

## تحقیقی

# اولین گزارش از کوتاه‌ترین زنجیره پروتئینی سیستمین پروتئاز B در کمپلکس لیسمانیا دنووانی و تفسیرهای بیوانفورماتیکی در ارتباط با این موتاسیون

ناصح ملکی راواسان<sup>۱</sup>، دکتر مالوریه هاید<sup>۲</sup>، دکتر عزت الدین جوادیان<sup>۳</sup>، دکتر محمدعلی عشاقی<sup>۴\*</sup>، دکتر جاوید صدراپی<sup>۵</sup>

۱- کارشناس ارشد انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ۲- استاد گروه انگل‌شناسی، انستیتو تحقیقات ژنتیک و تکامل بیماری‌های عفونی دانشگاه موتیولیر فرانسه. ۳- استاد گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۴- دانشیار گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۵- دانشیار گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

## چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری کالآزار یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در شمال غربی کشور می‌باشد. لیسمانیا اینفانتوم و لیسمانیا دنووانی هر دو متعلق به کمپلکس دنووانی و مسبب لیسمانیز احشایی در کانون‌های مختلف دنیا هستند. در این مطالعه از ژن سیستمین پروتئاز B (CPB) انگل‌های لیسمانیای جدا شده از پشه‌های خاکی برای تعیین هویت و بررسی خصوصیات ملکولی انگل در سطح اسیدنوکلئیک و اسیدآمین استفاده گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه آزمایشگاهی بخشی از ژن CPB انگل‌های لیسمانیا به طول ۷۰۲-۷۴۱ جفت باز به کمک واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر و تعیین توالی شدند. سپس خصوصیات ملکولی آنها از قبیل جایگاه‌های دارای پتانسیل گلیگوزیلاسیون، محل‌های اتصال سلول‌های B و T و تاثیر جهش در ساختار سه بعدی پروتئین‌های حاصله به کمک نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** از ۳۴۷۷ پشه خاکی بررسی شده، ۷ نمونه با واکنش PCR ژن سیستمین پروتئاز B مثبت شدند. همچنین بر اساس یافته‌های این مطالعه در شمال غربی ایران هر دو عضو کمپلکس دنووانی یعنی *L.donovani* و *L.infantum* توسط پشه‌های خاکی فلپتوموس پرفیلیوس ترانسکوکاریکوس منتقل شده‌اند. بررسی توالی‌های DNA انگل‌ها نشان داد که یک نوکلئوتید سیتوزین به توالی ژن CPB گونه دنووانی اضافه شده است که این امر باعث تغییر چهارچوب ترجمه به اسیدآمین، ظهور یک کدون توقف (TGA) در هفت کدون پایین‌تر و توقف عملیات ترجمه شده است. در نتیجه یک زنجیره پپتیدی خیلی کوتاه به طول ۷۶ اسیدآمین ایجاد شده که بسیار کوتاه‌تر از زنجیره پپتیدی طبیعی به طول ۲۳۴-۲۴۷ اسیدآمین در سایر استرین‌های لیسمانیا دنووانی کمپلکس می‌باشد. بررسی توالی‌های پروتئینی نشان داد که هیچ کدام از سه جایگاه گلیگوزیلاسیون و اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T در پروتئین کوتاه استرین لیسمانیا دنووانی ایران وجود ندارد.

**نتیجه‌گیری:** زنجیره پروتئینی حاصل شده از نمونه‌های دنووانی ایران کوتاه‌ترین زنجیره پپتیدی این کمپلکس است که تا به حال در دنیا گزارش شده است. به نظر می‌رسد که کوتاه شدن زنجیره پپتیدی CPB می‌تواند در ارتباطات بین انگل-ناقل و نیز انگل-میزبان تاثیرگذار باشد. با توجه به اهمیت ژن سیستمین پروتئاز B در برهم‌کنش انگل و سلول‌های میزبان و نقش کلیدی آن در ایجاد عفونت و گسترش بیماری کالآزار، لازم است تا مطالعات بیشتری در مورد انگل لیسمانیا دنووانی جدا شده و پروتئین کوتاه آن انجام شود تا اپیدمیولوژی و سیمای واقعی بیماری کالآزار در ایران کامل شود.

**کلید واژه‌ها:** کمپلکس دنووانی، کالآزار، ژن سیستمین پروتئاز B، کنش متقابل انگل و میزبان، ایران

\* نویسنده مسئول: دکتر محمدعلی عشاقی، پست الکترونیکی: [moshaghi@sina.tums.ac.ir](mailto:moshaghi@sina.tums.ac.ir)

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، تلفن: ۸۸۹۵۱۳۹۳ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۹۵۱۳۹۳

