

## بررسی سیکل اسپروگونی انگل پلاسمودیوم ویواکس در پشه‌های آنوفل استغنیسی میزورنسیس به شکل تجربی و جنبه‌هایی از تأثیر کربوهیدرات‌های بازدارنده در رشد انگل

### چکیده

**زمینه و هدف:** با وجود این که پشه‌های آنوفل نقش اصلی را در انتقال انگل‌های بیماری مalaria دارند، اما نکات مبهم زیادی درباره بیولوژی انگل در بدن ناقل و همین‌طور اثر تعاملی آنها وجود دارد. یکی از این عوامل که شاید به نوعی بتواند در مهار کردن سیکل انتقال تأثیرگذار باشد، وجود پروتئین‌های رسپتور می‌باشند که با اتصال به ملکولهای حاوی کربوهیدرات به عمل چسبیدن انگل به دیواره معده کمک خواهد کرد. هدف از این مطالعه پیگیری سیکل اسپروگونی در بدن پشه و تأثیر احتمالی برخی کربوهیدرات‌ها روی انگل و جلوگیری از اتصال آنها به دیواره معده و در نهایت انتقال توسط پشه‌ها می‌باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه با آلوده کردن تجربی پشه‌های *An. Stephensi mysorensis* با انگل *P. vivax* (خون بیمار حاوی گامتوسیت) و خوراندن قندهای N-استیل گلوکز آمین، N-استیل گالاکتوز آمین، آرابینوز، فیکوز، مانوز، لاکتوز و گالاکتوز، تأثیر آنها روی سیکل اسپروگونی و احتمالاً عمل بازدارندگی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در پنج دقیقه اول پس از آلوده شدن پشه‌ها پدیده اگزفلاژیشن (Exflagellation) مشاهده شد و پس از آن در زمانهای ۲۰ ساعت و ۸ تا ۱۲ روز پس از آلودگی به ترتیب اووکینت، اووسیست و در نهایت اسپروزوئیت در معده و غده بزاقی پشه‌های آلوده مشاهده شد این امر مؤید آن است که سوش مذکور توانایی بالایی در انتقال پلاسمودیوم ویواکس دارد، از طرفی در پشه‌هایی که با قندهای N-استیل گلوکز آمین، آرابینوز، فیکوز و گالاکتوز آلوده شده بودند، اسپروزوئیت مشاهده و در قندهای فروکتوز، لاکتوز، مانوز و N-استیل گالاکتوز آمین آلودگی اسپروزوئیتی مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد در قندهایی که آلودگی پشه‌ها در آن صفر بوده، احتمالاً می‌توانسته اثر مهارکنندگی روی رشد انگل در مرحله اسپروگونی داشته باشد. با این حال برای دستیابی به نتایجی بهتر و دقیق‌تر نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد و مطالعه فوق اولین گامی است که در این زمینه برداشته شده است.

**کلمات کلیدی:** مalaria، سیکل اسپروگونی، آنوفل استغنیسی، معده، کربوهیدرات، پلاسمودیوم ویواکس

صغری دوستی<sup>۱</sup>

حمیدرضا باصری<sup>۱\*</sup>

مهدی ناطق پور<sup>۲</sup>

مهندس کامران اکبرزاده<sup>۱</sup>

حسین لدنی<sup>۱</sup>

منصوره شایقی<sup>۱</sup>

۱- گروه حشره‌شناسی پزشکی

۲- گروه انگل‌شناسی پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*نویسنده مسئول: نشانی: تهران- پورسینا، دانشکده

بهداشت، گروه حشره‌شناسی پزشکی صندوق پستی:

۶۴۴۶-۱۴۱۵۵

تلفن: ۸۸۹۵۱۳۹۳

Email: basserih@sina.tums.ac.ir

### مقدمه

بیماری مalaria هر ساله صدمات سنگینی را به سلامت انسانها در مناطق گرمسیری سراسر دنیا، به ویژه در آفریقا وارد می‌نماید. پشه‌های آنوفلینه نقش اصلی و مهمی را در انتقال عامل بیماری پلاسمودیوم بازی می‌کنند اما متأسفانه شناخت ما درباره بیولوژی و اثر تعاملی انگل- ناقل در بدن پشه، هنوز محدود و ناچیز می‌باشد.<sup>۱</sup> پس از خونخواری پشه‌ها با خون حاوی انگل، گامتوسیت‌های پلاسمودیوم در معده پشه تبدیل به گامت شده و پس از لقاح زیگوتها

پلاسمودیوم باز می‌کنند اما متأسفانه شناخت ما درباره بیولوژی و اثر تعاملی انگل- ناقل در بدن پشه، هنوز محدود و ناچیز می‌باشد.<sup>۱</sup> پس از خونخواری پشه‌ها با خون حاوی انگل، گامتوسیت‌های پلاسمودیوم در معده پشه تبدیل به گامت شده و پس از لقاح زیگوتها

