز لگاریتمی آن بیشتر است. علاوه بر این، فعالیت این اسید در واکنش‌های

<sup>4</sup> Casein Kinase 1

در داخل سلول، تأثیر بر روند تولید نیتریک اُکساید و سرکوب بیان IL-1 [۳۰-۳۲]. همچنین LPG با متصل شدن به میکروویلی‌های رودهٔ میانی پشه به حفظ عفونت و افزایش بقای انگل در بدن پشه و کامل کردن چرخهٔ زندگی انگل در بدن پشه کمک می‌کند [۳۱].

#### GP63-

گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی است که به اسامی دیگری مثل MSP<sup>۱</sup>، لیشمانولیزین، EC 3.4.24.36 و PSP<sup>۲</sup> نیز معروف است. این متالوپروتئاز حاوی روی به وسیلهٔ ۷ ژن کد می‌شود و حدود یک درصد کل پروتئین را در پروماستیگوت‌های لیشمانیا شامل می‌شود. هر پروماستیگوت تقریباً پانصد هزار مولکول MSP دارد. MSP در همهٔ انواع لیشمانیاها و در هر دو فرم پروماستیگوت و آماستیگوت وجود دارد.

#### – نقش GP63

مقاومت در برابر عمل لیز کمپلمان، تجزیهٔ آنزیم‌های لیزوزومال و محافظت از انگل در داخل سلول، تبدیل C3b به iC3b و فراهم نمودن اتصال انگل به ماکروفاژ به واسطهٔ گیرنده‌های CR1 و CR3، شکستن ۲ - ماکروگلوبولین (بازدارندهٔ عمل پروتئاز در پلاسما انسان)، شکستن مولکول‌های CD4 و ممانعت از پاسخ سلول‌های T، جلوگیری از عمل کموتاکسی ماکروفاژ، شکستن پپتیدهای بلند سلول و ممانعت از عرضهٔ آن‌ها به وسیلهٔ MHC<sup>۳</sup> کلاس یک، تجزیهٔ کلاژن IV و فیبرونکتین [۳۲، ۳۳، ۳۴]. همچنین انگل با کمک gp63 می‌تواند مولکول‌های بدن میزبان از جمله مولکول‌های مؤثر در مسیرهای سیگنالینگ، فاکتورهای رونویسی و مولکول‌هایی که در بیوژنز فاگولیزوزوم نقش دارند را هدف گرفته و مانع فعالیت ماکروفاژها در برابر انگل شود. در یک مطالعه‌ای مشخص شده که gp63 توانایی شکستن پروتئین‌های خانوادهٔ DOK را دارد.

<sup>1</sup> Major Surface Protease

<sup>2</sup> Promastigote Surface Protease

<sup>3</sup> Major Histocompatibility Complex

سیتوپلاسمی و وزیکول‌های ترشح شده از انگل نیز یافت شده است [۳۸،۳۷]. اسید فسفاتاز انگل علاوه بر این که از انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و ظهور رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند، در تغذیه انگل و ورود انگل به سلول میزبان نیز نقش دارد همچنین به عنوان یک عامل مؤثر در عفونی شدن پروماستیگوت‌های انگل می‌باشد.

۴. پروتئین‌های شوک حرارتی: تعداد این پروتئین‌ها در انواع مختلف لیشمانیا متفاوت است و بیشتر در پروماستیگوت‌ها دیده می‌شود. یکی از این پروتئین‌ها HSP70 می‌باشد. در پروماستیگوت‌هایی که مدت کوتاهی در مجاورت شوک حرارتی قرار گرفته‌اند میزان بیماریزایی افزایش یافته است [۳۹،۴۰،۴۱].

۵. پروتئین دی سولفید ایزومراز (PDI): پروتئین دی سولفید ایزومراز با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون در گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا وجود داشته و به عنوان یک فاکتور ویرولانسی در انگل‌های لیشمانیا مطرح می‌باشد و با پاتوژنیسیته، بقاء و رشد انگل در ارتباط است. این پروتئین در سطح پروماستیگوت و آماسیتیگوت بیان و ترشح می‌شود. در چندین مطالعه‌ای که در مورد لیشمانیا دنوانی صورت گرفته مشخص شده که این پروتئین باعث رشد مستقیم پروماستیگوت‌های انگل می‌شود و همچنین باعث کاهش ترشح نیتریک اُکساید و ترشح بیشتر IL-10 از ماکروفاژهای آلوده با این انگل می‌شود. فعال شدن ماکروفاژها به میزان زیادی بستگی به تولید سایتوکاین IFN- $\gamma$  توسط سلول‌های T دارد در صورتی که آنزیم PDI با تحریک ترشح IL-10 و کاهش تولید متابولیت‌های ضد انگل از جمله نیتریک اُکساید مانع فعال شدن ماکروفاژها علیه انگل می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر عملکرد ایزومرازی، ردوکتازی و چاپرون مانند این آنزیم در لیشمانیا ماژور به اثبات رسیده است [۴۲،۴۳].

۶. PSG<sup>1</sup>: انگل‌های لیشمانیا مکانیسم‌های مختلفی را برای سرکوب پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی بدن میزبان دارند. از جمله این مکانیسم‌ها هدف قرار دادن متابولیسم ال-آرژینین در ماکروفاژها می‌باشد. این که ماکروفاژ بتواند با انگل مقابله کند به بالانس بین عملکرد آنزیم‌های نیتریک اُکساید سنتاز-۲ و آرژینیناز-۱ دارد که سوبسترای هر دو آنزیم ال-آرژینین می‌باشد. این دو مسیر تحت کنترل مسیرهای Th1/Th2 می‌باشند. اگر مسیر Th1 فعال شده باشد سایتوکاین‌های تولید شده توسط این مسیر باعث فعال شدن ماکروفاژهای کلاس M1 شده و موجب افزایش فعالیت آنزیم نیتریک اُکساید سنتاز-۲ گردیده و این آنزیم باعث کاتابولیزه شدن سوبسترای ال-آرژینین به نیتریک اُکساید می‌شود که یک متابولیت توکسیک برای لیشمانیا محسوب می‌گردد. در صورتی که مسیر Th2 فعال شود سایتوکاین‌های تولید شده توسط این مسیر باعث فعال شدن ماکروفاژهای کلاس M2 شده و باعث افزایش فعالیت آنزیم آرژینیناز-۱ می‌شود و پس از اثر گذاشتن روی سوبسترای ال-آرژینین باعث هیدرولیز شدن آن و تولید اوره و ال-آرینیتین می‌گردد که این مواد تولید شده باعث افزایش سنتز پلی آمین‌ها می‌شوند. پلی آمین‌ها مولکول‌های کاتیونیک کوچکی می‌باشند که برای بقای انگل ضروری می‌باشند. بررسی‌ها نشان داده است که PSG ترشح شده از پروماستیگوت لیشمانیا مکزیکانا باعث افزایش بیان آرژینیناز-۱ در ماکروفاژها شده و باعث افزایش رشد انگل داخل ماکروفاژها می‌شود [۴۴].

۷. آنزیم آرژینیناز: مطالعات مختلف نشان داده است که آنزیم آرژینیناز در انگل‌های لیشمانیا فعالیت دارد. فعالیت این آنزیم عفونت‌زایی انگل‌های لیشمانیا را در بدن میزبان افزایش داده و باعث تشدید بیماری می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده پروماستیگوت‌های انگل در محیطی که آنزیم آرژینیناز نباشد قادر به زنده ماندن و فعالیت نمی‌باشند.

<sup>1</sup> Promastigote Secreted Gel

همچنین مشخص گردیده که عفونت با انگل‌های لیشمانیا می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم آرژیناز میزبان شود و این روند باعث فراهم شدن یک سری پلی‌آمین‌هایی برای تکثیر انگل می‌گردد. بر اساس این نتایج چنین به نظر می‌رسد که آنزیم آرژیناز می‌تواند به عنوان یک شاخص مهم در شدت بیماریزایی لیشمانیا مطرح باشد [۴۷،۴۶].