وصول مقاله: ۸۸/۳/۶، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۳

## مقدمه

لیشمانیوزها مجموعه‌ای از بیماری‌ها هستند که توسط انگل‌های داخل سلولی اجباری تاژکدار متعلق به جنس لیشمانیا ایجاد می‌شوند. از ۳۰ گونه انگل لیشمانیای نامگذاری شده؛ حدود ۱۰ گونه آن از لحاظ پزشکی و دامپزشکی حائز اهمیت است (۱). این بیماری‌ها به صورت آندمیک در تمام نقاط جهان (به غیر از اقیانوسیه و استرالیا) حضور داشته و بار تحمیلی (DALYs) آنها ۲۳۵۷۰۰۰ مورد ناتوانی و ۵۹۰۰۰ مورد مرگ و میر در سال گزارش شده است (۲). این بیماری‌ها به صورت سندرم‌هایی از زخم‌های جلدی خودبه‌خود بهبود شونده تا علائم احشایی کشنده ظاهر می‌شوند. اشکال احشایی لیشمانیوز عمدتاً توسط *Leishmania donovani* complex به خصوص *L.d. infantum* و *L.d. donovani* ایجاد می‌شوند. این دو گونه انگل اپیدمیولوژی، اکولوژی و پاتولوژی متفاوتی دارند. *L.d. infantum* انگلی آنتروپوزونوتیک با مخزن حیوانی سگ‌سانان قادر به ایجاد بیماری‌های جلدی و احشایی است؛ در حالی که *L.d. donovani* انگلی آنتروپونوتیک می‌باشد و اساساً شکل احشایی بیماری را ایجاد می‌نماید. با توجه به اپیدمیولوژی و اکولوژی بیماری از جمله عامل، ناقل، و مخزن بیماری و نیز گروه‌های سنی درگیر، بیماری به چهار تیپ هندی، مدیترانه‌ای، آفریقایی و آمریکایی تقسیم می‌شود (۳). لیشمانیوز احشایی در ایران از نوع Zoonotic Visceral Leishmaniasis و تیپ مدیترانه‌ای است که در تمام کشور به جز سیستان و بلوچستان به صورت اسپورادیک وجود دارد (۴). چهار کانون عمده بیماری استان‌های اردبیل (مشکین‌شهر، گرمی و اردبیل) فارس (قیر، کارزین، جهرم، فیروزآباد و مرودشت) آذربایجان شرقی (اهر، کلیبر و آذرشهر) و بوشهر (بrazجان و خورموج) می‌باشند (۵).

در سال‌های اخیر از روش‌های ملکولی به‌ویژه PCR در سطح وسیعی برای تعیین آلودگی استفاده می‌شود. این روش حساسیت بیشتری نسبت به روش میکروسکوپی دارد. تا به حال از بخش‌های مختلفی از ژنوم انگل مانند 18S-rRNA، Small (Miniexon، subunit ribosomal RNA) SSUrRNA، GP63 gene،  $\beta$ -tubulin gene، derived RNA

ITS (Internal transcribed spacer) و کینتوپلاست kDNA استفاده شده است (۱۸-۶).

Hide (۱۹) با طراحی پرایمر اختصاصی بر اساس ژن CPBs توانست؛ اعضای کمپلکس دنووانی را از سایر لیشمانیاها و نیز بین دو انگل لیشمانیا دنووانی و لیشمانیا اینفانتوم متمایز کند. به تازگی عشاقی (۲۰) روشی جدید با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و نیز آنزیم‌های محدود کننده برای تفکیک لیشمانیا دنووانی و لیشمانیا اینفانتوم ارائه نموده است.

سیستین پروتازها در ایجاد و ظهور بیماری‌های انگلی پروتوزوایی نقش اساسی داشته و به عنوان ملکول‌های هدف دارویی و واکنش‌های آنتی‌ژنی مطرح بوده‌اند. تاکنون سه نوع از سیستین پروتازها (CPS) در انگل لیشمانیا مشخص شده است. CPA، CPB و CPC که دو مورد اول همولوگ Cathepsin-L و مورد آخر همولوگ Cathepsin-B پستانداران می‌باشد. سیستین پروتازها در بقاء، آلودگی سلول میزبان و فرار از سیستم ایمنی میزبان نقش دارند. افزون بر آن سیستین پروتازها عوامل بیماری‌زای انگل‌های لیشمانیا محسوب می‌شوند. CPA و CPC دارای ژن‌های منفردی هستند؛ در حالی که برای ژن CPB چندین کپی وجود دارد. در گونه‌های مختلف لیشمانیا تعداد و توالی ژن CPB متفاوت است. در لیشمانیا مکزیکانا که بیشترین مطالعات CPS را به خود اختصاص داده است؛ در یک لوکوس ۱۹ کپی از CPB وجود دارد که آرایش آنها به صورت Tandem Repeat می‌باشد؛ اما در کمپلکس دنووانی پنج کپی از آن وجود دارد (۲۱). Mundodi (۲۲) در سوش‌های مختلف *L. donovani* یک کپی به نام CPBF مشاهده نمود که در سوش *L. infantum* وجود نداشت. همچنین در CPB‌های *L. infantum* یک کپی به نام CPBE مشاهده نمود که در سوش *L. donovani* حضور نداشت. این کپی‌ها توسط Hide (۱۹) در تفکیک این دو عضو مهم کمپلکس دنووانی به کار گرفته شد.

