

Apoptosis as a Potential Target in Therapeutic and Vaccine Interventions against Parasitic Diseases

Roghiyeh Faridnia¹,
Hamed Kalani²,
Mahdi Fakhar³

¹ PhD Student in Parasitology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Infectious Diseases Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

³ Associate Professor, Department of Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 19, 2018 ; Accepted July 2, 2019)

Abstract

Apoptosis is a physiological cell death that occurs under normal conditions in major biological processes, including the removal of old, damaged, extra, or harmful cells. It plays an important role in natural evolution, tissue homeostasis, removal of cells damaged or infected by viruses, and removal of immune cells activated against self-antigens. The purpose of this review was to examine the role of apoptosis in parasites and helminths. In this study, four English databases and three Persian databases were used to investigate the articles published between 1999 and 2018. Findings showed that in the *Leishmania* parasites, *Plasmodium* and *Toxoplasma gondii* mimic apoptosis with the expression of phosphatidylserine on the surface of the infected macrophages and prevent the recognition of the infected cell by the host immune system. Also, excreted/secreted antigens in the helminths, including *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, and *Schistosoma haematobium* induce apoptosis in immune cells, especially in lymphocytes. Parasites follow different goals by inducing or preventing apoptosis and current article aimed at reviewing these aspects. Moreover, apoptotic blebs from parasite-infected cell can potentially stimulate the host's immune system, therefore, they could be further investigated in vaccine-related studies.

Keywords: apoptosis, parasitic infections, drug design, vaccine

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (175): 173-186 (Persian).

* **Corresponding Author: Mahdi Fakhar** - Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: mahdif53@yahoo.com)

آپوپتوز به عنوان هدف بالقوه در مداخلات دارویی و واکسن در بیماری های انگلی

رقیه فریدنیا^۱

حامد کلانی^۲

مهدی فخار^۳

چکیده

آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی در فرایندهای مهم بیولوژیکی سبب حذف سلول های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر شده و برای تکامل طبیعی، هموستاز بافتی، حذف سلول های تخریب شده یا آلوده به ویروس و حذف سلول های ایمنی فعال شده علیه آنتی ژن های خودی نقش بسیار مهمی را بر عهده دارد. هدف از این مطالعه مروری بررسی نقش آپوپتوز در تک یاخته ها و کرم های انگلی می باشد. در این مطالعه چهار پایگاه داده انگلیسی و سه پایگاه داده فارسی در بازه زمانی سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۱۸ بررسی شدند. نتایج بررسی این مطالعات نشان داد که در انگل های لیشمانیا، توکسوپلازما گوندی و پلاسمودیوم تقلید آپوپتوز با بیان فسفاتیدیل سرین بر روی سطح ماکروفاژهای آلوده و باعث ممانعت از شناخت سلول آلوده توسط سیستم ایمنی میزبان می شود. همچنین آنتی ژن های دفعی/ترشچی در کرم ها شامل اکینوکوکوس گرانولوزوس، اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس و شیسستوزوما همتوبیوم سبب القای آپوپتوز در سلول های ایمنی خصوصا در لنفوسیت ها می شود. انگل ها با ایجاد آپوپتوز و یا ممانعت از آن اهداف متفاوتی را دنبال می کنند که در این مقاله مروری جنبه های مختلف آن مورد بحث قرار گرفته است. همچنین، اجسام حاصل از آپوپتوز سلول آلوده به انگل قادرند سیستم ایمنی میزبان را به طور قوی تحریک کنند که در آینده می توان مطالعاتی در زمینه واکسیناسیون در رابطه با این اجسام انجام داد.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، عفونت های انگلی، طراحی دارو، واکسن

مقدمه

فیزیولوژیک سلولی بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و تمایز آن از نکروز معرفی شد که امروزه این پدیده در مطالعات ضد سرطان جایگاه ویژه ای را پیدا کرده است (۲). فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول تحت کنترل ژن ها صورت می گیرد که به منظور حذف سلول های غیرضروری و ناسالم به کار می رود (۳،۴).

آپوپتوز (Apoptosis) مرگ برنامه ریزی شده سلولی می باشد که در موجودات پرسلولی رخ می دهد (۱). آپوپتوز یک واژه یونانی به معنی ریزش برگ درختان پاییزی می باشد و اولین بار Kerr و همکارانش در سال ۱۹۷۲ تفاوت میان نکروز و آپوپتوز را کشف کردند و این موضوع جهت توصیف مرگ

Email: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، جاده فرح آباد، ساری، ایران

۱. دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۳. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۹/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۴/۱۱

کاهش محتویات درون سلولی رخ می‌دهد. در غیاب مارک‌های یوشیمیایی شایع مربوط به آپوپتوز نفوذپذیری اولیه غشا به نکروز مربوط می‌شود (۷). در آپوپتوز غشاء سیتوپلاسمی به صورت اجسام آپپتوتیک در می‌آیند، در حالی که در نکروز غشاء تخریب می‌شود و سبب آزاد شدن محتویات داخل سلولی می‌شود. ارگانل‌های سیتوپلاسمی در فرایند آپوپتوز دست نخورده باقی می‌مانند، در حالی که در نکروز تخریب می‌شوند (۹).

برخی داروها سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۰، ۱۱). مرگ‌میر ناشی از عفونت‌های انگلی اغلب به علت آسیب بافتی ناشی از مرگ سلول میزبان در نتیجه آپوپتوز می‌باشد. با این حال، گاهی جلوگیری از آپوپتوز توسط انگل ممکن است باعث بقاء آن در سلول میزبان شود (۱۲).