حالی که Shahabuddin در سال ۱۹۹۸ مروری اختصاصی بر رشد اووکیته‌ها در بدن *Ae. Aegypti* داشته است و اثر تعاملی اووکیته با سلولهای میدگات را از جهت تعیین فاکتورهای مؤثر در تولید واکسن مورد بررسی قرار داده است.<sup>۸،۹</sup>

سیکل اسپروگونی انگل از مراحل مختلف تشکیل شده که عبور از یک مرحله به مرحله دیگر به بخش خاصی در بدن پشه محدود می‌گردد و شکست یا موفقیت این سیکل نتیجه اینترکشن پیچیده‌ای است که بین انگل و فاکتورهای متنوع در بدن پشه ایجاد می‌گردد. بسیاری از این فاکتورها موقتی بوده و فضایی را در بدن پشه اشغال می‌نمایند که احتمالاً به شکل هماهنگ روی انگل عمل می‌نمایند. آنچه لازم است شناخته شود این است که چطور این فاکتورها با یکدیگر و با رشد انگل در بخش‌های مختلف بدن ناقل، واکنش متقابل می‌نمایند. شناخت این فاکتورها به طراحی استراتژی کنترل و بلوک کردن منطقی مالاریا کمک خواهد نمود.<sup>۱۰</sup>

تلاشهای اخیر برای کنترل مالاریا، بر روی شناسایی نکات حساس و آسیب‌پذیر در سیکل اسپروگونی تمرکز نموده است که این مسئله می‌تواند به عنوان یک هدف برای واکنشهای بلوک‌کننده انتقال مدنظر باشد. علت این مسأله می‌تواند آسیب‌پذیر بودن اووکیته در مجرای معده پشه باشد.<sup>۹</sup> تحقیقات نشان می‌دهد که اووکیته‌ها به طور یکسان به تمام سلولهای اپی‌تلیال معده حمله نمی‌کنند. اتصال آنها به سلولهای معده بر اساس اثر تعاملی بین پروتئین‌های رسپتور در سطح انگل یا سلولهای اپی‌تلیال معده صورت می‌گیرد. بطوریکه مطالعات Shahabuddin در سال ۲۰۰۲ نشان می‌دهد که اوکیته‌های *P. gallinaceum* به نوع خاصی از سلولهای معده بنام "Ross Cell" حمله می‌نمایند. این مطلب مؤید وجود لیگاندهای خاص بر روی این سلولهاست که انگل با آن وارد واکنش می‌گردد. این سلولها دارای سطح بالایی از V-ATPase بوده و دارای ساختار شیمیایی خاصی می‌باشند.<sup>۱۱</sup> از آنجائیکه اتصال انگل به بافت میزبان اغلب برای حمله ضروری است، لذا اووکیته‌ها با اینترکشن ملکولهای دارای کربوهیدرات با سلولهایی که قرار است به آنها حمله نمایند شناسایی می‌کنند. احتمالاً نخستین تشخیص و تماس برای یک نفوذ مؤثر به سلولهای اپی‌تلیال معده، حیاتی خواهد بود.

در این مطالعه سعی شده تا در کنار دنبال کردن مراحل رشد انگل و سیکل اسپروگونی آن در بدن پشه، نقش برخی از کربوهیدراتها در