پروتئین‌های حاصل از ژن‌های CPA و CPB در تعدیل فعالیت‌های سیستم ایمنی مانند ممانعت از تولید اینترلوکین ۱۲ توسط ماکروفاژها، تحلیل ملکول‌های MHC II در

شده توسط مرکز بهداشت گرمی (۲۴) مناطق آلوده به کالازار شناسایی شدند و جمع‌آوری پشه‌های حاکی مشکوک به آلودگی از سه ایستگاه ثابت (روستاهای کلانسرا، حمزه خانلو و شاه تپه‌سی) و سه ایستگاه متغیر (روستاهای حسی کندی، سروآغاجی و قاسم کندی) انجام گردید. بر اساس مطالعات قبلی (۲۵)، پیک فعالیت پشه‌های حاکی و آلودگی آنها به انگل در اواسط تابستان می‌باشد. صید پشه‌های حاکی با استفاده از تله چسبان در اماکن داخلی (انسانی و حیوانی) و اماکن خارجی (مصنوعی و طبیعی) انجام گردید. بعد از شست و شوی نمونه‌ها، قسمت میانی بدن به منظور استخراج DNA جدا و سر و انتهای بدن نیز برای شناسایی گونه پشه حاکی با استفاده از محلول پوری مونت گردید.

بخش میانی بدن پشه‌های حاکی در داخل تیوب‌های استریل به کمک پستل‌های شیشه‌ای کاملاً خرد شد و به دنبال آن استخراج DNA به روش تعدیل یافته (۱۸) انجام گردید. DNA سه سوس استاندارد کمپلکس دنووانی *L.infantum* و *L.donovani*، *L.donovani/infantum* (Hybride) از دانشگاه مون‌تپولیر فرانسه دریافت و به عنوان کنترل مثبت و تائیدیه نتایج در واکنش‌های PCR به کار گرفته شد (جدول یک).

در واکنش‌های PCR اختصاصی لوکوس CPBs به منظور شناسایی مستقیم انگل لیثمانیا اینفانتوم از لیثمانیا دنووانی از پرایمرهای معرفی شده توسط Hide (۱۹) استفاده گردید.

واکوتل‌های انگل خوار و القای تولید اینترلوکین ۴ نقش دارند (۲۳).

در این مطالعه با استفاده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بخشی از ژن سیستم پروتئاز B (CPBs) ژنوم انگل‌های موجود در ناقلین منطقه گرمی استان اردبیل تکثیر شد؛ سپس محصولات PCR تعیین توالی و با سایر توالی‌های موجود در Genbank مقایسه و سپس خصوصیات ملکولی آنها در سطح اسیدنوکلئیک DNA و اسیدهای آمینه AA از جمله جایگاه‌های اتصال در معده ناقل و ماکروفازهای میزبان مهره‌دار، همچنین پتانسیل این توالی‌ها برای عملکرد به عنوان اپی‌توپ سلول‌های B و T سلول‌های ایمنی و تاثیر جهش در ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

### روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی برای تعیین هویت و بررسی خصوصیات ملکولی انگل در سطح اسیدنوکلئیک و اسید آمینه بخشی از ژن سیستم پروتئاز B (CPB) انگل‌های لیثمانیای جدا شده از پشه حاکی شهرستان گرمی از استان اردبیل به کمک واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز طی سال ۱۳۸۵ تکثیر و تعیین توالی شدند.

شهرستان گرمی یکی از ده شهرستان استان اردبیل است که در شمال شرقی استان واقع شده است. براساس مطالعات سرواپیدمیولوژی انجام شده در منطقه (۵) و نیز آمارهای منتشر

جدول ۱: مشخصات سوش‌های انگل لیثمانیا دنووانی کمپلکس حاصل از این مطالعه و سوش‌های مورد استفاده موجود در Genbank

گونه	CPBE/F	سوش	نوع ضایعه	شماره دسترسی	موجود جدا سازی شده	کشور
<i>L. d. infantum</i>	CPBE	MHOM/FR/87/LEM1098	جلدی	AY896776	انسان	فرانسه
<i>L. d. infantum</i>	CPBE	MHOM/MA/67/ITMAP263	احشایی	AY896782	انسان	مالتا
<i>L. d. infantum</i>	CPBE	MHOM/FR/85/LEM663	احشایی	AY896780	انسان	فرانسه
<i>L. d. chagasi</i>	CPBE	*****	احشایی	AF217087	انسان	کانادا
<i>L. d. infantum</i>	CPBE	IPER/IR/2007/AS327	احشایی*	EU637907	فلبتموس پرفیلیوی	ایران
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	MHOM/ET/67/HU3	احشایی	AY896783	انسان	اتیوپی
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	MHOM/SD/82/GILANI	پاست کالازار	AY896784	انسان	سودان
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	MHOM/KE/67/MRC(L)3	نامشخص	AY896786	انسان	کتیا
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	IPER/IR/2007/HS10	احشایی*	EU637913	فلبتموس پرفیلیوی	ایران
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	IPER/IR/2007/AS110	احشایی*	EU637912	فلبتموس پرفیلیوی	ایران
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	IPER/IR/2007/HZ6	احشایی*	EU637911	فلبتموس پرفیلیوی	ایران
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	IPER/IR/2007/AS259	احشایی*	EU637910	فلبتموس پرفیلیوی	ایران
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	IPER/IR/2007/AK11	احشایی*	EU637909	فلبتموس پرفیلیوی	ایران
<i>L. d. donovani</i>	CPBF	IPER/IR/2007/AC1	احشایی*	EU637908	فلبتموس پرفیلیوی	ایران