آپوپتوز از دو مسیر خارج سلولی و مسیر داخل سلولی انجام می‌شود (۱۳، ۱۴). به مسیر خارجی آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده‌های مرگ و به مسیر داخلی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز گفته می‌شود (۱۵). در مسیر داخلی در پاسخ به سیگنال‌های مرگ سلولی، نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری سبب آزاد شدن مولکول‌های پروآپپتوتیک از قبیل فاکتور القاء کننده آپوپتوز شده و موجب ورود سیتوکروم C از فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل سیتوپلاسم می‌شوند. مکانیسم‌های احتمالی عبارتند از باز شدن منفذ انتقال نفوذپذیری میتوکندریایی و یا تورم و پاره شدن غشاء خارجی میتوکندری است. در مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی کاسپاز آغازگر، کاسپاز ۹ می‌باشد. کاسپاز ۹ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی (کاسپاز ۳، ۶ و ۷) می‌گردد و در نتیجه فرایند آپوپتوز صورت می‌گیرد (۱۶). مولکول‌های مهم عامل آپوپتوز در مسیر خارج سلولی مرتبط با گیرنده القاکننده TNF، Fas لیگاند می‌باشد (۱۷). کاسپازها جز خانواده سیستئین پروتئازها هستند و نقش محوری در فاز اجرایی آپوپتوز دارند. در روند آپوپتوز، کاسپازها فعال شده و روی سوبسترای خود

آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی در فرایندهای مهم بیولوژیکی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر شده و برای تکامل طبیعی، هموستاز بافتی، حذف سلول‌های تخریب شده یا آلوده به ویروس و حذف سلول‌های ایمنی فعال شده علیه آنتی‌ژن‌های خودی نقش بسیار مهمی را بر عهده دارد. همچنین در تنظیم میزان رشد، تکثیر سلول‌ها، تکامل و سلامت بدن بسیار حائز اهمیت می‌باشد و در نتیجه عدم فعالیت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بروز بسیاری از بیماری‌های خود ایمن، سرطان‌ها، عفونت‌های ویروسی رخ می‌دهد (۳). همچنین افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی در بیماری‌هایی نظیر اختلالات نورودژنراتیو و ایدز دیده می‌شود (۵). آپوپتوز عملکرد طبیعی سلولی می‌باشد که با کمک آن رشد و تکثیر سلول‌های بدن تنظیم و از ایجاد سرطان جلوگیری می‌شود. در این فرایند، سلول مسئول مرگ خود است، که به آن خودکشی سلولی نیز گفته می‌شود (۶). تعریف واژه مرگ سلولی در کمیته نام‌گذاری (the Nomenclature Committee on Cell Death یا NCCD)، جنبه مورفولوژی مرتبط با مرگ یک سلول را توصیف می‌کند. فرایند آپوپتوز هم مانند تمام مسیرهای سلولی از مسیرهای مشخص و توسط تحریک‌های خاصی القا می‌شود. تغییرات سلولی در طی این فرایند شامل جمع شدن سلول، کاهش حجم سلول (پیکنوز)، فشرده شدن کروماتین، تکه تکه شدن هسته، برآمدگی در غشا پلاسمایی، قطعه قطعه شدن DNA، تولید اجسام آپوپتوتیکی و بیان مولکول‌های آپوپتوتیک داخل سلولی و خارج سلولی می‌باشد (۷، ۸). تفاوت اصلی این مسیر با نکروز سلولی در عدم ایجاد التهاب و اثر محدود به سلول‌های هدف است. طی فرایند آپوپتوز تغییرات ساختاری کمی در ارگانل‌های سیتوپلاسمی دیده می‌شود یا ممکن است تغییراتی نیز مشاهده نشود. در مقابل آن در مرگ سلولی ناشی از نکروز، ورم سریع سیتوپلاسم (انکوزیس)، پاره شدن غشای پلاسمایی و به دنبال آن

عمل می‌کنند و باعث تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک می‌شوند. بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپازها به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح می‌باشد. با بررسی فعالیت کاسپازها می‌توان مسیر آپوپتوز (خارجی و داخلی) را ارزیابی کرد. بررسی فعالیت کاسپازها با استفاده از سوبسترای اختصاصی آن‌ها صورت می‌گیرد (۱۸). با توجه به نقش بالقوه آپوپتوز در طراحی مطالعات دارویی و واکنش علیه عفونت‌های انگلی و عدم اطلاعات منسجم در این خصوص، به همین منظور مطالعه مروری نظام‌مند حاضر طراحی و اجرا شد.

جستجوی منابع

در این مطالعه جستجوی منابع در ۷ پایگاه داده شامل ۴ پایگاه داده انگلیسی (PubMed, Scopus, Embase, SienceDirect) و ۳ پایگاه داده فارسی (Islamic, Scientific Information Database [SID], Magiran, World Science Citation Center [ISC]) و از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۱۸ انجام شد. جستجو هم به زبان فارسی و هم انگلیسی انجام گرفت. برای جستجو از ترکیب کلمات "Helminths"، "Apoptosis"، "vaccine"، "protozoan"، "parasitic protozoan" استفاده شد.