#### - تأثیر ویروس‌ها در بیماریزایی انگل‌های لیشمانیا

در سال ۱۹۸۷ اجسام ویروس ماندی را برای اولین بار در سیتوپلاسم پروماستیگوت‌های کشت داده شده لیشمانیا هریتیجی مشاهده کردند. در سال ۱۹۸۸، RNA ویروس‌هایی از خانواده توتاویریده در پروماستیگوت‌های کشت داده شده لیشمانیا گویانسیس و در سال ۱۹۹۲ از ۱۱ ایزوله لیشمانیا گویانسیس و لیشمانیا برازیلینسیس شرح داده شد. این ویروس‌ها در آماستیگوت‌های موجود در زخم دیده نشده و در آماستیگوت‌های صفاق موش و سارکوما سگ نیز به صورت کاهش یافته دیده شده است. در عفونت‌های تجربی با لیشمانیا ماژور در موش مشخص شده که انگل‌های آلوده به ویروس پاتوژن کمتری نسبت به غیر آلوده‌ها دارند [۳،۲]. در سال ۲۰۱۶ در یک مطالعه مشخص شد که انگل لیشمانیا توانایی بیان کمپلکس E1E2 را که به عنوان گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس هپاتیت C مطرح هستند را دارد. در این مطالعه میزان ایمونوژنیسیته E1E2 بیان شده توسط لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفت. این کمپلکس در لیشمانیا توانایی متصل شدن به گیرنده CD-81 در بدن میزبان را داشته و به طور مؤثری باعث برانگیخته شدن فرآیند نوترالیزاسیون در بدن میزبان می‌شود، بنابراین می‌تواند به عنوان یک کاندید برای تولید واکنس علیه لیشمانیوز مطرح باشد [۴۸].

- لیشمانیا گویانسیس ایجاد ضایعات متاستاتیک و جلدی- مخاطی می‌نماید. این انگل گاهی از محل اولیه خود به عروق لنفاوی رفته و باعث ایجاد یک سری

ضایعات در این محل می‌شود همچنین زخم‌های لنفاوی منجر به زخم‌های منتشر می‌شود. اما در پاسخ به این سؤال که چه عاملی باعث ایجاد ضایعات متاستاتیک و گسترش آن به سایر قسمت‌های بدن میزبان توسط انگل می‌شود می‌توان گفت تحریک مداوم سیستم ایمنی بدن میزبان توسط انگل و تولید بیش از حد سایتوکاین‌های التهابی و کموکاین‌ها مانند TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL-10 و CCL-4 در محل ضایعه و افزایش فعالیت سلول‌های T سایتوتوکسیک می‌تواند دلایلی برای متاستاز و گسترش ضایعات ایجاد شده توسط انگل باشند. علاوه بر دخالت فاکتورهای میزبان در ایجاد این حالت، بررسی‌ها نشان داده است که فاکتورهای ویروالانس انگل نیز می‌توانند در گسترش ضایعات نقش داشته باشند.  $LRV1^1$  که توسط  $TLR3^2$  میزبان مورد شناسایی قرار می‌گیرد، در ترشح بیشتر سایتوکاین‌های التهابی و کموکاین‌ها و در نتیجه گسترش ضایعات ایجاد شده توسط این انگل نقش مهمی دارد [۴۹، ۵۰]. در یک مطالعه مشخص شد که LRVs در دو گونه لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور وجود دارد. در این مطالعه لیشمانیا اینفانتوم از بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی که پاسخی به درمان با مگلو مین آنتی مونات نشان نداده بودند و لیشمانیا ماژور از ژربیل رومبومیس اُپیموس جداسازی شدند. در این مطالعه ارتباطی بین LRV و عدم پاسخ به درمان بیماران یافت نشد [۵۱].

#### - بیماریزایی در گونه‌های مختلف لیشمانیا

گونه‌های ویسروتروپیک مثل لیشمانیا دنوانی در سیستم رتیکولاندوتلیال تقسیم می‌شوند در حالی که گونه‌های درموتروپیک مثل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا در محل ورود باقی می‌مانند. گونه‌های درموتروپیک کمتر گرایش به پخش شدن دارند و در صورت پخش شدن نمی‌توانند در قسمت‌های داخلی بدن زنده بمانند. لیشمانیا ماژور در صورت منتشر

<sup>1</sup> Leishmania RNA Virus 1

<sup>2</sup> Toll-Like Receptor 3

می‌باشد. ماکسادیلان موجب انبساط عروق شده و با تأثیر روی سلول‌های T باعث تنظیم سیستم ایمنی می‌شود. همچنین موجب ازدیاد حساسیت تأخیری در میزبان می‌گردد. این پروتئین به گیرنده‌های سطحی سلول‌های عروق و اعصاب می‌چسبد و تأثیر می‌گذارد. ماکسادیلان قوی‌ترین پپتید منبسط کننده عروقی است که تاکنون شناخته شده است و در ایجاد اریتمای موضعی بدون خارش و تورم (ETI) نقش داشته و باعث افزایش اندازه زخم و بار انگلی می‌شود. ماکسادیلان با افزایش تولید IL-10 در بدن میزبان یک اثر مهارتی روی عملکرد سیستم ایمنی اعمال می‌کند [۵۶-۵۳].

۲. اپیراز: مهمترین نقش آن جلوگیری از تجمع پلاکتی و لخته شدن خون است. این آنزیم با هیدرولیز ATP به ADP و AMP مانع تجمع پلاکتی می‌شود.

۳. نوکلئوتیداز: این پروتئین موجب انبساط عروق شده و ضد تجمع پلاکتی است [۵۸،۵۷].

۴. هیالورونیداز: نقش مهمی در واکنش‌های التهابی داشته و موجب تنظیم منفی اینترفرون گاما می‌شود. هیالورونیداز همچنین بر روی ژن سنتزکننده نیتریک آکساید تأثیر می‌گذارد [۵۹].

۵. آلفا آمیلاز: هیدرولیز کننده نشاسته به مالتوز و در نهایت گلوکز می‌باشد [۶۰].

۶. SP15: از جمله پروتئین‌های اصلی غدد بزاقی است که به نظر می‌رسد مورد هدف در پاسخ ایمنی طبیعی میزبان باشد. محققان SP15 را به دلیل ایمونوژن بودن برای ساخت DNA واکسن مورد بررسی قرار داده‌اند [۵۷].

۷. آدنوزین دامیناز: آدنوزین دامیناز که باعث تبدیل آدنوزین به اینوزین می‌شود یک مولکول پیش التهابی بوده و با ساپرس کردن عملکرد سیستم ایمنی بدن باعث گسترش انگل در بدن میزبان می‌شود. آدنوزین یک متسع کننده عروقی، ضد لخته و ضد تجمع پلاکتی می‌باشد. همچنین آدنوزین تقویت کننده احساس درد بوده و جلوگیری از زیاد شدن آن باعث موفقیت بهتر

شدن بیشتر تمایل به غدد لنفاوی اطراف دارد. از لیشمانیا تروپیکا هم چند مورد گزارش احشایی وجود دارد. لیشمانیا دونوانی به درجه حرارت بالا مقاوم‌تر بوده و در برابر سیتوتوکسیسیته وابسته به کمپلمان نیز از خود مقاومت بیشتری نشان می‌دهد. در شکل PKDL<sup>۱</sup> نیز فرم‌های ویسروتروپیک می‌توانند به شکل درموتروپیک در آیند. Poly- galactosyl- یکی از فاکتورهای پاتوژنز در لیشمانیا ماژور می‌باشد. این فاکتور باعث افزایش پاسخ‌های التهابی و شدت بیماری جلدی می‌شود و در زندگی انگل در بدن پشه ناقل نیز نقش دارد. Galectin-3 و Galectin-9 در میزبان، پروتئین‌های متصل شونده به این اپی‌توپ می‌باشند و Galectin-9 نقش اصلی را در واکنش بین بتا گالاکتوزیل و ماکروفاژ بر عهده دارد [۵۲،۳].

#### ب - عوامل مربوط به پشه‌خاکی

- تعداد گزش: هر چه تعداد و دفعات گزش توسط پشه‌خاکی بیشتر باشد، تعداد انگل و مواد بزاقی بیشتری وارد بدن شده و در نتیجه شدت بیماریزایی بیشتر خواهد بود.

- بزاق پشه‌خاکی: مهمترین ترکیبات و پروتئین‌های غدد بزاقی پشه‌خاکی‌ها عبارت‌اند از: ماکسادیلان<sup>۲</sup>، اپیراز<sup>۳</sup>، نوکلئوتیداز، هیالورونیداز، آلفا آمیلاز، SP15، آدنوزین دامیناز<sup>۴</sup>، پروتئین ضد لخته و CGRP<sup>۵</sup>.