تبدیل به اووکیته می‌گردند. در پی آن اووکیته‌ها رشد کرده و به سلولهای اپی‌تلیال معده حمله می‌نمایند که پس از استقرار در غشاء پایه اووسیست را تشکیل می‌دهند. بعد از رسیدن اووسیستها و پاره‌شدنشان، اسپروزیته‌ها در هموسل پشه رها شده و با جریان همولف خود را به غدد بزاقی رسانده و در خونخواری بعدی بر روی میزبان جدید، آنها را به جریان خون تزریق می‌نماید.<sup>۱</sup> تا کنون در حدود ۲۲ تا ۲۸ گونه آنوفل در ایران گزارش شده است که از بین آنها هشت گونه به عنوان ناقل معرفی گشته‌اند.<sup>۲</sup> در تمام مراحل رشد و تکامل، انگل با بافتهای مختلف میزبان اینترکشن (Interaction) دارد که علی‌رغم مطالعات محدود هنوز نکات ناشناخته و مبهم زیادی وجود دارد.<sup>۱</sup> درباره اینترکشن انگل با سلولهای خونی (گلوبولهای قرمز) و سلولهای هپاتوسیت در بدن میزبان مطالعات وسیع و گسترده‌ای انجام شده است. تحقیقات نشان می‌دهد اتصال اسپروزیته‌ها به هپاتوسیتها به واسطه یک رسپتور بنام Heparin Sulphate Proteoglycan صورت می‌گیرد.<sup>۳</sup> همینطور اتصال نخستین مروزیته‌ها به گلوبولهای قرمز از طریق یک میانجی بنام Major Surface Molecule of the Merozoite (MSP-1) که از ملکولهای سطحی مروزیته‌هاست، صورت می‌گیرد.<sup>۳</sup> این در حالی است که برای تشخیص و شناسایی فرآیند اینترکشن انگل مالاریا با بافتهای بدن پشه و مراحل رشد آن تلاشهای کمی انجام شده است. برخی مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهد که عوامل و فاکتورهای متعددی، از جمله کربوهیدراتها (قندها) روی مکانیسم اینترکشن انگل با سلولهای معده تأثیر گذارند. مطالعات انجام شده توسط Zieler و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان داد که بکار بردن برخی کربوهیدراتها در غلظت مشخص می‌تواند در اتصال انگل به دیواره معده مؤثر باشد.<sup>۳</sup> تا به حال مطالعات متعددی بروی بررسی سیکل انگل مالاریا انجام شده است بطوریکه Sinden در سالهای ۱۹۸۳ و ۱۹۸۵ زیر ساختار مراحل رشد انگل را در بدن پشه مورد بررسی قرار داده و بیولوژی سلولی مراحل غیرجنسی انگل و نحوه حمله انگل پلاسمودیوم را به سلولهای بدن میزبان تعیین نموده است.<sup>۴</sup> سایر مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که Sinden و همکاران در سال ۱۹۹۶ و Sinden در سال ۱۹۹۹ با دقت بیشتری تغییر و تبدیل انگل پلاسمودیوم را در پشه‌های ناقل مورد مطالعه قرار دادند تا جزئیات بیشتری از نحوه عبور انگل از بافتهای میزبان بدست آورند.<sup>۵،۶</sup> در

شد و هدف از تهیه خون و انجام آزمایش بیان گردید سپس با موافقت آنها خون‌گیری انجام شد. عمل خون‌گیری تحت نظر پزشک مرکز بهداشتی و توسط تکنسین‌ها انجام گرفت. حدود ۵ml از خون بیمار حاوی گامتوسیت تهیه و درون ویالهای حاوی هیپارین ریخته شد، سپس بیمار تحت درمان قرار می‌گرفت. خون‌های آلوده به گامتوسیت انگل *P. vivax* (که از بیمار داوطلب گرفته شده بود) ابتدا از نظر میزان گامتوسیت مورد بررسی قرار می‌گرفتند و در صورت داشتن تعداد کافی گامتوسیت (۶ در ۱۰۰۰۰ گلبول قرمز) وارد مطالعه می‌شدند. خون‌های مناسب، تفکیک شده و به مقدار ۱ ml در لوله‌های در پیچ‌دار استریل، ریخته شد. در مرحله بعد میزان هر قند (۰/۲ مول) را که به ازای ۱ml خون محاسبه شده بود، در لوله‌ها ریخته و به خوبی هم زده شد. روی هر لوله برچسب مشخص‌کننده نام بیمار، مقدار بدست آمده قند و نوع قند افزوده شده چسبانده شد. قندهای مورد مطالعه شامل فروکتوز، آرابینوز، N-استیل گلوکزآمین، N-استیل گالاکتوز آمین، لاکتوز، گالاکتوز، مانوز و فکوز بودند. لازم به ذکر است که در کنار هشت قند مورد مطالعه یک نمونه نیز به عنوان کنترل (فاقد قند) در نظر گرفته شد. محتویات هر لوله با سرنگ ۱ ml کشیده شده و درون قیف دستگاه تغذیه مصنوعی که دهانه آن قبلاً با پارافیلیم M پوشیده شده بود، ریخته شد. دستگاه مزبور که نمونه ساخته شده توسط اکبرزاده و همکاران (۱۳۷۷) بود،<sup>۱۱</sup> دارای کیفی به ظرفیت حداکثر ۲ ml می‌باشد که پس از پوشاندن دهانه آن با پارافیلیم M و ریختن خون آلوده به درون قیف و تنظیم دمای آن، بروی قفس پشه‌ها قرار داده شد تا پشه‌ها خونخواری کنند. به منظور جلوگیری از فرار احتمالی پشه‌های آلوده، قفس حاوی پشه‌ها به قفسی بزرگتر (تو در تو) منتقل شد پس از آن تمام مراحل کار اعم از خون‌دهی، تغذیه پشه‌ها با آب قند، صید پشه‌ها جهت تشریح و غیره در داخل قفس‌های مزبور صورت گرفت. شرایط انسکتاریوم برای نگهداری پشه‌ها به منظور سپری شدن سیکل اسپروگونی، شامل رطوبت ۷۰ تا ۸۰٪ و دمای  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  بود.