جدول شماره ۱: مکانیسم‌های اختلال انگل‌ها در فرایند آپوپتوز

منبع	نام انگل	مکانیسم اختلال در فرایند آپوپتوز	واکنش سیستم ایمنی	عوامل مداخله‌گر در آپوپتوز
(۲۳)، (۲۸-۳۷)، (۳۵-۳۶)	لیشمانیا	- تقلید آپوپتوز با بیان فسفاتیدیل سرین بر روی سطح ماکروفاژهای آلوده و ممانعت از شناخت سلول آلوده توسط سیستم ایمنی میزبان - اتوآپوپتوز (آپوپتوز خود انگل) توسط مکانیزم ناشناخته که به بقای انگل‌های دیگر کمک می‌کند.	- مهار پروتئین‌های التهابی ماکروفاژ میزبان - القاء سیتوکین‌های ضد التهابی عامل تکثیر و پیشرفت بیماری	- افزایش سایتوکین‌های Th1 شامل TNF و IFN-γ - افزایش سایتوکین‌های Th2 شامل IL-4، IL-5، IL-13
(۱۲)، (۲۱)، (۴۰-۳۹)	توکوپلاسما گوندی	- تقلید آپوپتوز با بیان فسفاتیدیل سرین بر روی سطح سلول آلوده و ممانعت از شناخت سلول آلوده توسط سیستم ایمنی میزبان و تقصیر در بیان پروتئین‌های میزبان - بقای انگل درون سلول آلوده	- فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی - تغییر در بیان پروتئین‌های میزبان	- بروز مارکرهای TRAIL، Fas-L
(۳۰)، (۴۱-۴۲)	پلاسمودیوم فالسی پاروم	بیان فسفاتیدیل سرین در غشای خارجی اووکیئت	- تغییر در میزان سایتوکین و کموکاین‌های پیش التهابی	- کاهش سایتوکین‌های TNF-α، IL-6، MCP - افزایش سایتوکین‌های IL-10
(۲۲-۲۱)، (۴۶-۴۴)	تریاتوما کروزی	اتوآپوپتوز (آپوپتوز خود انگل) توسط لکین‌های مانند کانکائوالین A، پروستاگلاندین‌ها و زیاد بودن تعداد انگل	- القا پاسخ‌های التهابی با افزایش آلودگی و در نتیجه آپوپتوز سلول‌های غیر ایمنی نظیر سلول‌های اندوتلیال عروق	- تولید PGD2 توسط انگل و القای آپوپتوز - جلوگیری از آپوپتوز توسط انگل در سلول‌های قلبی آلوده با افزایش TNF-α و فعال‌سازی NF-κB - افزایش بیان مولکول‌های Fas و Fas-L در موش‌های آلوده
(۴۸)، (۵۴-۵۲)	کیست هیداتیک تک حفره‌ای	آپوپتوز لنفوسیت‌های انسانی توسط فاکتورهای موجود در مایع کیست هیداتیک	- با تحریک سایتوکاین‌ها به سمت Th1 رفته و رها سازی رادیکال‌های آزاد	- افزایش TRAIL، Fas-L
(۵۵-۵۶)	کیست هیداتیک حبابچه‌ای	آپوپتوز سلول‌های ایمنی توسط مواد دفعی تریشی مرحله ناستوتود	- افزایش تعداد لنفوسیت‌های T تنظیمی بیان‌کننده Foxp3+	- افزایش سایتوکین‌های IL-10 و ممانعت از آپوپتوز
(۵۸-۵۷)	شیستوزوما همتونیوم	مواد مترشحه از شیستوزومولا و القای مسیر آپوپتوز با فعال‌سازی کاسپاز ۳ و ۸	- آپوپتوز سلول‌های CD4	- فعال کردن مارکرهای Fas و Fas-L و ممانعت از ایجاد گرانولوما در مانه

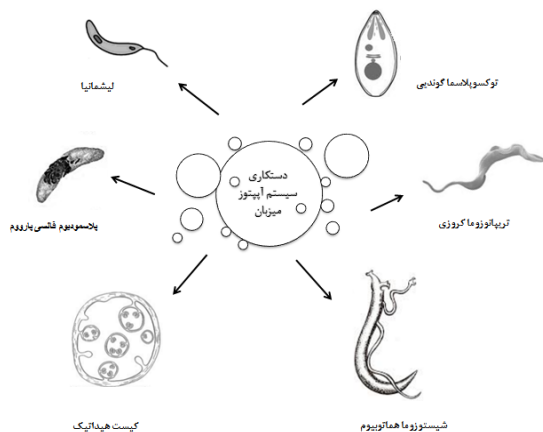
غربالگبری و انتخاب مطالعات

مطالعاتی که در آن‌ها از آپوپتوز در مداخلات دارویی و واکنش علیه عفونت‌های انگلی بیماری‌زای سنجیده شد، انتخاب شدند. مطالعات را وارد نرم‌افزار EndNote نسخه ۷ نموده و مطالعات تکراری حذف شدند. سپس خلاصه مقالات توسط دو نویسنده به طور مستقل مطالعه شدند و مقالات مرتبط انتخاب شدند. مطالعات انتخاب شده توسط سه نویسنده به دقت خوانده شده و آن‌هایی که معیار ورود را داشتند وارد مطالعه شدند و سایر مطالعاتی که فاقد اطلاعات کافی، وجود فقط خلاصه مقاله، عدم تطبیق روش‌ها با نتایج، تفسیر نادرست نتایج، بودند از مطالعه حذف شدند. اختلاف نظر بین سه نویسنده توسط نویسنده دیگر برطرف شد.

استخراج و آنالیز داده‌ها

اطلاعات مورد نیاز توسط دو نویسنده مستقل از مقالات انتخاب شده استخراج شد و در صورت نیاز، اختلاف بین آن دو، توسط نویسنده دیگر برطرف شد. اطلاعات استخراج شده در جدول شماره ۱ آورده شده‌اند و شامل مکانیسم اختلال در فرایند آپوپتوز، واکنش سیستم ایمنی، و عوامل مداخله‌گر در آپوپتوز بود.