۱. ماکسادیلان: در ابتدا با نام EIF<sup>۶</sup> شناخته شد و به لحاظ عملکردی شباهت بسیار زیادی به CGRP انسانی دارد. ماکسادیلان حدود ۵۰۰ برابر قوی‌تر از CGRP انسانی می‌باشد. اولین بار در بزاق لوتزومیا لونجی‌پالپیس یافت شده است. بزاق فلیبوتوموس پاپاتاسی فاقد ماکسادیلان می‌باشد ولی دارای خاصیت بازدارندگی پروتئین فسفاتاز 1 و پروتئین فسفاتاز 2A

<sup>1</sup> Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis

<sup>2</sup> Maxadylan

<sup>3</sup> Apyraze

<sup>4</sup> Adenosin Deaminase

<sup>5</sup> Calcitonin Gene-Related Peptide

<sup>6</sup> Erythema-Inducing Factor

در خونخواری و مانع قطع خونخواری می‌شود. آدنوزین همچنین با CD26 باند شده و از فعالیت سلول‌های T جلوگیری می‌کند. آدنوزین باعث افزایش ترشح IL-10 در بدن میزبان شده و با افزایش تولید اینوزین مانع ترشح IL-12، TNF-، IFN- و NO می‌شود.

۸. پروتئین ضد لخته: یک پروتئین ضد لخته و ضد تجمع پلاکتی است.

۹. CGRP: یک پپتید وابسته به ژن کلسی‌تونین می‌باشد که در بزاق پشه‌خاکی‌ها یافت شده و مرتبط با نوروپپتید پستانداران است. CGRP پشه‌خاکی و CGRP پستانداران هر دو دارای خاصیت سرکوب‌کننده ایمنی هستند [۵۷، ۵۸، ۶۱، ۶۲].

خواص فارماکولوژیک و ایمونولوژیک بزاق پشه‌خاکی‌ها عبارت‌اند از: جلوگیری از عکس‌العمل هموستاتین (فعالیت آنتی هموستاتیک بزاق پشه‌خاکی باعث افزایش عفونت‌زایی لیشمانیا ماژور می‌شود)، جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها، انبساط عروقی و تأثیر بر روی سیستم ایمنی از طریق جلوگیری از فعالیت سلول‌های T با کاهش IL-12، TNF-، IFN- و افزایش IL-6، جلوگیری از فعالیت ماکروفاژها، اثر بر روی نیتریک اُکساید و ایجاد ازدیاد حساسیت تأخیری یا <sup>1</sup>DTH که باعث تدوام انبساط عروقی و خونخواری پشه‌ها می‌شود [۵۳-۵۵، ۶۱، ۶۲].

- نقش کنه و کک به عنوان ناقل در پاتوژنز لیشمانیا:

انتقال انگل‌های لیشمانیا توسط پشه‌خاکی‌های جنس فلپوتوموس صورت می‌گیرد. اما بررسی‌ها نشان داده است که انگل‌های لیشمانیا می‌توانند توسط کک‌ها و کنه‌ها نیز انتقال یابند. در یک مطالعه‌ای مشخص شد که کتنوسفالیدس فلیس<sup>۲</sup> توانایی انتقال گونه‌های لیشمانیا را دارد. کنه‌ها به عنوان ناقلین مهم برای پاتوژن‌هایی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و برخی تک

یاخته‌ها هستند. کنه ریپی‌سفالوس سنگوئینوس<sup>۳</sup> یکی از ناقل‌های مهم پاتوژن‌های سگ می‌باشد که بسیاری از این پاتوژن‌ها نقش زئونوتیک دارند. فرضیه انتقال انگل‌های لیشمانیا توسط ریپی‌سفالوس سنگوئینوس چندین سال قبل مورد تأکید بوده ولی شواهد کافی برای اثبات این فرضیه وجود نداشت. اخیراً در یک مطالعه‌ای مشخص شده اگرچه انگل لیشمانیا اینفانتوم از سگ‌های آلوده به ریپی‌سفالوس سنگوئینوس منتقل شده بود ولی کنه توانایی انتقال انگل به سگ‌های سالم را نداشت، البته برای اثبات ناقل بودن کنه‌ها برای انگل‌های لیشمانیا بررسی‌های بیشتری مورد نیاز است [۶۵-۶۳].

### ج- عوامل مربوط به میزبان مهره‌دار

۱. سن: در ابتلاء به لیشمانیا اینفانتوم تأثیر دارد به طوری که بر اساس مطالعات انجام شده در استان اردبیل ۹۵ درصد مبتلایان زیر ۵ سال و ۷۲ درصد بین گروه سنی ۴-۱ سال قرار داشته‌اند [۶۶، ۶۷].

۲. جنس: موش‌های نر به عفونت سیستمیک با لیشمانیا ماژور حساس‌تر بوده و میزان بروز لیشمانیوز احشایی ناشی از لیشمانیا دنوانی در انسان و لیشمانیا اینفانتوم در سگ، در جنس نر بیشتر از جنس ماده می‌باشد. براساس مطالعات انجام شده در استان اردبیل نیز نسبت مبتلایان به کالاآزار در جنس مذکر به مؤنث ۱/۳ به ۱ بوده است [۶۸-۶۶].

۳. نژاد: سگ‌های نژاد دابرمین به لیشمانیا اینفانتوم حساس‌ترند. موش‌های DBA/2 به لیشمانیا دنوانی مقاوم و به لیشمانیا ماژور حساس هستند. موش‌های C57BL/6 و BL/10 به لیشمانیا دنوانی حساس و به لیشمانیا ماژور مقاوم هستند.

۴. تغذیه: سوء تغذیه نقش مهمی در ابتلاء به لیشمانیوز احشایی دارد. اگرچه تعیین مکانیسم دقیق این که سوء تغذیه چگونه با لیشمانیوز احشایی ارتباط دارد مشکل است ولی مطالعات انجام شده یک سری شواهدی را نشان می‌دهند که بین سوء تغذیه و ابتلا

<sup>1</sup> Delayed-Type Hypersensitivity

<sup>2</sup> *Ctenocephalides felis*

<sup>3</sup> *Rhipicephalus sanguineus*



۵. بیماری‌های عفونی: وجود بیماری‌های عفونی مثل ایدز که منجر به ضعف سیستم ایمنی می‌شود در ابتلاء به لیشمانیوز احشایی تأثیر دارد.

۶. ژنتیک: جایگاه ژنتیکی برای حساسیت موش‌های BALB/C، ناحیه‌ای روی کروموزوم ۱۱ بوده و شامل ژن‌های متعددی از جمله ژن‌های کدکننده *iNOS*، *IL-4*، عامل تنظیم کننده اینترفرون گاما و ژن مربوط به *IL-12* می‌باشد که در آلودگی‌های لیشمانیایی مؤثر هستند.

۷. جایگاه تلقیح انگل: عواملی مثل محل‌های مختلف در پوست، درجه حرارت، مجاری لنفاوی کوچک و توزیع سلول‌های لانگرهانس اپیدرمی در شدت عفونت لیشمانیا دخالت دارند.

۸. شغل: در ابتلاء به برخی از انگل‌های لیشمانیا مؤثر است. لیشمانیا مکزیکانا عامل ایجاد کننده *ulcer chiclero's* بیشتر در جنگل‌بانان در اثر جمع کردن صمغ دیده می‌شود.

۹. وضعیت اقتصادی و اجتماعی: معمولاً در ابتلاء به لیشمانیوز احشایی مؤثر است به طوری که این بیماری بیشتر در مناطق متراکم با درآمد کم و تغذیه ناکافی مشاهده می‌شود.

۱۰. عادات به خصوص در اهالی منطقه: استراحت و خوابیدن در هوای آزاد و خارج خانه، احداث واحدهای مسکونی در مجاورت کانون‌های لیشمانیوز و وجود شکاف و درز در آن‌ها، انبار کاه و هیزم، محل‌های سنتی نگهداری دام، اماکن مخروبه و جمع‌آوری فضولات حیوانی به جهت سوخت در مجاورت خانه-های مسکونی نیز در انتقال لیشمانیوزها مؤثر هستند [۶۸-۶۶، ۱۴، ۳، ۲].