**تشریح پشه‌ها و بررسی سیکل اسپروگونی:** جهت مشاهده پدیده آگرفلاژلیشن ابتدا معده تعداد پنج تا از پشه‌هایی که با خون بدون قند (تکرار شاهد) تغذیه شده بودند، در فواصل زمانی پنج دقیقه (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه) پس از خونخواری، تشریح شد. برای این کار پس از جدا کردن معده، از محتویات خون درون آن بر

اتصال انگل و احتمالاً اثر مهارکنندگی آنها در اتصال با سلولهای اپی‌تلیال معده مورد بررسی قرار گیرد. علی‌رغم مطالعات گسترده‌ای که بر روی فرم‌های شیزوگونی انگل در ایران انجام شده، هیچگونه اطلاعی از اینترکشن بین فرم‌های اسپروگونی *P. vivax* با ناقلین ایران و از جمله *An. stephensi* در دسترس نیست. بطوری که توانایی آلودگی آنوفلهای ناقل در ایران بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک استوار بوده و در نتیجه نکات مبهم و ناشناخته بی‌شماری درباره آلودگی آنوفل‌های ناقلی چون *An. stephensi* وجود دارد. لذا در این مطالعه نخست سعی شده که به احتمال انتقال *P. vivax* (مالاریای شایع در جنوب ایران) توسط یکی از ناقلین مهم جنوب ایران، *An. stephensi mysorensis* جواب داده شود و سپس با توجه به ناقل بودن آن، اقدامات کنترلی و سمپاشی در این زمینه انجام شود.

## روش بررسی

مطالعه فوق از نوع بنیادی - کاربردی بوده و تجزیه و تحلیل اطلاعات بر اساس میزان آلوده شدن پشه به فرم جنسی و غیرجنسی پلاسمودیوم در بافت‌های مختلف از قبیل معده و غده بزاقی پشه بود. پشه‌هایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند *An. stephensi mysorensis* سوش انسکتاریوم ایران‌شهر می‌باشند. پرورش پشه‌ها در انسکتاریوم و در دمای  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  و رطوبت  $70 \pm 10\%$  صورت گرفت (دما و رطوبت با دماسنج و رطوبت سنج سنجیده شد) و از پشه‌های ماده بالغ با سن ۳-۴ روزه و خون نخورده (تغذیه شده با آب قند ۵٪) در آزمایش‌ها استفاده شد. تعداد ۵۰ پشه ماده برای هر تکرار آزمایش در نظر گرفته شد. به منظور تسهیل در خونخواری، پشه‌های ماده قبل از خون‌دهی (خون آلوده) به مدت ۱۸-۱۲ ساعت گرسنه نگه داشته شده و هیچگونه آب قندی به آنها داده نشد.

خون آلوده به گامتوسیت انگل *P. vivax* از بیماران داوطلب که به مراکز بهداشتی و درمانی شهرستان ایران‌شهر و پیشین (از توابع شهرستان سرپاز) مراجعه نموده بودند تهیه شد. قبل از هر اقدامی سابقه درمان در افراد آلوده از آنها پرسیده شد و آن دسته از افراد که تا دو هفته قبل به دلیل خود درمانی یا درمان ناقص از داروهای ضد مالاریایی استفاده کرده بودند، از برنامه خون‌گیری حذف شدند. توضیحات لازم توسط پرسنل محلی و به گویش بومی به بیماران داده

است. شکل شماره ۱ عمل اگزفلاژلیشن انگل *P. vivax* را در معده پشه‌های آنوفل استفنسی میزورنسیس به روش *in vivo* نشان می‌دهد. شکل شماره ۲ اووکیونت انگل مزبور را در معده پشه‌هایی که ۲۰ ساعت از آلودگی آنها می‌گذرد، نشان می‌دهد. چنانچه در شکل نیز قابل مشاهده است اووکیونت با شکل خاص خود (بادامی شکل) کاملاً مشخص و قابل رؤیت می‌باشد. در لامهای بررسی شده مربوط به اسپروزیوت و اووسیست، در پشه‌هایی که شش تا هشت روز پس از آلودگی تشریح شده بودند نتایج زیر بدست آمد. در گروه کنترل، با سه تکرار، از ۸۲ پشه آلوده شده، ۹/۷۵٪ (هفت پشه) دارای اووسیست و ۶/۰۹٪ (تعداد پنج پشه) دارای اسپروزیوت بودند. با احتمال  $P < 0/05$  تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شاهد و تیمار از نظر میزان آلودگی مشاهده شد. تعداد و درصد آلودگی پشه با هر یک از قندها در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود. شکل‌های شماره ۳ و ۴ نشان دهنده اسپروزیوت و اووسیست‌های مشاهده شده در پشه‌های آلوده می‌باشد. در پشه‌هایی که با قندهای N- استیل گلوکزآمین، آرابینوز، فیکوز و گالاکتوز آلوده شده بودند، اسپروزیوت مشاهده و در قندهای لاکتوز، مانوز و N- استیل گالاکتوز آمین آلودگی اسپروزیوتی مشاهده نشد (جدول شماره ۱)