وجود سایت‌های مختلف N گلیکوزیلاسیون (جایگاه‌های دارای پتانسیل اتصال) نیز با استفاده از نرم‌افزار NetGlyc1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc) بررسی شدند. نواحی اتصال MHC class I, II (اپی‌توپ‌های سلول‌های T) با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین MAPPP (www.syfpeithi.de) SYFPEITHI (www.mpiib.mpg.de/MAPPP) RANKPEP (http://mif.dfc.harvard.edu/Tools/rankpep.html) و در ProPred (www.imtech.res.in/raghava/propred) و در اپی‌توپ‌های سلول‌های B پیش‌بینی پپتیدهای آنتی‌ژنیک با استفاده از نرم‌افزارهای Prediction Antigenic Peptides (immunax.dfc.harvard.edu/Toolsbio.dfc.harvard.edu/Tools/immunology.html) و ABCpred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/index.html) انجام گردید. تاثیر جهش در ساختار سه‌بعدی پروتئین نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Predictive Protein (PS)2 Structure Server و Swiss-PdbViewer بررسی گردید (http://ps2.life.nctu.edu.tw).

#### یافته‌ها

در این مطالعه در مجموع ۳۴۴۷ پشه خاکی بررسی شدند که شامل ۱۷۷۸ نر (۵۴/۴۸ درصد) و ۱۵۶۹ ماده (۴۵/۵۲ درصد) بودند. همچنین از سیزده گونه (۶۱ درصد) *Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus* شناسایی شد.

محصول PCR نمونه‌های مثبت شده با واکنش PCR اختصاصی لوکوس CPBs تعیین توالی شدند. برای اطمینان از صحت تعیین توالی نمونه‌ها و میزان مشابهت آنها با توالی‌های موجود در Genbank، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BLAST (www.ncbi.nih.gov.org/blast) بررسی شدند. با توجه به مشاهده یک موتاسیون در اکثر نمونه‌های تعیین توالی شده؛ برای اطمینان از وجود این موتاسیون و تایید اضافه شدن یک سیتوزین در موقعیت فوق، DNA نمونه‌ها به مرکز تحقیقاتی لیسمانایوز دانشگاه مونته‌پولیر فرانسه ارسال شدند و در آنجا دوباره به روش تعیین توالی مستقیم PCR-Direct-Sequencing و تعیین توالی بعد از کلون کردن PCR-Cloning-Sequencing نمونه‌ها تعیین توالی شدند. برای کلونینگ محصول PCR در وکتور pGEM-T کلون و به *E.coli* (JM109) منتقل گردید. تعیین توالی نمونه‌ها در دو محل دانشگاه مونته‌پولیر و آزمایشگاه تخصصی شرکت SeqLab در کشور آلمان انجام گردید. دوباره برای اطمینان از صحت تعیین توالی نمونه‌ها و میزان مشابهت آنها با توالی‌های موجود در Genbank، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BLAST بررسی شدند. برای ترجمه DNA به اسید آمینه AA از نرم‌افزار آنلاین transeq (http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html) استفاده شد.

AY896776L.i	TGTACGGGATCGTGTTCACGGAGAAGAGCTACCCC-TACACGTCGGCAACGGTGATGTG	239
AY896777L.i	-----	239
AY896781L.i	-----	239
AY896779L.i	-----	239
AY896782L.i	-----	239
AY896780L.i	-----	239
AJ628943L.i	-----	239
AS327 → Iranian <i>L.d.infantum</i>	-----	239
AF217087L.chagasi	-----	239
AY896783L.d	-----	239
AY896784L.d	-----	239
AF309627L.d	-----	239
AY896786L.d	-----C-----	239
AC1	-----C-----	240
AK11	-----C-----	240
AS259	-----C-----	240
HZ6	-----C-----	240
AS110	-----C-----	240
HS10	-----C-----	240
AY896785L.d	-----T-----	239
AY896778L.i	-----	239
	*****	

شکل ۱: بخشی از مقایسه توالی‌های ژن CPB نمونه‌های ایران و توالی‌های موجود در Genbank که در آن محل نوکلئوتید سیتوزین اضافی در نمونه‌های ایران با حلقه مشخص شده است.

AY896783L.d VTPVKNQGACGSCWAFSAVGNIESQWARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKDNGCNGGLMLQAF 60  
 AY896784L.d ..... 60  
 AY896780L.i .....S..... 60  
 EU637907L.i ----- 53  
 AF217087L.ch ..... 60  
 AY896782L.i ..... 60  
 AY896776L.i ..... 60  
 AY896786L.d ..... 60  
 EU637912L.d ----- 52

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

AY896783L.d EWLLRHMVGIVFTEKSYPTSGNGDVAECLNSSLKLVPGARIDGYVMIPSNETVMAAWLAE 120  
 AY896784L.d ..... 120  
 AY896780L.i .....Q..... 120  
 EU637907L.i .....Q..... 113  
 AF217087L.ch .....Q..... 120  
 AY896782L.i .....Q..... 120  
 AY896776L.i .....Q..... 120  
 AY896786L.d .....D.....Q..... 120  
 EU637912L.d .....LHVRQR----- 76