۱۱. ایمنی میزبان در برابر لیشمانیا نوتروفیل: بعد از ورود لیشمانیا به بدن میزبان، نوتروفیل‌ها به عنوان اولین سلول‌های فاگوسیت‌کننده لیشمانیا نقش ایفا می‌کنند. نوتروفیل‌ها در اثر برخورد با پروماستیگوت فعال شده و با توجه به تولید لوکوترین B4 (LTB4) و فعال شدن NF- B

به لیشمانیوز احشایی ارتباط وجود دارد. سوءتغذیه سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحت تأثیر قرار داده که منجر به ضعف سیستم ایمنی بدن می‌شود. کمبود عناصری مانند روی (Zn)، آهن (Fe)، مس (Cu)، کلسیم (Ca)، فسفر (P) و منیزیم (Mg) کارآیی سیستم ایمنی بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تولید سایتوکاین‌های مهم IFN- و IL-12 در افرادی که سوءتغذیه دارند به میزان زیادی کاهش یافته و عملکرد NK cellها و لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئار (PMNs) و مونوسیت‌ها در این افراد بسیار ضعیف می‌باشد. در این افراد ایمنی هومورال و سیستم کمپلمان نیز کارآیی لازم را ندارد. عمل فاگوسیتوزیس در این افراد به درستی انجام نمی‌گیرد. در یک مطالعه‌ای مشخص شده کمبود آهن ایمنی سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. موش‌هایی که کمبود آهن داشتند توانایی مقابله با لیشمانیوزیس و توپرکلوزیس را نداشتند. در یک مطالعه مشخص گردید که کمبود پروتئین به عنوان یک ریسک فاکتور اولیه برای پیشرفت لیشمانیوز احشایی می‌باشد. موش‌هایی که کمبود پروتئین داشته و هم‌زمان با لیشمانیا اینفانتوم آلوده بودند، آتروفی تیموس و کاهش در جمعیت سلول‌های T تیموسی همچنین نقص ایمنی سلولی نیز داشتند. روی (Zn) به عنوان یک عنصر ضروری برای رشد و توسعه پاسخ‌های ایمنی بدن می‌باشد. کمبود این عنصر می‌تواند سلول‌های T، سلول‌های B، مونوسیت‌ها، پلی‌مورفونوکلئرها (PMNs) و NK cellها را تحت تأثیر قرار دهد. زمانی که به موش‌های آلوده با لیشمانیا ماژور سولفات روی خورنده شد، بار انگل و اندازه ضایعه ایجاد شده توسط لیشمانیا ماژور به میزان زیادی کاهش یافت همچنین میزان بیان mRNA سایتوکاین‌های مسیر Th1 افزایش یافت. در واقع سوءتغذیه و لیشمانیوز یک اثر سینرژستی بر روی کاهش کارآیی ایمنی بدن میزبان داشته و باعث پیشرفت بیشتر عفونت در بدن می‌شوند [۶۹-۷۲].

دگرانوله می‌شوند. LTb4 یک مدیاتور لپیدی بیش‌التهابی می‌باشد که توسط ۵- لیپوآکسیژناز (5-LO) تولید شده و فعالیت آنتی میکروبیال و تولید سایتوکاین توسط ماکروفاژها را افزایش می‌دهد [۷۳]. NKT: فعال شدن این سلول‌ها از طریق دو مسیر مستقیم و غیرمستقیم می‌باشد. در مسیر مستقیم بعد از اتصال TCR به CD1d همراه شده با گلیکولیپید انگل و عرضه شدن آن توسط سلول‌های دندریتیک، <sup>۱</sup>NKT cellها فعال شده و سایتوکاین‌های مختلفی از جمله IFN-، TNF و IL-13 را ترشح می‌کنند. در مسیر غیرمستقیم در اثر فعال شدن این سلول‌ها، آنتی‌ژن‌های لیشمانیا مانند LPG با تحریک TLR2 بر روی سلول‌های دندریتیک باعث تولید IL-12 یا IL-18 از APCها شده و در نتیجه با تحت تأثیر قرار دادن NKTcellها، باعث فعال شدن آن‌ها و ترشح سایتوکاین از این سلول‌ها می‌شوند [۷۴].

- ماکروفاژها در اثر مواجهه با انگل لیشمانیا ۳ نوع سایتوکاین را ترشح می‌کنند:

الف- IL-12: سیستم ایمنی را به سمت Th1 شیفت داده و باعث تولید IFN- می‌شود و در نتیجه بیمار را به سمت بهبودی پیش می‌برد.

ب- IL-1: در فرم‌های احشایی سبب ایجاد تب می‌شود.

ج- GM-CSF: براساس نظریه Saf Target باعث مهاجرت ماکروفاژهای نابالغ به محل عفونت می‌شود.

- سیستم ایمنی میزبان در اثر مواجهه با انگل لیشمانیا به یکی از مسیرهای Th1 یا Th2 شیفت پیدا می‌کند که این شیفت پیدا کردن به عوامل مختلفی از جمله تغذیه و تنظیم ژنتیکی موبوط به NK Cell و TNF بستگی دارد.

فعال شدن NK cellها یک فرآیند مولتی فاکتوریال می‌باشد که به عواملی مانند حضور سایتوکاین‌هایی مانند IL-12 و IL-18 تولید شده توسط ماکروفاژها و دندریتیک سل‌ها و فعال شدن TLR-9 و TLR-2

بستگی دارد. NK cellها از طریق LPG لیشمانیا و TLR-2 فعال شده و باعث افزایش بیان TLR-2 در سطح NK cellها می‌شوند و با تولید IFN- و TNF- نقش مهمی در محدود کردن عفونت اولیه و از بین بردن انگل‌های داخل سلولی دارند. NK cellها همچنین منبع اولیه برای تولید IFN- می‌باشند. فعال شدن TLR-2 منجر به تولید IL-12 و TNF- و نیتریک اُکساید از ماکروفاژها شده و در نتیجه پاسخ ایمنی بدن به مسیر Th1 شیفت داده می‌شود [۷۵،۷۳].

- در اثر فعال شدن Th1 سه نوع سایتوکاین ترشح می‌شود:

الف- IFN-: باعث عرضه آنتی‌ژن به ماکروفاژها و شناسایی بهتر انگل می‌شود.

ب- IL-2: این سایتوکاین علاوه بر این که لنفوسیت‌های T در حال استراحت را به حالت فعال درمی‌آورد می‌تواند یک اثر مهارری روی سلول‌های T داشته باشد. IL-2 به دلیل افزایش در سرم افراد مبتلا به لیشمانیوز احشایی می‌تواند در تشخیص لیشمانیوز احشایی در مناطق اندمیک مطرح باشد. همچنین این سایتوکاین یک فاکتور مهم در محدود کردن پاسخ سلول‌های T به IL-12 در بیماران مبتلا به لیشمانیا آمازونسیس بوده و در نتیجه باعث تعدیل پاسخ‌های ایمنی بدن میزبان می‌شود. این عملکرد مهارری IL-2 مستقل از پاسخ مسیر <sup>۲</sup>Tregها می‌باشد [۷۶،۷۷].

ج- TNF-: از T سل‌ها و فیبروبلاست‌ها ترشح شده و باعث افزایش سیتوتوکسیسیته داخل ماکروفاژ می‌شود.

- در اثر فعال شدن Th2 پنج نوع سایتوکاین ترشح می‌شود:

IL-4، IL-5 و IL-6: باعث تبدیل لنفوسیت‌های B به پلاسماسل می‌شوند.

IL-10 و IL-13: ساپرس کننده سیستم ایمنی هستند. افزایش سطح IL-10 باعث تغییر در سیگنالینگ IFN-

<sup>2</sup> Regulatory T Cell

<sup>1</sup> Natural Killer T (NKT) Cell

در سلول‌های آلوده با انگل شده و مانع از عملکرد آن می‌شود.

Treg/Th17: مسیر (Th17) سلول‌های  $CD4^+$  T باعث مقاومت در برابر لیشمانیوز می‌شود. مسیر (Treg)  $CD4+CD25+Foxp3$  باعث مهار پاسخ‌های مؤثر سایر زیر گروه‌های سلول‌های T می‌شود.

Treg: سایتوکاین‌های ترشح شده از این مسیر شامل IL-10 و TGF-B می‌باشند و مطالعات مختلف نشان داده است که تولید این سایتوکاین‌ها باعث افزایش بار انگلی و پیشرفت لیشمانیوز در بدن میزبان می‌شود [۷۸].