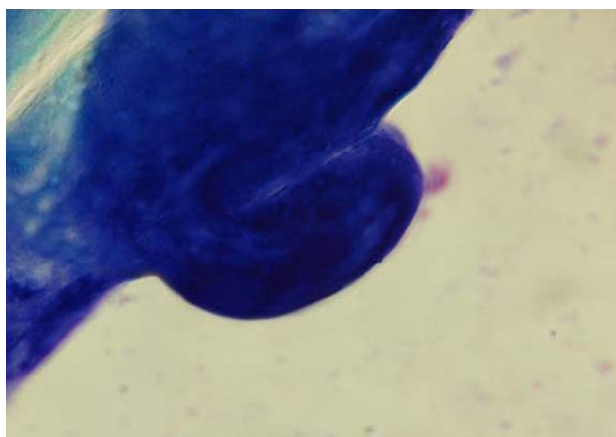
یک لام تمیز گسترش نازکی تهیه گردید. لامها پس از خشک شدن با متانول فیکس شده و سپس به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن لامها جهت مشاهده پدیده اگزفلاژلیشن با لنز ۴۰X میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از خونخواری، معده چهار تا پنج پشه از گروه پشه‌های ماده تغذیه نشده با کربوهیدرات (گروه کنترل) به منظور مشاهده اووکیونت تشریح شد. روش تشریح معده مشابه آنچه که برای دیدن اگزفلاژلیشن گفته شد، می‌باشد. از روز هشتم به بعد، عمل تشریح پشه‌ها (غده بزاقی و معده) جهت مشاهده اسپروزیوت و اووسیست، انجام شد. تشریح شامل استخراج غده بزاقی و معده پشه‌های آلوده در بافر PBS و در زیر استریوسکوپ بود. پس از تشریح معده و غده بزاقی، هر یک بطور مجزا بر روی لام تمیزی قرار گرفته و پس از رنگ‌آمیزی به روش گیمسا، در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند. در کنار هر لام بر چسب مشخصات لازم چسبانده شد. این عمل تا پایان کامل تشریح پشه‌ها ادامه یافت.

### یافته‌ها

مشاهده و بررسی لامهای مربوط به پدیده اگزفلاژلیشن نشان داد که این پدیده در طی پنج دقیقه اول پس از خونخواری اتفاق افتاده

جدول ۱- تعداد و درصد آلودگی به اووسیست و اسپروزیوت در پشه‌های آنوفل استفنسی میزورنسیس

نام قند	تعداد پشه	پشه‌های دارای اووسیست		پشه‌های دارای اسپروزیوت	
		تعداد (n)	درصد	تعداد (n)	درصد
کنترل	۸۲	۸	۹/۷۵	۵	۶/۰۹
N - استیل گلوکز آمین	۷۲	۶	۸/۰۶	۴	۵/۵
N - استیل گالاکتوز آمین	۶۲	۵	۸/۳	۰	۰
آرابینوز	۵۸	۳	۵/۱۷	۲	۳/۴
فیکوز	۵۰	۳	۶	۱	۲
مانوز	۴۰	۲	۵	۰	۰
گالاکتوز	۳۳	۳	۹/۰۹	۵	۱۵/۱۵
لاکتوز	۵۰	۳	۶	۰	۰
تعداد کل	۴۴۷	۳۳	۵۷/۳	۱۷	۳۲/۹۵



شکل-۴: اووسیت مشاهده شده در معده پشه *An. stephensi mysorensis* (۶ تا ۸ روز پس از آلودگی)



شکل-۱: پدیده آگزفلاژیشن در خون خورده شده در معده پشه‌های *An. stephensi mysorensis* به روش *in vivo* (۲ تا ۲ دقیقه پس از آلودگی)