\*\*\*\*\*:\*\*\*\* :

AY896783L.d NGPIAIGVDASSFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNKTTGGVVPYVWIKNSWGEDWGBK 180  
 AY896784L.d ..... 180  
 AY896780L.i .....A..... 167  
 EU637907L.i .....A..... 160  
 AF217087L.ch .....A..... 167  
 AY896782L.i .....A..... 167  
 AY896776L.i .....A..... 167  
 AY896786L.d .....A..... 180  
 EU637912L.d -----

AY896783L.d GYVRVAMGLNACLLSEYPVSAHVPQSLTPASTASGNFCEACWTVMLEHRLSVLKTNGLL 240  
 AY896784L.d ..... 240  
 AY896780L.i .....G.....S.....P.P..... 227  
 EU637907L.i .....G.....S.....P.P..... 220  
 AF217087L.ch .....G.....S.....P.P..... 227  
 AY896782L.i .....G.....G.....S.....P.P..... 227  
 AY896776L.i .....G.....S.....S.....R.....P.P..... 227  
 AY896786L.d .....G.....S..... 240  
 EU637912L.d -----

AY896783L.d GRRPSAR 247 نقاط مشخص شده با مستطیل ، جایگاه‌های دارای پتانسیل برای گلیکوزیله شدن  
 AY896784L.d ..... 247 .....  
 AY896780L.i ..... 234 نقاط مشخص شده با بیضی ، جایگاه‌های اتصال B-Cells  
 EU637907L.i ..... 227 .....T-Cells  
 AF217087L.ch ..... 234  
 AY896782L.i ..... 234  
 AY896776L.i ..... 234  
 AY896786L.d ..... 247  
 EU637912L.d -----

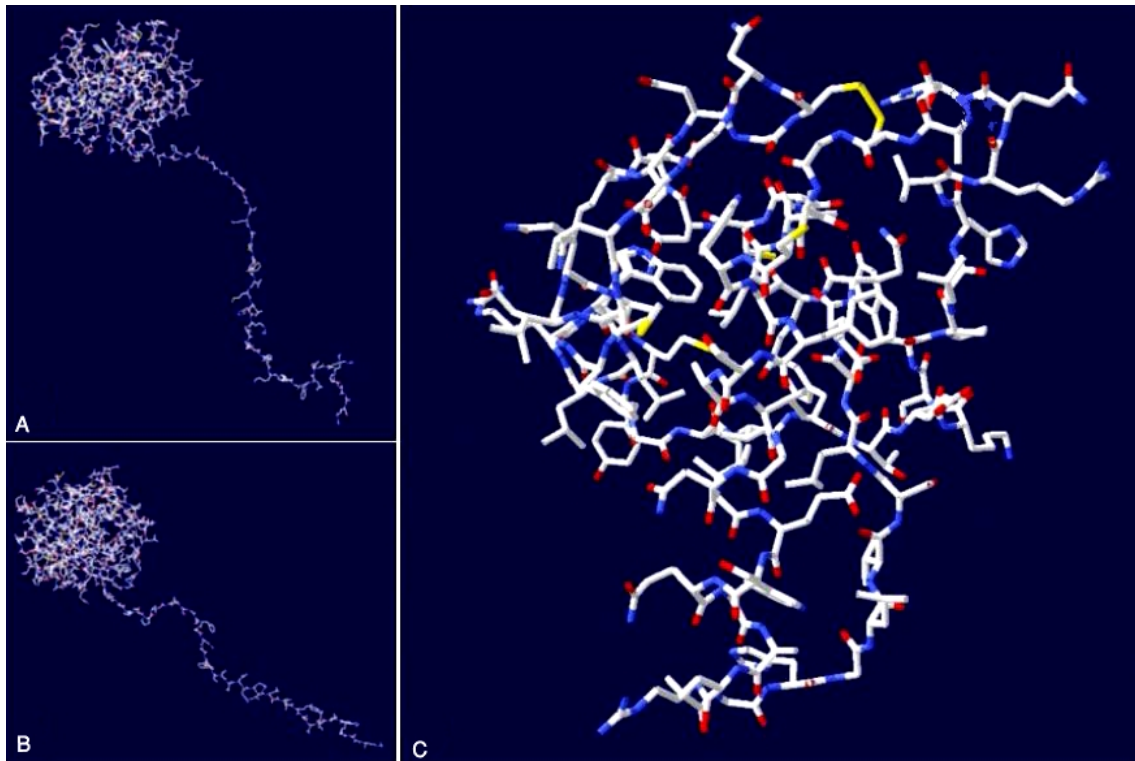
شکل ۲ : مقایسه (Alignment) توالی‌های اسیدآمیننه ژن CPB نمونه‌های ایران (EU637908-13: L.donovani) و (EU637907: L.infantum) و بعضی از نمونه‌های L.donovani (AY896783,84,86) و L.infantum (AY896776,80,82,87,07) موجود در Genbank

و بخش سوم از موقعیت حدود ۴۴۰ bp تا ۷۰۰ bp انتهایی را شامل می‌شود. در این ژن بیشترین اختلاف توالی‌های مختلف، ناشی از Substitution می‌باشد. در بخش اول از ۱۴ مورد اختلاف ۱۳ مورد Substitution و تنها یک مورد Insertion می‌باشد. بخش میانی کاملاً حفاظت شده می‌باشد که در انگل‌های اینفانتوم حذف شده (Deletion) و در دنووانی‌ها موجود (Insertion) می‌باشد. در بخش انتهایی این ژن از مجموع ۲۶ اختلاف، ۲۵ مورد Substitution و تنها یک مورد Deletion می‌باشد.