Th17: در اثر فعال شدن این مسیر دو سایتوکاین مهم IL-17A/F و IL-22 ترشح می‌شود. IL-17 باعث تحریک ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های دیگر از جمله CXCL-8 نیز می‌شود. CXCL-8 نوتروفیل‌ها را به محل عفونت فرا می‌خواند. سایتوکاین‌های دیگر ترشح شده توسط این مسیر شامل IL-6, IL-21, IL-17, TNF- و IFN- می‌باشند. سایتوکاین‌های ترشح شده توسط این مسیر توانایی تحریک تولید NOS-2 و متالوپروتئیناز از سلول‌های مختلف را دارند. بررسی‌ها نشان داده است که پاسخ مسیر Th17 به عنوان تکمیل‌کننده پاسخ مسیر Th1 علیه لیشمانیوز می‌باشد و نقص در ترشح سایتوکاین‌های Th17 می‌تواند باعث شکست پاسخ ایمنی بدن در برابر لیشمانیا شود. در یک مطالعه‌ای مشخص شده که در موش‌هایی که حساس به لیشمانیوز بودند سایتوکاین‌های ترشح شده از این مسیر و نوتروفیل‌ها باعث پیشرفت بیماری می‌شوند ولی در موش‌هایی که مقاومت نسبی به لیشمانیوز داشتند مسیر Th17 و نوتروفیل‌ها باعث کنترل پیشرفت بیماری می‌گردد. نتیجه این مطالعه نشان دهنده این می‌باشد که نقش مسیر Th17 در لیشمانیوز به زمینه ژنتیکی میزبان بستگی دارد [۸۰، ۷۹].

اینفلامازوم: یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی ذاتی می‌باشد که در عفونت‌های باکتریایی و ویروسی نقش

مهمی در ایجاد مقاومت علیه این عفونت‌ها دارد. در مورد نقش اینفلامازوم در لیشمانیوز در یک مطالعه‌ای مشخص گردیده که اینفلامازوم Nlrp3 در پاسخ به عفونت لیشمانیا فعال شده و فعالیت آن برای کاهش رشد و تکثیر انگل در داخل ماکروفاژ ضروری می‌باشد. IL-1 مشتق از اینفلامازوم از طریق سیگنالینگ IL-1R, MyD88 و تولید نیتریک اُکساید باعث ایجاد مقاومت در برابر عفونت لیشمانیا می‌شود. اجزای اینفلامازوم بالانس بین Th1/Th2 در عفونت لیشمانیا تنظیم می‌کنند. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که لیشمانیا مازور با فعال کردن اجزای اینفلامازوم مانند ASC, NLRP3 و کاسپاز ۱ باعث تولید IL-18 و IL-1 از ماکروفاژهای آلوده به انگل شده و به این طریق باعث تعدیل پاسخ‌های ایمنی بدن میزبان و گسترش بیشتر انگل در بدن می‌شود. همچنین IL-18 باعث تولید بیشتر IL-4 از طریق افزایش بیان GATA3 و cMAF در سلول‌های T فعال شده و فعال شدن مسیر Th2 باعث پیشرفت بیماری در بدن میزبان می‌گردد. در لیشمانیا مکزیکانا نیز سایتوکاین IL-18 و IL-4 باعث پیشرفت بیماری در بدن میزبان می‌شود. بنابراین IL-18 می‌تواند به عنوان هدف درمانی مورد توجه قرار گیرد [۸۴-۸۱].

IgE: امروزه ترشح IgE در لیشمانیوز احشایی اثبات شده است. IgE اختصاصی ضد لیشمانیوز احشایی فقط در مبتلایان به این بیماری وجود دارد که یکی از شاخص‌های فعال شدن Th2 می‌باشد [۳، ۳۳، ۴۲].

۱۲- سیستم MHC: بر اساس مطالعات انجام گرفته نقش HLA-BW22, HLA-A28, HLA-CW7, HLA-DQW8, HLA-DR و HLA-DQW3 در لیشمانیوز جلدی، HLA-A11, HLA-B5 و HLA- در B7 در فرم منتشر لیشمانیوز جلدی، HLA-DQW3, HLA-BW22 در لیشمانیوز جلدی- مخاطی و HLA-A28 و HLA-DR در لیشمانیوز احشایی ثابت شده است [۸۵-۸۸].

به طور غیرمستقیم تأثیر دارد. در هندوستان بیماری در ارتفاعات بیش از دو هزار پا به طور اندمیک اتفاق می‌افتد.

#### ۸. تغییرات دوره‌ای آب و هوا

با توجه به این که مسائل بهداشت عمومی و انتشار بیماری‌ها با جغرافیای منطقه رابطه مستقیم دارند لذا استفاده از سیستم اطلاعات جغرافیایی<sup>۲</sup> GIS می‌تواند نقش مهمی در کنترل بیماری‌ها داشته باشد [۹۲، ۹۱، ۱۴، ۳، ۲].

#### - اتصال و ورود انگل‌های لیشمانیا به سلول میزبان

پروماستیگوت‌های نارس در خارج سلول در بدو ورود به وسیله سیستم کمپلمان از بین می‌روند. پروماستیگوت‌های رسیده به کمک جزء C3b سیستم کمپلمان به گیرنده C3b در سطح ماکروفاژها متصل می‌شوند. در سال ۱۹۷۶ لیشمانیا دونوانی را در فاگولیزوزوم‌های سلول‌های فاگوسیت‌هامستر مشاهده کردند. امروزه مشخص شده که علاوه بر نوتروفیل، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها نیز می‌توانند تا حدودی عمل فاگوسیتوز را انجام دهند. لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا مکزیکانا در مجاورت سیتوکالازین (که از عمل بیگانه خواری جلوگیری می‌کند) توانایی ورود به سلول‌های صفاق موش را ندارند. انگل قادر است وارد دیواره سلول‌های سارکومال سگ که فعالیت بیگانه خواری ندارند شود و تکثیر یابد ولی علت این که وارد ماکروفاژ می‌شود هنوز مشخص نیست. در ضمن آماستیگوت سریع‌تر از پروماستیگوت به ماکروفاژ وارد می‌شود که احتمالاً به لحاظ داشتن اندازه کوچکتر و تحرک کمتر آماستیگوت‌ها باشد. وجود انگل در ماکروفاژها عفونت مداوم و پایداری ایجاد می‌کند و نیز باعث تکثیر و رهاسدن انگل می‌شود در حالی که در بقیه سلول‌ها خود به خود محدود می‌گردد. پروماستیگوت‌ها با هر دو طرف فلاژل دار و بدون فلاژل می‌توانند به سلول میزبان وصل شوند. در لیشمانیا دونوانی اتصال به سلول‌های

لیشمانیوز در افراد ایمونوساپرس: بررسی‌ها نشان داده است در افرادی که به دلایل مختلف مانند ابتلا به بیماری ایدز، دریافت پیوند عضو و سرطان دچار ضعف سیستم ایمنی شده‌اند، لیشمانیوز به فرم‌های غیرمعمول مانند DCL<sup>۱</sup> تبدیل می‌شود. در سال ۲۰۱۰ فرم منتشره لیشمانیوز با عامل لیشمانیا تروپیکا از دو بیمار مبتلا به ایدز گزارش گردید. همچنین در یک گزارش مورد در سال ۲۰۱۸ مشخص شد که در اثر ضعف سیستم ایمنی بدن میزبان به علت مصرف بی‌رویه داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی، فرم غیرمعمول DCL از لیشمانیوز توسط لیشمانیا ماژور ایجاد می‌شود. به دلیل ایجاد نقص در تشکیل پاسخ ایمنی سلولی در بدن میزبان، انگل سریع تکثیر شده و به صورت فرم منتشر در قسمت‌های مختلف بدن میزبان ایجاد ضایعه می‌کند [۹۰، ۸۹].

#### د- عوامل مربوط به محیط

۱. درجه حرارت هوا: برای کالآزار باید ماگزیم متوسط حرارت ماهیانه پایین‌تر از  $38^{\circ}\text{C}$  و متوسط حرارت مینیمم ماهیانه بالاتر از  $7^{\circ}\text{C}$  باشد و به طور کلی متوسط سالیانه نباید به کمتر از  $11^{\circ}\text{C}$  برسد.
۲. رطوبت نسبی هوا: سالیانه نباید کمتر از ۷۰ درصد باشد.
۳. میزان بارندگی و توزیع آن: میزان بارندگی سالیانه بیش از ۱۲۵ میلی‌متر مورد لزوم است که البته این مقدار در انواع مختلف لیشمانیوزها متفاوت است.
۴. نوع پوشش گیاهی.
۵. باد و شدت آن: باد سبب تبخیر سطحی آب شده و رطوبت منطقه را تأمین می‌نماید. همچنین روی محصولات ارگانیک مورد نیاز برای رشد و تکثیر پشه خاکی‌ها در دوران لاروی حشره در محل‌های رشد ونمو آن تأثیر می‌گذارد.
۶. جنس خاک: در زاد و ولد پشه خاکی‌ها تأثیر دارد.
۷. ارتفاع از سطح دریا: به علت تأثیر در حرارت محیط و این که هر قدر بیشتر شود حرارت کاهش می‌یابد،

<sup>۲</sup> Geographical Information System

<sup>۱</sup> Diffuse Cutaneous Leishmaniasis

ماژور و یا انتهایی در GIPL-1 لیشمانیا ماژور وجود داشته باشد.