## بحث

از آنجائیکه مالاریای انسانی تنها از طریق گزش پشه آلوده امکان‌پذیر است، لذا بلوک کردن سیکل انتقال اقدام کنترل‌کننده مؤثری خواهد بود. با این حال هنوز یک مکانیسم صحیح از روشهای بلوک‌کننده انتقال در دست نمی‌باشد و این مسأله بیشتر به خاطر ملکولهای هدف، که لازمه رشد انگل در بدن میزبان می‌باشد و هنوز به درستی شناخته نشده‌اند، می‌باشد هر چند که ممکن است فاکتورهای رفتاری و اکولوژیکی تا حدودی مسئول این موضوع باشند اما فاکتورهای ژنتیکی، بیوشیمیایی و فیزیکی نقش اصلی را در آلودگی‌های پائین‌بازی می‌نمایند.<sup>۱۰</sup> مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد پشه‌هایی که به عنوان ناقلین مهم مالاریا مطرحند مثل *An. gambiae* بشکل مؤثری بیش از ۹۹/۹٪ رشد انگلهای بلعیده شده را بلوک کرده، در حالیکه گونه‌های مقاوم قادرند این کار را تا ۱۰۰٪ انجام دهند.<sup>۱۳</sup> این مطالعه نشان می‌دهد که *An. Stephensi mysorensis* در ایران قادر است ۹۳/۹۱٪ رشد انگل‌های بلعیده شده را بلوک نماید.<sup>۱۳</sup> بنابراین می‌توان با اطمینان اظهار کرد که پشه‌ها به شکل ژنتیکی نسبت به پلاسمودیوم مقاومند لذا این مسئله دال بر موانع رشد انگل در پشه هاست که در صورت شناخته شدن ما را در پیشرفت اقدامات مؤثر علیه مالاریا و کنترل آن، رهنمون خواهد کرد. تا کنون سیکل اسپروگونی انگل مالاریا به شکل گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و بسیاری از فاکتورهایی را که بر روی رشد انگل در معده پشه تأثیر می‌گذارند، شرح داده شده است.<sup>۱۴-۱۶</sup> این سیکل در *An. stephensi* برای انگل *P. vivax* توسط Nanda و همکاران در سال ۱۹۸۵ مورد مطالعه قرار گرفت.<sup>۱۷</sup>



شکل-۲: اووکینت موجود در خون خورده شده در معده پشه‌های *An. stephensi mysorensis* به روش *in vivo* (۲۰ ساعت پس از آلودگی)



شکل-۳: اسپروزوتیهای مشاهده شده در غدد بزاقی *An. stephensi mysorensis* (۶ تا ۸ روز پس از آلودگی)

سلولهای اپی‌تلیال معده پشه‌های *Ae. aegypti* اتصال یافته و حمله می‌نماید. وی همینطور با بکاربردن برخی از کربوهیدرات‌ها مانند N-استیل نورامیک اسید (NANA)، N-استیل گلوکز آمین، N-استیل گالاکتوز آمین، مانوز، فیکوز، گلوکز و سیانولاکتوز به بررسی اثر این قندها در اتصال اووکینت به سلولهای اپی‌تلیال معده و احتمالاً اثر بازدارندگی و مهارکنندگی آنها پرداخته است. نتایج وی نشان داد که از بین قندهای مطالعه شده NANA تنها قندی بوده که توانست به میزان ۵۰٪ اتصال اووکینت را به سلولهای اپی‌تلیال معده پشه‌های *Ae. aegypti* بلوک نماید و قندهای مانوز و N-استیل گلوکز آمین اثرات جزئی روی ممانعت از اتصال انگل داشته است اما این تأثیر از نظر آماری چندان معنی‌دار نبوده است. تمام این یافته‌ها نشان می‌دهند که لیگاندهای موجود بر روی معده برای اتصال اووکینت‌ها کربوهیدراتهایی هستند که درجات مختلفی از حساسیت را در برابر اسید پرئودیک دارند.<sup>۳</sup>

نتایج مطالعات ما نیز نشان می‌دهد که از بین پشه‌هایی که با قندهای مختلف همراه با خون آلوده به انگل *P. vivax* آلوده شده بودند، در پشه‌های تغذیه شده با قندهای N-استیل گالاکتوز آمین، مانوز، لاکتوز و فروکتوز هیچ گونه آلودگی اسپروژوئیتی مشاهده نشد. بنابراین چنین استنتاج می‌گردد این قندها بر روی سیکل اسپروگونی تأثیر داشته و می‌توانسته اثر مهارکنندگی داشته باشد. در حالیکه سایر قندها (N-استیل گلوکز آمین، آرابینوز، فکوز و گالاکتوز) در این زمینه بی‌تأثیر بوده‌اند. احتمالاً پروتئین‌های باند شونده به قندهای (N-استیل گالاکتوز آمین، مانوز، لاکتوز و فروکتوز) موجود بر روی سطح معده پشه یا پارازیت در اینترکشن *P. vivax* با معده *An. stephensi* نقش داشته و از حلقه‌های اصلی در رشد انگل در بدن پشه خواهند بود. به این ترتیب می‌توان با بررسی بیشتر تأثیر کربوهیدرات‌ها روی سیکل انگل در هر مرحله، در بدن پشه (معده و غدد بزاقی) به نکات مفیدی دست یافت که می‌تواند ما را در دستیابی به واکنش‌های بلوک کننده انتقال رهنمون نماید. **تشکر و قدردانی:** نویسندگان بر خود واجب می‌دانند تا از همکاران بخش‌های انگل‌شناسی آقایان سیدزاده، سطوت و سرکار خانم متولی حقی و حشره‌شناسی دانشکده بهداشت و ایستگاه تحقیقاتی ایرانشهر و مراکز بهداشتی و درمانی شهرستانهای ایرانشهر و پیشین که یاریگر ما در انجام این مطالعه بودند تشکر و قدردانی نمایند.