در موقعیت ۲۱۶ bp توالی‌های ۶ نمونه *L.d.donovani* (کیپی F) یک Insertion از نوع نوکلوتید C وجود دارد که فرآیند ترجمه اسیدهای نوکلئیک به پروتئین را کمی پایین‌تر مختل می‌نماید (شکل یک). به علت Insertion نوکلوتید سیتوزین، در این موقعیت، چهارچوب ترجمه ژن به پروتئین عوض شده و هفت اسیدآمینو بعد از جایگاه جهش، کدون پایانی ترجمه TGA ظاهر می‌گردد. طول این زنجیره

۶۱ درصد تمام نمونه‌ها را تشکیل داده بود. با استفاده از واکنش PCR ژن سیستئین پروتئاز B تعداد ۷ عدد از نمونه‌ها در این واکنش مثبت شدند. این ژن دارای دو کپی E معادل *L. d. infantum* و F معادل *L. d. donovani* می‌باشد و این دو گونه بر مبنای ۳۹ bp اختلاف در طول این ژن از همدیگر و از سایر انگل‌های لیشمانیا قابل تفکیک هستند. نتایج PCR این ژن نشان داد که یک مورد از ۷ مورد مثبت، گونه *L.d.infantum* (کیپی E) و ۶ مورد بقیه گونه *L.d.donovani* (کیپی F) می‌باشند. بدین ترتیب در کانون آندمیک لیشمانیوز احشایی شمال غرب کشور هر دو عضو کمپلکس دنووانی به صورت هم‌زمان وجود دارند. این توالی‌ها با شماره‌های دسترسی EU637908-13 در بانک جهانی ژن ثبت شدند (۲۰).

در مجموع توالی‌های مربوط به ژن سیستئین پروتئاز اعضای کمپلکس دنووانی در سه بخش مجزا قابل بررسی هستند. بخش اول حدود ۴۰۰ bp ابتدای ژن، بخش دوم ۳۹ bp میانی



شکل ۳: ساختار سه‌بعدی پروتئینی ژن سیستئین پروتئاز B توسط نرم‌افزار (PS)2

A: لیشمانیا اینفانتوم ایران ترسیم شده براساس ۲۳۴ aa

B: لیشمانیا دنووانی شمال ترسیم شده براساس ۲۴۷ aa

C: لیشمانیا دنووانی جهش‌یافته ایران ترسیم شده براساس ۷۶ aa

لیشمانیا اینفانتوم بلکه لیشمانیا دنووانی نیز یافت شد و مشخص گردید که دو انگل *L. d. infantum* و *L. d. donovani* به صورت توأم، در منطقه گرمی استان اردبیل در سیکل بیماری بین ناقل، مخزن و انسان در حال گردش هستند. وجود توأم دو انگل لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا دنووانی در کشورهای همسایه ترکیه، عربستان و چین مشاهده شده است (۳). مسأله عفونت‌های مخلوط ایجاد شده توسط گونه‌های مختلف لیشمانیا تنها در موارد محدودی گزارش شده است (۲۶). اگرچه مطالعات اپیدمیولوژیک ملکولی بسیاری از کانون‌های که چندین گونه به طور هم‌زمان در حال گردش هستند را ثابت نموده است (۲۷)؛ مسأله عفونت‌های مخلوط در تشخیص لیشمانیا، پیش‌آگاهی و درک نقش واقعی انگل در بیماری‌زایی انسان را پیچیده‌تر می‌نماید.

در ایران سگ‌سانان به عنوان مخزن لیشمانیوز احشایی مطرح می‌باشند و طی مطالعات سرولوژیکی که روی سگ‌های مشکین‌شهر (۵) صورت گرفته است؛ حدود ۱۵ درصد از سگ‌های مورد بررسی، از نظر سرولوژیکی مثبت شدند. این محققین توانستند انگل لیشمانیا دنووانی زایموم Lon-50 را از دو راس جوندۀ *Meriones persicus* جدا نمایند. قبلاً این استرین از جوندگان شرق ترکیه و فرم انسانی آن از اتیوپی و کنیا جدا شده بود (۲۸). براین اساس ممکن است؛ جوندگان و به ویژه گونه‌هایی که در مجاورت اماکن انسانی زندگی می‌کنند؛ به عنوان مخزن این نوع انگل نقش داشته باشند. با این حال بایستی مطالعات دقیق‌تری در خصوص مخازن بیماری از جمله سگ‌سانان در مناطق اندمیک بیماری صورت پذیرد. از آنجا که ضایعات جلدی پس از کالآآزار (PKDL) اختصاص به انگل لیشمانیا دنووانی دارد و از طرفی این شکل از بیماری تا به حال از کانون‌های شمال غرب (گرمی) و جنوب (شیراز) گزارش شده است (۲۹)؛ یافته‌های این تحقیق را مبنی بر وجود لیشمانیا دنووانی در ایران تقویت می‌نماید. لذا پیشنهاد می‌شود تا مطالعات دقیق‌تری در خصوص هویت و خصوصیات ملکولی انگل بیماری در مناطقی که ضایعات جلدی پس از کالآآزار (PKDL) گزارش شده؛ صورت پذیرد.