- استفاده از گیرنده‌های CR1 و CR3 به بقای انگل کمک می‌کند چرا که این گیرنده‌ها شروع کننده و پیش‌برنده فاکوسیتوز بدون انفجار تنفسی هستند. علاوه بر آن مسدود کردن CR3 مانع تولید IL-12 (مدیاتور کلیدی CMI) شده و بنابراین شروع فرآیند به صورت ساکت انجام می‌گیرد [۹۳، ۳۹، ۱۴-۹۵].

- اگرچه ماکروفاژ به عنوان سلول اصلی میزبان انگل محسوب می‌شود ولی نوتروفیل‌ها به عنوان اولین سلول‌های آلوده شده بعد از مواجهه با انگل می‌باشند. نوتروفیل‌ها با تولید کموکاین‌هایی مانند MIP-1b باعث فراخوانی ماکروفاژها به محل آلودگی می‌شوند. در مرحله بعد ماکروفاژها به راحتی نوتروفیل‌های آلوده با انگل را فاکوسیت کرده و باعث ترشح TNF- می‌شوند. به این طریق لیشمانیا به راحتی از طریق نوتروفیل‌ها وارد سلول میزبان نهایی خود می‌شود [۹۶].

**- مکانیسم‌های اصلی دفاعی در برابر ورود انگل لیشمانیا به ماکروفاژ**

۱. در اثر فاکوسیتوز یک عامل خارجی، NADPH اکسیداز در غشاء پلاسمائی فعال می‌شود و این آنزیم پروتون‌ها را به اکسیژن مولکولی می‌رساند و سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل و آب اکسیژنه در محل فاکوسیتوز ایجاد می‌کند که این رادیکال‌ها با غشاء فسفولیپیدی پاتوژن و ماکرومولکول‌ها وارد واکنش می‌شوند.

۲. اسیدی شدن: وقتی که فاکوزوم با اندوزوم به هم پیوست و زیکول ایجاد شده به وسیله آنزیمی به نام Proton ATPase اسیدی گشته و pH پایین باعث دنا توره شدن پروتئین‌ها می‌شود.

۳. هضم: بعد از به هم پیوستن اندوزوم با لیزوزوم و هیدرولیز اسیدی، پروتئین‌ها، DNA، RNA و کربوهیدرات‌ها تجزیه می‌شوند.

J774G8 به وسیله آنتی‌بادی ضد گلیکوپروتئین واقع در فلاژل محدود می‌شود. بر اساس نظریات قبلی ورود لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا دونوانی به سلول میزبان از طریق ایجاد شدن مجرای قیف مانندی در سطح سلول است در حالی که ورود لیشمانیا برازیلینسیس از طریق میکروپینوسیتوزیس مانند اپی کمپلکس‌ها می‌باشد ولی امروزه مطرح شده که بیشتر پروماستیگوت‌ها در هنگام ورود به سلول به شکل حلقوی درمی‌آیند [۹۳، ۳۹، ۱۴، ۳، ۲].

- ورود لیشمانیا به ماکروفاژ از چهار راه امکان‌پذیر است:

۱. اتصال لیشمانیا به ماکروفاژها از طریق LPG، GP63 و PPG در سطح پروماستیگوت و گیرنده‌های CR1، CR3(MAC1)، P95، P150، گیرنده فیبرونکتین و مانوز فوکوز رسپتور (MFR) از ماکروفاژها صورت می‌گیرد. LPG به طور عمده از طریق اتصال به C3b باعث برداشت انگل می‌شود.

۲. آپسونیزاسیون به وسیله CRP که به واحدهای 1- Gal(1-4)Man(po4) از پروماستیگوت متاسیکلیک متصل شده و از طریق گیرنده‌های FC R1 و FC R2 وارد ماکروفاژ می‌شود.

۳. ماکروفاژها فیبرونکتین تولید می‌کنند و باعث آپسونیزه شدن انگل و تسهیل در ورود آن به وسیله گیرنده‌های فیبرونکتین موجود در سطح ماکروفاژ می‌شوند.

۴. ورود مستقیم از طریق آنتی‌ژن‌های سطحی:

-D- گالاتوفورانوز (-D-Galf) یکی از آنتی‌ژن‌های موجود در سطح انگل‌های لیشمانیا می‌باشد که در ورود مستقیم انگل به داخل سلول نقش دارد. براساس مطالعات انجام شده -D- گالاتوفورانوز (-D-

Galf) را در قارچ‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها از جمله تریپانوزوماتیده‌ها یافته‌اند. همچنین این آنتی‌ژن در لیشمانیاها می‌تواند در ناحیه غیرانتهایی مثل LPG پروماستیگوت‌ها و نیز GIPL-3 و GIPL-2 از لیشمانیا

سلولی به نام اینتگرین متصل می‌شود و با بسیاری از پروتئین‌های بیرون سلولی برهمکنش دارد. فیبرونکتین به عنوان آپسونین نیز عمل می‌کند و توانایی فاگوسیتوز سلول‌های فاگوسیت‌کننده را افزایش می‌دهد. ماکروفاژها از طریق چندین گیرنده با دومین‌های مختلف فیبرونکتین ارتباط برقرار می‌کنند. متصل شدن ماکروفاژ به فیبرونکتین باعث افزایش تولید IFN- و IL-12 می‌شود [۹۷].

### نتیجه‌گیری

لیشمانیوز یکی از مهمترین معضلات بهداشتی در سطح دنیا می‌باشد. وقوع لیشمانیوز به شاخص‌هایی از جمله ویرولانسی گونه لیشمانیا، ژنتیک و پاسخ ایمنی سلول میزبان بستگی دارد. علی‌رغم پیشرفت‌هایی که در زمینه کنترل بیماری و فراهم شدن امکانات آزمایشگاهی در تأیید و تشخیص عفونت‌های انگلی حاصل شده اما به دلایل مختلف به خصوص افزایش مقاومت دارویی و مقاوم شدن ناقلین به سموم حشره‌کش، لیشمانیوزها همچنان از شایعترین عفونت‌ها به خصوص در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شوند. همچنین انگل‌های با ویرولانسی زیاد قادرند سلول‌های بیشتری از میزبان را آلوده کنند و با قدرت تکثیر زیاد در سلول‌ها باعث انهدام تعداد زیادی از سلول‌های میزبان، گسترش ضایعه و ایجاد زخم‌های وسیع شوند. بنابراین با شناخت دقیق مکانیسم‌های بیماری‌زایی انگل، برنامه‌ریزی در زمینه کنترل و مبارزه با انگل مؤثرتر بوده و برای این منظور طراحی و انجام مطالعات جامع و کامل در زمینه‌های مختلف لیشمانیوز و پاتوژن‌های انگل‌های لیشمانیا به خصوص در مناطق اندمیک ضروری به نظر می‌رسد.

۴. تولید نیتریک اُکساید به وسیله آنزیم iNOs در ماکروفاژها [۹۳، ۴۰، ۱۴].

### - استراتژی‌های انگل برای مقاومت در برابر مکانیسم‌های دفاعی ماکروفاژها

۱. سوپراکسید دیسموتاز اولین واکنش و پاسخ انگل به انفجار تنفسی است. این آنزیم با رادیکال‌های سوپراکسید ترکیب شده و باعث ایجاد اکسیژن مولکولی و پراکسید هیدروژن می‌شود. همچنین  $H_2O_2$  به وسیله آنزیم کاتالاز تجزیه شده و اکسیژن و آب تشکیل می‌دهد.