در این مطالعه نیز سعی شد تا برای اولین بار در ایران سیکل اسپروگونی انگل *P. vivax* در بدن پشه‌های *An. stephensi mysorensis* به شکل تجربی و در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار گیرد. علی‌رغم مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در طی سالهای متمادی در کشور، هنوز توانایی انتقال این گونه (*An. stephensi*) *mysorensis* و حتی دو سوش دیگر (Type form, Intermediate) مشخص نشده است ولی گفته می‌شود یکی از عمده‌ترین ناقل‌های منطقه جنوبی کشور از جمله ایرانشهر می‌باشد این در حالی است که گونه مزبور دارای سه سوش می‌باشد. اخیراً برخی مطالعات سیستماتیک انجام شده بر روی مشخصات تخم این گونه که در نواحی جنوبی کشور انجام شده پراکنندگی هر یک از این سیبلینگ‌ها را مورد بررسی قرار داده است و نتایج نشان می‌دهد که در شهرستان ایرانشهر از سه سوش مربوط به این گونه، سیبلینگ *An. Stephensi mysorensis* گونه فعال منطقه می‌باشد.<sup>۱۸،۱۹</sup> ولی ناقل بودن این سوش به شکل تجربی و در آزمایشگاه به اثبات نرسیده است. لذا مطالعه فوق اولین گام را برای اثبات این مسأله برداشته و دریافته است که سوش مزبور با توجه به وضعیت منطقه و مهاجر پذیر بودن آن و با توجه به بلوک کنندگی سیکل انگل *P. vivax* (۹۳/۹۱) ناقل توانایی در منطقه ایرانشهر خواهد بود و دارای قدرت انتقال می‌باشد، به گونه‌ای که آلودگی تجربی پشه‌ها با انگل *P. vivax* و فراهم آوردن شرایط اپتیمم برای آنها نشان داد که سیکل اسپروگونی انگل در بدن سوش مزبور با موفقیت سپری شده و به مرحله آلوده‌کنندگی یعنی مشاهده اسپروژوئیت در غدد بزاقی (۰۹/۰۶٪) رسیده است. این مسئله یعنی نگهداری آلودگی به پلاسمودیوم تا آخر عمر و برقراری سیکل انتقال، عامل هشدار دهنده برای کنترل این ناقل در کنار آنوفل کولیسیفاسیس است. در این مطالعه، در حین پیگیری سیکل اسپروگونی در بدن پشه از هر مرحله از رشد انگل در معده، اسلایدهای مطالعاتی مهمی اعم از پدیده آگرفلاژلیشن، اووکینت، اووسیست و اسپروژوئیت و زمانهای مشاهده آنها تهیه شد.

علاوه بر اثبات ناقل بودن گونه *An. stephensi mysorensis* به بررسی تأثیر احتمالی برخی از کربوهیدراتها و قندها بر رشد انگل در بدن ناقل پرداخته شد. مشابه این مطالعه و با گونه‌ای دیگر توسط Zieler در سال ۱۹۹۹ انجام شده است.<sup>۳</sup> وی در مطالعاتش ثابت نمود که انگل *P. gallinaceum* به شکل اختصاصی به نوع خاصی از