مقایسه CPB دو کپی E و F در تمامی تریپانوزوماتیده‌ها

پلی‌پپتیدی با سایر زنجیره‌های پلی‌پپتیدی انگل‌های لیشمانیا مقایسه و مشخص شد که این زنجیره کوتاه‌ترین زنجیره پروتئینی از ژن سیستمین پروتئاز B در بین تمام اعضای این کمپلکس گزارش شده تا به حال در دنیا است (شکل ۲).

جایگاه‌های دارای پتانسیل اتصال چه در معده ناقل و چه ماکروفاژهای میزبان نیز با استفاده از نرم‌افزار NetGlyc1.0 نشان داد که سه جایگاه در کمپلکس دنووانی وجود دارد که با توجه به جهش نمونه‌های دنووانی ایران و ختم زود هنگام ترجمه پروتئین هیچ‌یک از این سه جایگاه شامل آنها نمی‌شود ولی نمونه اینفانتوم دارای این سه جایگاه در موقعیت‌های ۱۰۳، ۱۲۲ و ۱۷۱ می‌باشد (شکل ۲).

اعضای کمپلکس دنووانی از جمله لیشمانیا اینفانتوم ایران برای آنتی‌ژن‌های سلول‌های T دارای سه جایگاه اتصال در موقعیت‌های ۱۱۹-۱۲۸، ۲۳۶-۲۴۶ و ۲۳۴-۲۴۲ و برای سلول‌های B دارای دو جایگاه اتصال در موقعیت‌های ۱۷۸-۱۹۳ و ۱۵۳-۱۶۹ هستند؛ ولی در لیشمانیا دنووانی ایران با توجه به جهش نمونه‌های دنووانی ایران و ختم زود هنگام ترجمه پروتئین هیچ‌یک از این سه جایگاه ایجاد نمی‌شود (شکل ۲). با توجه به این که جهش روی داده در نمونه‌های دنووانی ایران از نوع ساختاری Nonsense Point Mutation می‌باشد؛ تاثیر فتوتیپی آن شدید خواهد بود. برای این منظور ساختار سه‌بعدی پروتئین حاصله با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی پیش‌بینی گردید. همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد؛ در نمونه‌های دنووانی ایران به علت موتاسیون، ساختار بخش میانی (ساختار راسی) و C ترمینال (ساختار دنباله) حذف شده؛ ولی ساختار پروتئینی نمونه‌های اینفانتوم همانند نمونه‌های سایر نقاط جهان دارای ساختار کامل می‌باشد.

## بحث

کنترل بیماری لیشمانیوز در مناطق آندمیک، نیازمند آگاهی از اکولوژی و اپیدمیولوژی انگل، میزبان مخزن و نیز ناقل بیماری می‌باشد. در این راستا شناسایی انگل و جستجوی ناقلان آلوده یکی از مشکلات اساسی کنترل بیماری محسوب می‌شود. هدف اولیه این مطالعه براساس اطلاعات قبلی، جستجوی انگل لیشمانیا اینفانتوم در ناقلین بود که نه تنها

روشن شدن مطلب بایستی مطالعات تکمیلی صورت پذیرد.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه حضور هم‌زمان هر دو عضو کمپلکس دنووانی یعنی *L. donovani* و *L. infantum* در کانون اندمیک شمال غرب ایران و اضافه شدن یک نوکلئوتید سیتوزین به توالی ژن CPB گونه دنووانی تایید گردید. با توجه به اهمیت ژن سیستئین پروتاز B در برهم‌کنش انگل و سلول‌های میزبان و نقل و نیز نقش کلیدی آن در ایجاد عفونت و گسترش بیماری کالا‌آزار و با توجه به استرین جهش‌یافته با پروتئین کوتاه شده انتظار می‌رود که تابلو بیماری ناشی از این استرین از سایر استرین‌ها متفاوت باشد. لذا لازم است تا مطالعات دقیق‌تری در خصوص علائم بالینی این استرین بر روی حیوانات حساس آزمایشگاهی انجام گردد. همچنین در صورت مشاهده انگل در نمونه‌های بالینی، علائم و تظاهرات بالینی بیمار با علائم و تظاهرات بالینی بیماران ناشی از استرین‌های طبیعی مقایسه و مطالعه شود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی سازمان بهداشت جهانی منطقه مدیترانه شرقی (طرح‌شماره TDR6/36, T5/72/6, SGS06/77) و حمایت دانشگاه‌های علوم پزشکی تهران و تربیت مدرس انجام شد.