توکسوپلازما گوندی، تریپانوزوما کروزی، لیشمانیا، تیلریا، کریپتوسپوریدیوم پارووم و نوزوما آلجرا می‌باشند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: سیمای کلی از دستکاری سیستم آپتوز توسط انگل‌ها

اگرچه این انگل‌ها مکانیسم‌های متفاوتی در ورود به سلول میزبان دارند و همچنین موقعیت آن‌ها درون سلول با یکدیگر متفاوت می‌باشد اما از مکانیسم‌های مشابهی برای ممانعت از آپتوز استفاده می‌کنند. تاکنون دو خانواده از مولکول‌ها که از آپتوز ممانعت می‌کنند شناسایی شده‌اند. یکی از این مولکول‌ها پروتئین‌های شوک حرارتی بوده که توسط انگل القا شده و با مولکول‌های مشارکت‌کننده در فرایند آپتوز مداخله می‌کند. مولکول دیگر فعال‌سازی فاکتور نسخه برداری NF- κ B می‌باشد که تولید آن توسط انگل در سلول میزان افزایش پیدا می‌کند و نسخه برداری ژن مربوط به مولکول‌های ضد آپتوز را کاهش می‌دهد (۲۱).

مطالعات اخیر نشان داد که فاگوسیتوز سلول‌های آپوتوتیک از طریق گیرنده‌های سطحی سلول‌های بیگانه خوار می‌باشد و واسطه‌های ضد التهابی مانند پروستاگلاندین‌ها و $TGF-\beta$ را ترشح می‌کنند. شواهد اخیر نشان داد که ممانعت از آپتوز در ماکروفاژهای حاوی تریپانوزوما کروزی، رشد انگل را در ماکروفاژها افزایش می‌دهد و در شرایط آزمایشگاهی باعث تشدید پارازیتی می‌شود (۲۲). همچنین آپتوز در کرم‌های پهن

تاثیر آپتوز بر روی سیستم ایمنی

در مراحل اولیه لنفوپوز مسیر پیام رسانی فاکتور رشد یکی از تنظیم‌کننده‌های ضروری برای هموستازی بوده که این عمل را از طریق افزایش بقای پیش‌سازهای لنفوسیت انجام می‌دهد. در طی تمایز پیش‌سازهای لنفوسیت فرایند آپتوز تضمین می‌کند که لنفوسیت‌ها رسپتورهای مربوط به عملکرد خود را بیان می‌کنند و این عمل برای حذف لنفوسیت‌هایی که خطرناک بوده و ممکن است بر علیه بدن میزبان واکنش نشان دهند، ضروری می‌باشد. بسیاری از این فرایندهای گزینشی برای تمایز لنفوسیت‌ها توسط پروتئین‌های خانواده BCL-2 انجام می‌شود که این پروتئین‌ها جزء اعضای پیش آپتوزی، ضد آپتوزی و رسپتور مرگ TNF می‌باشند. نقص در عملکرد فاکتورهای تنظیم‌کننده مرگ سلولی می‌تواند منجر به شرایط پاتولوژیک همچون نقص سیستم ایمنی، بیماری‌های خودایمن و سرطان شود (۱۹). بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در از بین بردن انگل‌ها مربوط به آپتوز می‌باشد (۲۰).

آپتوز در انگل‌ها

تک یاخته‌های انگلی که درون سلول زندگی می‌کنند از تخریب سلول آلوده توسط سیستم ایمنی جلوگیری می‌کنند. سلول آلوده دچار مرگ خود به خودی یا آپتوز نمی‌شود. سلول‌هایی که دچار آپتوز می‌شوند توسط ماکروفاژها شناسایی و بلعیده می‌شوند و انگل درون سلول همراه با سلول از بین می‌رود. بنابراین انگل برای بقای خود درون سلول نیازمند ممانعت از آپتوز سلول می‌باشد. در دهه اخیر مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی که از آپتوز جلوگیری می‌کنند مشخص شده‌اند. این موضوع که انگل برای بقای خود از مرگ سلول آلوده جلوگیری می‌کند موضوع عجیبی نمی‌باشد. این مکانیسم ممانعتی در ویروس‌ها، باکتری‌ها و تک یاخته‌های انگلی مشاهده شده است. تک یاخته‌های درون سلولی که از آپتوز جلوگیری می‌کنند شامل

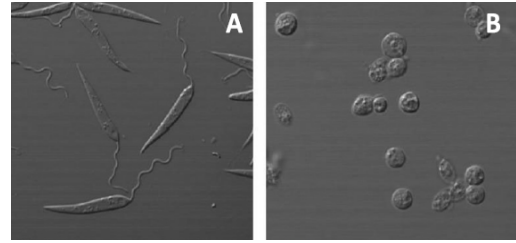
در دوران دگرذیسی حائز اهمیت می‌باشد و باعث کنترل تعداد سلول و حذف سلول‌های غیر ضروری می‌شود (۸).

لیشمانیا (*Leishmania spp.*)

لیشمانیوز مجموعه‌ای از بیماری‌های تک‌یاخته‌ای قابل انتقال بین انسان و پستانداران است که در بیش از ۸۰ کشور جهان شایع می‌باشد (۲۳). این بیماری به‌طور عمده شامل لیشمانیوز پوستی (سالک)، لیشمانیوز احشایی (کالا آزار)، لیشمانیوز پوستی-مخاطی است و توسط گونه‌های متعدد تک‌یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. آمار ثبت شده مبتلایان به سالک در کشور ما سالیانه حدود ۲۰ هزار نفر است و به نظر برخی متخصصان که ارقام واقعی پنج برابر این تعداد بوده و پس از مالاریا از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در ایران به شمار می‌رود (۲۴، ۲۵). در سیکل زندگی این انگل، آماستیگوت‌ها در سلول‌های فاگوسیتی میزبان، در فاگولیزوزوم‌های اسیدی، تکثیر پیدا می‌کند، در حالی که پروماستیگوت‌ها در روده پشه‌خاکی ناقل تکثیر پیدا می‌کند. بنابراین، انگل به منظور تکمیل چرخه زندگی خود باید با ماکروفاژهای فعال شده سیستم ایمنی ذاتی بدن میزبان مهره دار مقابله کند و به مقابله با تعاملات پیچیده میزبان بپردازد. فرم آماستیگوت با تقلید آپوتوز، فسفاتیدیل سرین را بر روی ماکروفاژ آلوده بیان می‌کند و به این ترتیب از شناسایی سلول آلوده توسط میزبان در امان می‌ماند. مهار پروتئین‌های ماکروفاژ میزبان و القاء سیتوکین‌های ضد التهابی باعث تکثیر انگل و پیشرفت بیماری می‌شود. جالب توجه است که ماکروفاژهای حاوی آماستیگوت مشتق شده از زخم ایجاد شده در موش BALB/c، میزان بیش‌تری از مولکول فسفاتیدیل سرین را در سطح خود در مقایسه با ماکروفاژهای حاوی آماستیگوت به دست آمده از موش‌های C57BL/6 نشان می‌دهد (۲۶، ۲۷). در امان ماندن ماکروفاژهای آلوده از سیستم ایمنی میزبان و زنده ماندن آن‌ها وابسته به مکانیسم‌های ماکروفاژ غیر قطبی فعال شده (با