## References

1. McCutchan TF, Kissinger JC, Touray MG, Rogers MJ, Li J, Sullivan M. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malaras: biological and phylogenetic implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11889-94.
2. Edrissian GH. Malaria history and status in Iran. *J School Pub Health Inst Pub Health Res* 2002; 1: 50-60.
3. Zieler H, Nawrocki JP, Shahabuddin M. Plasmodium gallinaceum ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of Aedes aegypti by interaction with a carbohydrate ligand. *J Exp Biol* 1999; 202: 485-95.
4. Sinden RE. The cell biology of sexual development in plasmodium. *Parasitology* 1983; 86: 7-28.
5. Sinden RE. A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 598-605.
6. Sinden RE, Butcher GA, Billker O, Fleck SL. Regulation of infectivity of Plasmodium to the mosquito vector. *Adv Parasitol* 1996; 38: 53-117.
7. Sinden RE. Plasmodium differentiation in the mosquito. *Parasitologia* 1999; 41: 139-48.
8. Shahabuddin M. Plasmodium ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. *Parasitology* 1998; 116: 83-93.
9. Shahabuddin M, Cociancich S, Zieler H. The Search for Novel Malaria Transmission-blocking Targets in the Mosquito Midgut. *Parasitol Today* 1998; 14: 493-7.
10. Shahabuddin M, Costero A. Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 2001; 31: 231-40.
11. Shahabuddin M. Do Plasmodium ookinetes invade a specific cell type in the mosquito midgut? *Trends Parasitol* 2002; 18: 157-61.
۱۲. اکبرزاده ک. بررسی تکنیک های مختلف تغذیه مصنوعی آنوفل استفنسی در مقایسه با روش تغذیه طبیعی و ارائه مناسبترین روش کاربردی در انسکتاریومها. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۷.
13. Vaughan JA, Noden BH, Beier JC. Population dynamics of Plasmodium falciparum sporogony in laboratory-infected Anopheles gambiae. *J Parasitol* 1992; 78: 716-24.
14. Billingsley PF. Approaches to vector control: new and trusted. 2. Molecular targets in the insect midgut. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 136-40.
15. Simonetti AB. The biology of malarial parasite in the mosquito: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 519-41.
16. Warburg A, Miller L.H. Critical stages in the development of Plasmodium in mosquitoes. *Parasitology Today* 1991; 7: 179-181.
17. Nanda N, Dass CM, Sharma VP. An ultrastructural study on the sporogony of Plasmodium vivax in Anopheles stephensi. *Indian J Malariol* 1985; 22: 1-15.
۱۸. صفری ن. بررسی خاصیت هموآگلوتیناسیون میدگات فرمهای بیولوژیک و جمعیتهای جغرافیایی مختلف آنوفل استفنسی در جنوب ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی پزشکی، تهران: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۲.
۱۹. یعقوبی ف. بررسی تنوع مرفولوژیک و ژنتیکی آنوفل استفنسی در استانهای بلوچستان و هرمزگان. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی پزشکی، تهران: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۳.

## Sporogony cycle of plasmodium vivax in *anopheles stephensi* *mysorensis*: inhibitory effects of certain carbohydrates on parasitic development

Doosti S<sup>1</sup>  
Basseri H.R.<sup>1\*</sup>  
Nategh Pour M<sup>2</sup>  
Akbarzadeh K<sup>1</sup>  
Ladoni H<sup>1</sup>  
Shaeghi M<sup>1</sup>

1-Department of Medical  
Entomology and Vector Control  
2- Department of Medical  
Parasitology

Tehran University of Medical  
Sciences,

### Abstract

**Background:** Although there have been many studies on the role of mosquitoes in malarial transmission, the biology and interaction of plasmodium with its host is still not completely known. The aim of this study was primarily to follow the sporogony cycle of *Plasmodium vivax* in *Anopheles stephensi* *mysorensis* and then to explore the inhibitory effects of certain carbohydrates on parasitic development.

**Methods:** In a restricted insectary, *An. stephensi* were fed blood containing gametocytes from donor malaria patients. The development of plasmodium was followed by dissecting the infected mosquitoes and taking a smear at different time intervals. Other groups of *Anopheles* were fed infected blood plus one of the following carbohydrates: N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-galactosamine, arabinose, fucose, manose, lactose or galactose.

**Results:** Exflagellation occurred at 5 minutes after the blood meal and then ookinet was observed at 20 hours, while oocysts and sporozoites appeared in days 8 to 12. The results indicate that *An. stephensi* strain *mysorensis* has can transfer *P. vivax* extremely well. Furthermore, the development of *P. vivax* was completed in the mosquitoes that had been fed with N-acetyl-glucosamine, arabinose, fucose and galactose. In contrast, lactose, manose and N-acetyl-galactosamine interrupted the life cycle of the parasite.

**Conclusion:** The sugars lactose, manose and N-acetyl-galactosamine have an inhibitory role in of oocyst and sporozoite development. Therefore, the results of this study can be used as basic information for inhibiting malarial transmission.

**Keywords:** Malaria, sporogony cycle, *anopheles stephensi*, midgut, carbohydrate, plasmodium vivax.

\*Corresponding author, Depart.of  
Medical Entomology and Vector  
Control, School of Public Health  
and Institute of Public Health  
Research, PO Box 6446-14155,  
Tehran.  
Tel: +98-021-88951393  
E-mail: basserih@sina.tums.ac.ir