### References

- Bates PA. Transmission of *Leishmania metacyclic promastigotes* by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007 Aug;37(10):1097-1106.
- WHO. The disease and its epidemiology. [http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html)
- WHO. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1990;793:1-158.
- Nadim A, Navid-Hamidid A, Javadian E, Bidruni GT, Amini H. Present status of kala-azar in Iran. *Am J Trop Med Hyg.* 1978 Jan;27(1 Pt 1):25-28.
- Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol.* 2005 May 15;129(3-4):243-251.
- Campino L, Cortes S, Pires R, Oskam L, Abranches P. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 May;19(5):396-

نشان داد که این کپی‌ها اختصاصی کمپلکس دنووانی هستند (۳۷) و زنجیره اسیدآمینه کپی F (دنووانی نرمال) دارای ۲۴۷ اسیدآمینه و کپی E (اینفانتوم) دارای ۲۳۴ اسیدآمینه می‌باشد (۱۹). حضور این کپی‌ها در نمونه‌های ایران با توجه به نتایج مطالعه تکمیلی انجام شده در مونتپولیر فرانسه نیز مورد تایید قرار گرفت. لیکن کپی F ایران به جای ۴ سیتوزین ۵ سیتوزین داشتند. جهش (Insertion) روی داده از نوع Nonsense Point Mutation بود و با اضافه شدن این سیتوزین چهارچوب ترجمه ژن به پروتئین تغییر کرده و با ظهور کدون TGA (یکی از سه کدون پایانی ترجمه) ترجمه رشته DNA خیلی زود پایان می‌پذیرد. بدین ترتیب زنجیره اسیدآمینه دنووانی ایران با ۷۶ اسیدآمینه کوتاه‌ترین زنجیره گزارش شده می‌باشد. وجود این موتاسیون باعث خواهد شد که فعالیت کاتالازی (GVLTCAGDALNH) این ژن (که در ناحیه ۳۹ bp اختلاف بین اینفانتوم و دنووانی قرار دارد) مختل شود. فقدان بخش‌های گلیکوزیلاسیون پروتئین کوتاه شده از یک طرف و آلودگی پشه‌های حاکی فلیتوموس پرفیلیوی با وضعیت شکمی خالی که حاکی از رشد و تکامل انگل در معده پشه می‌باشد؛ بیان‌کننده این مطلب است که انگل از مکانیزم‌ها و سازوکارهای دیگری به‌جز پپتیدهای CPB برای اتصال به معده پشه‌های حاکی استفاده می‌کند که برای

398.

- Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Jul;73(1-2):145-155.
- el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 Sep-Oct;94(5):575-579.
- Eresh S, Axelrod O, Greenblatt CL, Barker D. PCR in leishmaniasis diagnosis distinguishing *Leishmania tropica* from *L. major*. Abstract in: 5<sup>th</sup> Joint Meeting Isr Soc Protozool & Isr Soc Parasitol 1993; Rehovot.
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* 1998 Jul;36(7):1989-1995.
- Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH,



- Adhya S, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*. 1992 Oct;105 ( Pt 2):183-192.
12. Katakura K, Kawazu S, Naya T, Nagakura K, Ito M, Aikawa M, et al. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. *J Clin Microbiol*. 1998 Aug;36(8):2173-2177.
13. Kokozidou M. Evaluation of PCR methods for detection, species identification and determination of genetic variation in *L. infantum*. Inaugural dissertation for the acquisition of the doctoral degree at the Fachbereich Veterinärmedizin of the Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany. 2003.
14. Kuhls K, Mauricio IL, Pratloug F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect*. 2005 Aug-Sep;7(11-12):1224-1234.
15. van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Mar;51(1):133-142.
16. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990 Oct;71(3):267-275.
17. Schönian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratloug F, et al. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopia* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Mar 5;106(2):239-248.
18. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol*. 2000 May;66(5):1933-1938.
19. Hide M, Bañuls AL. Species-specific PCR assay for *L. infantum/L. donovani* discrimination. *Acta Trop*. 2006 Dec;100(3):241-245.
20. Oshaghi MA, Ravasan NM, Hide M, Javadian EA, Rassi Y, Sedaghat MM, et al. Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for *L. infantum/L. donovani* discrimination. *Exp Parasitol*. 2009 May;122(1):61-65.
21. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007;64:1-109.
22. Mundodi V, Somanna A, Farrell PJ, Gedamu L. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene*. 2002 Jan 9;282(1-2):257-265.
23. Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Aug;7(4):375-381.
24. Ardebile Province Health Center. Kala Azar Disease in Ardebile Province, 2001-2006. Disease Control Center. Annual Report. 2007.
25. Dye C, Guy MW, Elkins DB, Wilkes TJ, Killick-Kendrick R. The life expectancy of phlebotomine sandflies: first field estimates from southern France. *Med Vet Entomol*. 1987; 1(4): 417-425.
26. Ibrahim ME, Smyth AJ, Ali MH, Barker DC, Kharazmi A. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. *Acta Trop*. 1994 Sep;57(4):327-332.
27. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, et al. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Aug;59(2):312-317.
28. Mohebbali M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjarian H, Abaei MR. 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.
29. Alborzi A, Ahanchi AR, Karimi A. Recurrent postkala-azar dermal leishmaniasis. *Eur J Pediat Dermatol*. 2002; 12: 97-100.