۲. تریپانوتیون ردوکتاز: تریپانوتیون<sup>۱</sup> در لیشمانیا و تریپانوزوم‌ها وجود دارد و از دو مولکول گلوکاتیون که به دو انتهای آمینی اسپرمیدین<sup>۲</sup> اتصال یافته تشکیل شده است. تریپانوتیون ردوکتاز آنزیم کلیدی است که باعث می‌شود تریپانوتیون اکسیده به حالت احیا تبدیل شود. این روند باعث کاهش گلوکاتیون شده و در نهایت یک مسیر مهمی در برابر فعالیت‌های اکسیداتیو ایجاد می‌گردد.

۳. استفاده از ترکیبات گلیکوزیدی سطحی که مهمترین آنها LPG و GP63 می‌باشند [۴۲، ۴۰، ۱۷، ۱۴].

۴. استفاده از پروتئین کینازها: لیشمانیا ماژور قادر به تولید یک سری پروتئین کینازهایی است که با فسفریله کردن اجزای کمپلمان مانند C3، C5 و C9 باعث مهار فعالیت سیستم کمپلمان می‌شود.

۵. انگل با تخریب فیبرونکتین ترشح سایتوکاین‌هایی مانند IFN- و IL-12 از ماکروفاژهای آلوده و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد، اکسیژن و نیتروژن را کاهش می‌دهد. فیبرونکتین یکی از گلیکوپروتئین‌های با وزن مولکولی بالا می‌باشد که به پروتئین‌های سطح

<sup>1</sup> Tripanothion

<sup>2</sup> Spermidine

### References

- 1- Mohebbali M. Visceral leishmaniasis in Iran: review of the epidemiological and clinical features. Iran J Parasitol. 2013 Jul; 8(3): 348-358.

- 2- 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 Sep; 33(10): 1027-1034.
- 3- Kamhawi S. Phlebotomine sandflies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006 Sep; 22(9): 439-445.
- 4- Hadighi R, Mohebalı M, Boucher P, Hajjara n H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 2006 May; 3(5): e162.
- 5- Loeuillet C, Bañuls A-L, Hide M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit Vectors.* 2016 Mar; 9(1): 144.
- 6- Mohebalı M, Javadian E, Yaghoobi Ershadi M, Akhavan A, Hajjara n H, Abaei M. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J.* 2004 Jul-Sep; 10(4-5): 591-599.
- 7- Gavga ni ASM, Mohite H, Edrissian GH, Mohebalı M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Nov; 67(5): 511-515.
- 8- Yaghoobi-Ershadi M, Hanafi-Bojd A, Akhavan A, Zahrai-Ramazani A, Mohebalı M. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Ardestan town, central Iran. *Acta Trop.* 2001 May; 79(2): 115-121.
- 9- Amanzadeh Y, Izaddoost M, Soltanpoor A, Mahami M, Taheri M, Khalifeh Gholi M, et al. Inhibit effect of *Allium hirtifolium boiss.* (Persian shallot) hydroalcoholic extract on the growth of *Leishmania infantum* in vitro. *J Med Plants.* 2006; 5(20): 48-52+7. [Full text in Persian]
- 10- Mahami M, Mohebalı M, Keshavarz H, Zareei Z. Comparison of direct agglutination test (DAT), indirect immunofluorescent antibody (IFAT) and ELISA in diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2008; 8(1): 77-83. [Full text in Persian]
- 11- Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol.* 1998 Jan; 28(1): 121-134.
- 12- Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Apr; 18(2): 293-305.
- 13- Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001 Jan; 166(2): 1141-1147.
- 14- Rittig M, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today.* 2000 Jul; 16(7): 292-297.
- 15- Sacks DL, Modi G, Rowton E, Späth G, Epstein L, Turco SJ, et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci.* 2000 Jan; 97(1): 406-411.
- 16- Mukhopadhyay S, Mandal C. Glycobiology of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res.* 2006 Mar; 123(3): 203-220.
- 17- Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Oct; 1455(2-3): 341-352.
- 18- Mensa-Wilmot K, Garg N, McGwire B, Lu H-G, Zhong L, Armah D, et al. Roles of free GPIs in amastigotes of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Mar; 99(1):103-116.
- 19- Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology.* 2001 Apr; 11(4): 45R-59R.
- 20- Buschiazzo A, Muiá R, Larrieux N, Pitcovsky T, Mucci J, Campetella O. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog.* 2012 Jan; 8(1): e1002474.
- 21- Casgrain P-A, Martel C, McMaster WR, Mottram JC, Olivier M, Descoteaux A. Cysteine peptidase B regulates *Leishmania mexicana* virulence through the modulation of GP63 expression. *PLoS Pathog.* 2016 May; 12(5): e1.005658.
- 22- Späth GF, Garraway L, Turco SJ, Beverley SM. The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Aug; 100(16): 9536-9541.

- 23- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Aug; 130(2): 65-74.
- 24- Descoteaux A, Turco SJ. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect*. 2002 Jul;4(9): 975-981.
- 25- Ilg T. Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage-and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. *Med Microbiol Immunol*. 2001 Nov; 190(1-2): 13-17.
- 26- Turco SJ, Späth GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol*. 2001 May; 17(5): 223-226.
- 27- Späth GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci*. 2000 Aug; 97(16): 9258-9263.
- 28- Beverley SM, Turco SJ. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol*. 1998 Jan; 6(1): 35-40.
- 29- Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1992; 46(1): 65-92.
- 30- Rosenberger CM, Brumell JH, Finlay BB. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol*. 2000 Nov; 10(22): R823-R825.
- 31- 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 Jul; 12(7): 906-918.
- 32- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Nov; 132(1): 1-16.
- 33- Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang K-P, Mosser DM. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun*. 1999 Sep; 67(9): 4477-4484.
- 34- de Celis HÁ, Gomez CP, Descoteaux A, Duplay P. Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during *Leishmania major* infection. *Microbes Infect*. 2015 Apr; 17(4): 285-294.
- 35- Soares RP, Altoé ECF, Ennes-Vidal V, da Costa SM, Rangel EF, de Souza NA, et al. In vitro inhibition of *Leishmania* attachment to sandfly midguts and LL-5 cells by divalent metal chelators, anti-gp63 and phosphoglycans. *Protist*. 2017 Jul; 168(3): 326-334.
- 36- Rachidi N, Taly JF, Durieu E, Leclercq O, Aulner N, Prina E, et al. Pharmacological assessment defines *Leishmania donovani* casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Mar; 58(3): 1501-1515.
- 37- Baghaei M, Mesripour M. Characterization of acid phosphatase in the promastigotes of three isolates of *Leishmania major*. *Iran J Med Sci*. 2003 Oct; 28(1): 1-8.
- 38- Navabi A, Soleimanifard S. Enzymatic characterization of acid phosphatase in the logarithmic and stationary phase of *Leishmania major* promastigotes. *Shiraz E-Med J*. 2015 Jan; 16(1): e26246.
- 39- Waller RF, McConville MJ. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol*. 2002 Nov; 32(12): 1435-1445.
- 40- Burchmore RJ, Barrett MP. Life in vacuoles—nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol*. 2001 Oct; 31(12):1311-1320.
- 41- Dermine JF, Scianimanico S, Prive C, Descoteaux A, Desjardins M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol*. 2000 Apr; 2(2): 115-126.
- 42- Mosser DM, Rosenthal LA. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol*. 1993 Oct; 45(5): 315-322.
- 43- Amit A, Chaudhary R, Yadav A, Suman SS, Narayan S, Das V, et al. Evaluation of *Leishmania donovani* disulfide isomerase as a potential target of cellular immunity against visceral leishmaniasis. *Cell Immunol*. 2014 May-Jun; 289(1-2): 76-85.