فعال‌سازی همزمان iNOS و آرژیناز) می‌باشد که توسط فعالیت ضد لیشمانیایی CD4⁺ T cells القا می‌شود. طی فرضیه ای، پاسخ غیر قطبی که منجر به بیان فسفاتیدیل سرین شده منجر به کاهش تولید NO شده و انگل از آسیب در امان می‌ماند و همزمان سنتز پلی‌آمین‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند. پاسخ ایمنی میزبان در مقابل انگل لیشمانیا آمازوننسیس معمولاً بسیار ضعیف است و از سیستم Th1/Th2 در مقایسه با لیشمانیا ماژور پیروی نمی‌کند. طی بررسی‌هایی در موش‌های آلوده به لیشمانیا آمازوننسیس دیده شد که Th1 سایتوکین‌های IFN گاما و TNF را ترشح می‌کند و سایتوکین‌های Th2 شامل IL-4، IL-5 و IL-13 و همچنین سایتوکین‌های تنظیمی TGFβ و IL-10 می‌باشند.

در پروماستیگوت‌ها، شرایط متفاوتی با آماستیگوت‌ها اتفاق می‌افتد. هنگامی که فرم پروماستیگوت لیشمانیا در شرایط برون‌تنی (in vitro) محیط کشت از مرحله لگاریتمی به مرحله ایستایی تبدیل می‌شود، فراوانی فسفاتیدیل سرین روی سطح انگل افزایش می‌یابد. علاوه بر این، یک زیر مجموعه از پروماستیگوت‌هایی از روده میانی پشه‌خاکی فلبوتوموس جمع‌آوری شد که به انکسین V-Annexin متصل شدند و به این ترتیب وجود فسفاتیدیل سرین تشخیص داده شد. در هر دو حالت، انگل دچار مرگ آپوتوزی می‌شوند (تصویر شماره ۲). با این وجود، اضافه کردن پروماستیگوت‌های آپوتوز شده به محلول تزریق حاوی پروماستیگوت‌های زنده برای ایجاد بیماری در کف پای مدل حیوانی ضروری می‌باشد. پروماستیگوت‌های آپوتوز شده باعث غیرفعال کردن لکوسیت‌های چند هسته‌ای شده و بقای پروماستیگوت زنده را درون سلول تضمین می‌کند. پروماستیگوت‌های آپوتوز شده در واقع با مرگ خود بقای پروماستیگوت‌های زنده را تضمین می‌کنند که این رابطه ایثارگرانه در بین جمعیت لیشمانیایی می‌باشد. یک چنین وضعیتی در جمعیت انگل‌های لیشمانیا آمازوننسیس نیز مشاهده شده است.



تصویر شماره ۲: مارکرهای آپوپتوز پروماستیگوت های رشد یافته لیشمانیا اینفانتوم در محیط برون تنی. شکل A مربوط به پروماستیگوت های کشیده رشد یافته لیشمانیا اینفانتوم می باشد و شکل B پروماستیگوت های گرد شده لیشمانیا اینفانتوم در حضور داروی محرک آپوپتوز ادلفوزین را نشان می دهد (۲۸).

مطالعات جدید نشان دهنده این است که روند آپوپتوز علاوه بر جانداران پر سلولی در تک یاخته های یوکاریوتی مانند خانواده کینتوپلاستیدا نیز رخ می دهد و این موجودات از این نوع مرگ در جهت کنترل جمعیت سلولی خود استفاده می کنند. تجویز برخی داروها موجب القای مرگ سلولی در انگل لیشمانیا می شود. خانواده کاسپازها آنزیم هایی هستند که در روند آپوپتوز جانداران پرسلولی نقش اساسی و با عملکرد آبخاری خود موجب ایجاد واکنش های آپوپتوز و در نهایت مرگ سلول می شوند. مطالعات اخیر نشان می دهند که ژن کاسپاز در انگل های لیشمانیا وجود ندارد، بلکه هومولوگ آن ژنی به نام متاکاسپاز است که در کینتوپلاست وجود دارد و از طریق میتوز به هسته منتقل می شود. پس از تبدیل sbV به sbIII, sbIII از طریق AQP وارد سلول شده و باعث القای PCD می گردد. پروتئینی به نام SKCRP14.1 (Small kinetoplast calpain related protein) به همراه چند پروتئین دیگر باعث قطعه قطعه شدن DNA می شوند و سرانجام باعث تغییر نفوذپذیری غشا و در معرض قرارگیری فسفاتیدیل سرین می شود (۲۹).

اخیرا نشان داده شده که چهار داروی ضد لیشمانیایی (آمفوتریسین B، کورکومین، میلنفوسین و پنتامیدین) و مولکول دیگری به نام H₂O₂ در القاء آپوپتوز در انگل لیشمانیا نقش دارند (۳۰).

از جمله علل دخیل در مقاومت به گلوکانتیم شامل افزایش بیان یوبیکویتین و ژن های AAP3 و افزایش فعالیت PTP، PGK، MRPA و مهار ژن های MAPK و AQP1 و ژن های کلسینورین می باشد. ژنوم لیشمانیا حاوی 8272 ژن کدکننده پروتئین می باشد که تنها ۳۶ درصد از این ژن ها دارای عملکردی باشند (۳۱). از میان این ژن ها ژن MAPK واسطه مهم در انتقال سیگنال، تکثیر، پاسخ به استرس و آپوپتوز در سلول های یوکاریوت است (۳۲).

بعد از شش دهه استفاده از گلوکانتیم، مکانیسم عمل این دارو به تازگی مشخص شده است. تمام

در شرایط درون تنی (in vivo) طی تولید اجسام متاسیکلیک در روده پشه خاکی لوتزومیا لونجی پالپس مشاهده شد که به صورت طبیعی یک زیرمجموعه ای از انگل های متاسیکلیک به وسیله آپوپتوز می میرند. پروماستیگوت های آپوپتوز شده تنها در ناحیه قدامی تا مرز پیشین روده میانی پشه خاکی ناقل یافت می شوند. این امر نشان می دهد که این نوع مرگ به صورت تصادفی رخ نمی دهد و بخشی از فرآیند متمایز در شرایط درون تنی می باشد. انگل های دارای فسفاتیدیل سرین بر روی سطح خود، در طی مرگ آپوپتوتیک بخشی از مورفولوژی آنها دچار تغییر می شود اما فسفاتیدیل سرین به طور دائمی در سطح سلول آلوده باقی نمی ماند و برای ایجاد پیشرفت ضایعه در شرایط درون تنی، انگل های زنده باید به طور همزمان به محلول تلقیحی میزبان پستاندار اضافه شوند. در این شرایط، انگل های زنده، اشکال عفونی هستند، در حالی که انگل های آپوپتوز شده حاوی فسفاتیدیل سرین، از واکنش التهابی ماکروفاژ جلوگیری می کند (۲۶).

حدود ۲۰ درصد پروماستیگوت های فاز ثابت در مجاورت شوک حرارتی با حضور کلسیم دچار تغییرات مورفولوژیکی می شوند. این تغییرات بسیار شبیه به آپوپتوز می باشند. این تغییرات شامل تجمع کروماتین به صورت تکه تکه شدن هسته شبیه به اجسام آپوپتوزی بوده در حالی که سیتوپلاسم خود را به صورت طبیعی حفظ می کند (۲۲).

داروهای آنتیموان پنج ظرفیتی (sbV) باید به فرم سه ظرفیتی (sbIII) تبدیل شوند تا قدرت کشندگی داشته باشند. فرم سه ظرفیتی sbIII باعث آپوپتوز و در نتیجه قطعه قطعه شدن DNA و انتقال فسفاتیدیل کولین به غشای پلاسمایی می‌گردد (۳۳). مشخص شده است که در پیشرفت زخم لیشمانیای ماژور مارکرهای آپوپتوتیک Fas, Fas-L که در القای آپوپتوز نقش دارند عامل تشکیل زخم‌های پوستی هستند (۳۴). انگل لیشمانیا با فعال کردن سیگنال‌های PI3K/Akt و جلوگیری از فعالیت کاسپاز ۳ باعث تاخیر در فعالیت آپوپتوز در سلول میزبان می‌شود (۳۵).

توکسوپلازما گوندیی (*Toxoplasma gondii*)

توکسوپلازما گوندیی انگل درون سلولی است که مهره داران زیادی را آلوده می‌کند. فرم فعال و مهاجم آن تاکی زوئیت می‌باشد (۳۶). فرم تاکی زوئیت به سلول میزبان حمله کرده و در واکنش‌های پارازیتوفورس جای می‌گیرد و در آن تکثیر یابد. با گذشت زمان انگل به صورت مکرر پروتئین‌های راپتری (ROP) و گرانل‌های متراکم (GRA) را ترشح می‌کند که منجر به نفوذ انگل در سلول میزبان می‌شود. انگل می‌تواند با فرستادن سیگنال و فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی، بیان پروتئین‌های میزبان را تغییر دهد که تعدادی از این پروتئین‌ها نقش تنظیمی در فعالیت آپوپتوز داشته و انگل با مهار این پروتئین‌ها مانع از آپوپتوز سلول آلوده شده که از این طریق در واقع بقای خود را درون سلول آلوده تضمین می‌کند (۳۷). طی مطالعه‌ای که در شرایط برون‌تنی انجام شد، مشاهده شد که سلول‌های دندریتیک آلوده به توکسوپلازما گوندیی، سبب القا آپوپتوز سلول‌های T و بروز مارکرهای Fas-L, TRAIL شده و از طریق Th1 و Th2 باعث سرکوب پاسخ‌های ایمنی می‌شود (۳۸).

پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*)
مطالعات کمی در مورد مارکرهای ایجاد کننده آپوپتوز در این انگل وجود دارد. اکثر مطالعات انجام

شده بر روی مرحله جنسی داخل گلبول قرمز پلاسمودیوم فالسی پاروم بوده که در محیط برون‌تنی انجام شده است. مرگ سلولی القا شده توسط دارو از یک استرین انگل به استرینی دیگر متفاوت بوده است. مارکرهای شبه آپوپتوز مرگ سلولی در مرحله متحرک زیگوت و اووکینت در لومن روده میانی پشه خاکی در محیط درون‌تنی و برون‌تنی دیده می‌شود (۳۹). واکنش تنها در مرحله خارج از گلبول قرمز اسپروزوئیت‌ها و مرحله کبدی انگل اثر می‌گذارد و باعث بهبود عفونت، علائم بالینی و انتقال بیماری می‌شود. سلولی که توسط یک عامل بیماری‌زا آلوده می‌شود به طور طبیعی تمایل به آپوپتوز شدن دارد تا با مرگ خود باعث از بین رفتن انگل و در نتیجه ممانعت از انتشار آن شود. عوامل بیماری‌زای داخل سلولی همچون ویروس‌ها، باکتری‌ها و تک‌یاخته‌ها برای بقای خود نیاز به ممانعت از القای آپوپتوز توسط سلول دارند که این توانایی با مطالعه بر روی عوامل بیماری‌زای داخل سلولی که توسط اشعه تضعیف شده‌اند اثبات گردید، به طوری که عوامل بیماری‌زای تضعیف شده قادر به ممانعت از آپوپتوز نبوده در حالی که عوامل پاتوژن فعال از آپوپتوز سلول آلوده ممانعت می‌کنند. به نظر می‌رسد هپاتوسیت‌های آلوده شده به انگل مالاریا از طریق القای مکانیسم‌های داخل سلولی و نه خارج سلولی وابسته به گیرنده‌های سلولی و یا وابسته به گرانزیم/پروتئین دچار آپوپتوز می‌شود (۴۰). اسپروزوئیت‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم، سایتوکاین و کموکاین‌های پیش التهابی از جمله TNF- α , IL-6 و MCP-1 را کاهش و مق‌مدار سایتوکاین‌های ضد التهابی نظیر IL-10 را افزایش می‌دهند که این مکانیسم‌ها منجر به القای آپوپتوز ماکروفاژهای کبدی می‌شود (۴۱).

تریپانوزوما کروزی (*Trypanosoma cruzi*)

لکتین‌هایی مانند کانکاناوالین A (Concanavalin A) اولین مارکری می‌باشد که باعث القای بیان آپوپتوز در این انگل می‌شود. علاوه بر آن،

وجود پروستاگلاندین‌ها و تراکم انگل‌ها در محیط کشت می‌تواند منجر به تحریک ایجاد آپوتوز شود. همچنین مرگ سلولی می‌تواند از طریق دخالت RNA های ژن‌های حیاتی نیز القا شود. این فاکتورهای ذکر شده در مورد القای آپوتوز در انگل لیثمانیا صادق نمی‌باشند. این فاکتورها می‌توانند باعث القا یا مهار مرگ سلولی در این انگل شوند (۴۲). در مطالعات مختلف نشان داده شده که تولید PGD2 توسط انگل موجب القای آپوتوز شده و جالب است که در سلول‌های قلبی آلوده، انگل با افزایش TNF- α و فعال‌سازی NF-Kb موجب مهار آپوتوز می‌شود (۴۳، ۴۴).

کیست هیداتیک (Hydatid cyst)

کیست هیداتیک بیماری جهان شمول مشترک بین انسان و دام است که عمدتاً توسط مرحله لاروی کرم نواری اکینو کوکوس گرانولوزوس، سستودی از خانواده تیده ایجاد می‌شود. بیماری در میزبان‌های واسط از جمله حیوانات علفخوار و انسان عامل ایجاد کیست هیداتیک و در میزبان نهائی (سگ سانان) ایجاد بیماری هیداتیدوز می‌کند. وجود انگل در بدن میزبان باعث القای واکنش سیستم ایمنی قوی در بدن میزبان می‌شود که باعث آزاد شدن انواع مختلف اینترلوکین شده که نقش مهمی در کنترل رشد کیست در بدن میزبان دارد (۴۵). از مکانیسم‌هایی که در از بین بردن کیست هیداتیک و نابارور کردن کیست‌های بارور اشاره کرد، ایمنی ذاتی انسان بر علیه مایع و لایه‌های کیست هیداتیک می‌باشد (۴۶). از مسیرهای ایمنی ذاتی میزبان علیه کیست هیداتیک می‌توان مسیرهای Toll-like رسپتورها و آپوتوز را نام برد (۴۷، ۴۸). اجزای ایمنی موجود در لایه‌های مختلف کیست هیداتیک نقش مهمی در عدم شکل‌گیری کیست هیداتیک در بدن میزبان دارند (۴۹). همچنین ایمونوژن‌های مایع کیست که منجر به آپوتوز لنفوسیت‌های انسانی می‌شوند، یک مکانیسم در بقای کیست هیداتیک در مبتلایان می‌باشد (۵۰). آپوتوز علیه

لایه‌های مختلف (لایه‌های فیروز و ژرمینال) و مایع کیست هیداتیک باعث نابارور شدن کیست‌های بارور می‌شود (۵۱). در لایه فیروزی کیست هیداتیک، سیستم ایمنی ذاتی از جمله ماکروفاژها و اعضای آپوتوز جای دارند که با تحریک سایتوکاین‌ها به سمت Th1 می‌روند و با رهاسازی رادیکال‌های آزاد از جمله اکسیژن و نیتروژن سبب نابارور شدن این کیست‌ها می‌شوند (۴۹). کمپلکس تخریب DNA در پروتواسکولکس درمان شده با دگزامتازون در سطح بالایی قرار دارد که این امر موجب ناباروری کیست‌های هیداتیک می‌شود (۵۱). در افراد مبتلا به کیست هیداتیک، احتمالاً مسیر ایمنی آپوتوز میزبان بر علیه لایه ژرمینال کیست هیداتیک بارور به عنوان یکی از مسیرهای مهم در سرکوب و غیر بارور کردن کیست هیداتیک محسوب می‌شود. نتایج حاصل از مطالعه‌ای نشان داد که شدت بیان ملکول‌های القاکننده آپوتوز TRAIL و Fas-L در لایه ژرمینال کیست هیداتیک نابارور در مقایسه با کیست بارور و بافت کنترل سالم اطراف کیست در سطح نسبتاً بالایی قرار دارد که نقش مهمی در نابارور کردن کیست‌های بارور دارد. وجود آپوتوز در کیست هیداتیک با قطعه قطعه شدن هسته، ایجاد اجسام آپوتوتیک در لایه ژرمینال و اندازه‌گیری کاسپاز ۳ در لایه ژرمینال پروتواسکولکس مشخص می‌شود، به طوریکه میزان کاسپاز ۳ در لایه ژرمینال کیست‌های غیر بارور ۱۰ برابر کیست‌های بارور است (۵۲). تولیدات دفعی ترشحی لارو اکینو کوکوس مولتی لوکولاریس باعث القا آپوتوز در سلول‌های دندرتیک در شرایط برون تنی می‌شود (۵۳).