- 44- Ben Khalaf N, De Muylder G, Louzir H, McKerrow J, Chenik M. *Leishmania major* protein disulfide isomerase as a drug target. *Parasitol Res.* 2012 May; 110(5): 1911-1917.
- 45- Rogers M, Kropf P, Choi B-S, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, et al. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* 2009 Aug; 5(8): e1000555.
- 46- Badirzadeh A, Taheri T, Abedi-Astaneh F, Taslimi Y, Abdossamadi Z, Montakhab-Yeganeh H, et al. Arginase activity of *Leishmania* isolated from patients with cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2017 Sep; 39(9): e12454.
- 47- Badirzadeh A, Taheri T, Taslimi Y, Abdossamadi Z, Heidari-Kharaji M, Gholami E, et al. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jul; 11(7): e0005774.
- 48- Grzyb K, Czarnota A, Brzozowska A, Cie lik A, R balski Ł, Tyborowska J, et al. Immunogenicity and functional characterization of *Leishmania*-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *Sci Rep.* 2016 Aug; 6: 30627.
- 49- Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science.* 2011 Feb; 331(6018): 775-778.
- 50- Hartley M-A, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Jul; 2: 99.
- 51- Hajjaran H, Mahdi M, Mohebbali M, Samimi-Rad K, Ataei-Pirkooh A, Kazemi-Rad E, et al. Detection and molecular identification of *leishmania* RNA virus (LRV) in Iranian *Leishmania* species. *Arch Virol.* 2016 Dec; 161(12): 3385-3390.
- 52- Foth B, Piani A, Curtis JM, Ilg T, McConville M, Handman E. *Leishmania major* proteophosphoglycans exist as membrane-bound and soluble forms and localise to the cell membrane, the flagellar pocket and the lysosome. *Int J Parasitol.* 2002 Dec; 32(14): 1701-1708.
- 53- Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* 2003 Mar; 25(3): 127-134.
- 54- Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol.* 2001 Nov; 167(9): 5226-5230.
- 55- Moro O, Lerner EA. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem.* 1997 Jan; 272(2): 966-970.
- 56- Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.* 2000 Nov; 2(14): 1765-1773.
- 57- Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, et al. Toward a defined anti-*leishmania* vaccine targeting vector antigens. *J Exp Med.* 2001 Aug; 194(3): 331-342.
- 58- Bezerra HSdS, Teixeira MJ. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 Apr; 96(3): 349-351.
- 59- erná P, Mikeš L, Volf P. Salivary gland hyaluronidase in various species of *phlebotomine* sand flies (Diptera: psychodidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 2002 Dec; 32(12): 1691-1697.
- 60- Jacobson RL, Schlein Y. *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major* parasites express  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -glucosidase. *Acta Trop.* 2001 Jan; 78(1): 41-49.
- 61- Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci.* 1999 Dec; 96(26): 15155-15160.
- 62- Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.* 2000 Jul; 22(7): 319-331.
- 63- Ferreira MG, Fattori KR, Souza F, Lima VM. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol.* 2009 Oct; 165(1-2): 150-154.
- 64- Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol.* 2011 Apr; 27(4): 155-159.

- 65- Rakhshanpour A, Malmasi A, Mohebbali M, Nabian S, Mirhendi H, Zarei Z, et al. Transmission of *Leishmaniainfantum* by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs. Iran J Parasitol. 2017 Oct-Dec; 12(4): 482-489.
- 66- Mahami M, Mohebbali M, Keshavarz H, Hajaran H, Akhoondi B, Zarei Z, et al. A seroepidemiological survey of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Germe district, Ardabil Province. J Sch Public Health Inst Public Health Re. 2006; 4(1): 45-55. [Full text in Persian]
- 67- Soleimanzadeh G, Edrissian GH, Movahhed-Danesh A, Nadim A. Epidemiological aspects of kala-azar in Meshkin-Shahr, Iran: human infection. Bull World Health Organ. 1993; 71(6): 759.
- 68- Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. Infect Immun. 2002 May; 70(5): 2288-2296.
- 69- Malafaia G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. Parasite Immunol. 2009 Oct; 31(10): 587-596.
- 70- Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Cuervo-Escobar S, Berbert LR, Porrozzi R, Morgado FN, et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. Sci Rep. 2017 Apr; 7: 45991.
- 71- Afshari M, Riazi-Rad F, Khazev, Bahrami F, Ajdary S, Alimohammadian MH. Oral treatment with zinc sulfate increases the expression of Th1 cytokines mRNA in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. Cytokine. 2016 May; 81: 71-76.
- 72- Pasa S, Kargin F, Bildik A, Seyrek K, Ozbel Y, Ozensoy S. Serum and hair levels of zinc and other elements in dogs with visceral leishmaniasis. Biol Trace Elem Res. 2003 Aug; 94(2): 141-147.
- 73- Tavares N, Afonso L, Suarez M, Ampuero M, Prates DB, Araújo-Santos T, et al. Degranulating neutrophils promote leukotriene B4 production by infected macrophages to kill *Leishmania amazonensis* parasites. J Immunol. 2016 Feb; 196(4):1865-1873.
- 74- Zamora-Chimal J, Hernández-Ruiz J, Becker I. NKT cells in leishmaniasis. Immunobiology. 2017 Apr; 222(4): 641-646.
- 75- Prajeeth CK, Haeberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. Infect Immun. 2011 Jul; 79(7): 2699-2708.
- 76- Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, SánchezC, García-Martínez J, Lacombe D, San Martin JV, et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. Clin Microbiol Infect. 2016 Aug; 22(8): 739.
- 77- Ramer-Tait AE, Petersen CA, Jones DE. IL-2 limits IL-12 enhanced lymphocyte proliferation during *Leishmania amazonensis* infection. Cell Immunol. 2011 Jan; 270(1): 32-39.
- 78- Bhattacharya P, Ghosh S, Ejazi SA, Rahaman M, Pandey K, Ravi Das VN, et al. Induction of IL-10 and TGF from CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells correlates with parasite load in Indian kala-azar patients infected with *Leishmania donovani*. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Feb; 10(2): e0004422.
- 79- Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. J Clin Invest. 2009 Aug; 119(8): 2379-2387.
- 80- Pedraza-Zamora CP, Delgado-Domínguez J, Zamora-Chimal J, Becker I. Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. Parasite Immunol. 2017 Apr; 39(4): e12420.
- 81- Gurung P, Karki R, Vogel P, Watanabe M, Bix M, Lamkanfi M, et al. An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. J Clin Invest. 2015 Mar; 125(3): 1329-1338.
- 82- Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, et al. Inflammasome-derived IL-1 production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. Nat Med. 2013 Jul; 19(7): 909-915.
- 83- Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. Immunol Rev. 2015 May; 265(1): 156-171.
- 84- Bryson KJ, Wei XQ, Alexander J. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. Microbes Infect. 2008 Jun; 10(7): 834-839.

- 85- Petzl-Erler ML, Belich ME, Queiroz-Telles F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Hum Immunol*. 1991 Dec; 32(4): 254-260.
- 86- Lara ML, Layrisse Z, Scorza JV, Garcia E, Stoikow Z, Granados J, et al. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis: study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. *Hum Immunol*. 1991 Feb; 30(2): 129-135.
- 87- Lal S, Bimal S, Sinha AN, Prasad LS. Role of HLA-DR antigen on T-cell activation in visceral leishmaniasis. *Indian J Exp Biol*. 1991 Dec; 29(12): 1101-1103.
- 88- Barbier D, Demenais F, Lefait JF, David B, Blanc M, Hors J, et al. Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Kmmarkers. *Tissue Antigens*. 1987 Aug; 30(2): 63-67.
- 89- Jafari S, Hajiabdolbaghi M, Mohebbali M, Hajjaran H, Hashemian H. Disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in HIV-positive patients in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*. 2010 Mar; 16(3): 340-343.
- 90- Hashemi SA, Badirzadeh A, Sabzevari S, Nouri A, Seyyedini M. First case report of atypical disseminated cutaneous leishmaniasis in an opium abuser in Iran. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018; 60: e5.
- 91- Badirzadeh A, Mohebbali M, Asadgol Z, Soong L, Zeinali M, Mokhayeri Y, et al. The burden of leishmaniasis in Iran, acquired from the global burden of disease during 1990–2010. *Asian Pac J Trop Dis*. 2017; 7(9): 513-518.
- 92- Abedi-Astaneh F, Hajjaran H, Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Mohebbali M, Shirzadi MR, et al. Risk mapping and situational analysis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of central Iran: a GIS-based survey. *PLoS One*. 2016 Aug; 11(8): e0161317.
- 93- Lang T, Hellio R, Kaye PM, Antoine JC. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci*. 1994 Aug; 107(8): 2137-2150.
- 94- Suzuki E, Tanaka AK, Toledo MS, Takahashi HK, Straus AH. Role of  $\alpha$ -D-galactofuranose in *Leishmania major* macrophage invasion. *Infect Immun*. 2002 Dec; 70(12):6592-6596.
- 95- Bodman-Smith KB, Mbuchi M, Culley FJ, Bates PA, Raynes JG. C-reactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. *Parasite Immunol*. 2002 Sep-Oct; 24(9-10): 447-454.
- 96- Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*. 2000 Jul; 165(2): 969-977.
- 97- de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite :*Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors*. 2016 May; 9(1): 264.