در مراحل اولیه چرخه زندگی اکینو کوکوس مولتی لوکولاریس یعنی مرحله انکوسفر مواد دفعی/ترشحی انکوسفر موجب بلوغ سلول‌های دندرتیک شده و تولید IL-10 را در آنها القا می‌کند، در حالی که مواد دفعی/ترشحی متاستود بر بلوغ سلول‌های دندرتیک تاثیر نداشته اما موجب افزایش تعداد لنفوسیت‌های T تنظیمی بیان‌کننده Foxp3+ می‌شود. همچنین مواد

دفعی/ترشحاتی مرحله پروتواسکولکس قادر به انجام هیچ کدام از موارد ذکر شده نمی‌باشد (۵۴).

شیستوزوما هماتوبیوم (*Schistosoma haematobium*)

مطالعات کمی در زمینه ارتباط این انگل با آپوپتوز انجام شده است. مطالعه ای نشان داد که تخم شیتوزوما هماتوبیوم موجب آپوپتوز سلول‌های CD4⁺ و فعال کردن مارکرهای Fas و Fas-L شده و از ایجاد گرانولوما در مثانه جلوگیری می‌کند (۵۵). همچنین مواد مترشحه از شیتوزومولا موجب القای مسیر آپوپتوز با فعال‌سازی کاسپاز ۳ و ۸ شده که آپوپتوز در سلول‌های CD4⁺ T و CD8⁺ و نه لنفوسیت‌های B زیرپوستی مشاهده می‌شود (۵۶).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آپوپتوز فرایندی است که طی آن یک سلول به تکه‌های کوچک‌تر تبدیل شده که این عمل به صورت عادی در سلول‌های سوماتیک اتفاق می‌افتد. انگل‌ها در طی فرآیندهای مختلف از آپوپتوز به نفع خود استفاده می‌کنند. برخی از تک یاخته‌ها با مهار آپوپتوز در سلول آلوده و به طور همزمان تحریک بیان فسفاتیدیل سرین بر روی سطح سلول آلوده آپوپتوز را در سلول تقلید کرده و موجب فرار انگل از سیستم ایمنی می‌شوند. همچنین، گاهی انگل‌ها با ترشح مولکول‌هایی موجب آپوپتوز در سلول‌های ایمنی میزبان نظیر لنفوسیت‌ها شده و از این طریق موجب کاهش پاسخ‌های ایمنی می‌شوند. علاوه بر این، در برخی موارد انگل‌ها موجب آپوپتوز خود شده و گمان می‌رود که این عمل در بقا سایر انگل‌های موجود نقش داشته باشد. القا آپوپتوز توسط انگل‌ها می‌تواند رویکرد جدیدی را به همراه داشته باشد و از آن در مطالعات ضد سرطان استفاده کرد. اجسام حاصل از آپوپتوز ماکروفاژهای آلوده به انگل از جمله انگل لیشمانیا قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان بوده که به دنبال آن موجب تغییر در فعالیت‌های لنفوسیت‌ها، مولکول‌های تنظیم‌کننده و پروتئین‌های التهابی می‌شود که این موضوع جای تحقیق و بررسی بیش‌تری داشته و می‌تواند

در آینده به عنوان رویکردی در زمینه مطالعات واکسیناسیون در انگل‌ها از جمله لیشمانیا مورد بحث و بررسی قرار گیرد. از آنجایی که درمان فعلی انواع لیشمانیوز بر اساس داروهای شیمیایی می‌باشد و کاربرد آن‌ها با محدودیت‌های جدی مانند هزینه بالا، سمیت، عوارض مصرف دارو و اثربخشی کم مواجه است، موفقیت‌هایی که در زمینه واکسیناسیون علیه انگل لیشمانیا به دست آمده، به‌طور مشخص نشانگر نیاز بیش‌تر به انجام تحقیقات و سرمایه‌گذاری در زمینه تولید واکسن مناسب علیه لیشمانیا می‌باشد (۵۷).

امروزه داروهای زیادی برای درمان انواع لیشمانیوزها به کار برده می‌شود از جمله داروی ضد انگلی آمفوتریسین B را می‌توان نام برد ولی درمان‌های دارویی باعث ریشه‌کنی بیماری نمی‌شوند. امروزه واکسنی که بتواند ایمنی طولانی مدت و موثری در برابر لیشمانیا ایجاد کند، وجود ندارد. بنابراین تحقیقات و مطالعات زیادی در زمینه تهیه واکسن مناسب ضروری می‌باشد (۵۸). برای طراحی یک واکسن ایده آل علیه بیماری لیشمانیوز نیاز به یک آنتی ژن مناسب و همچنین سیستم تحویل آنتی ژنی مناسبی برای ایجاد پاسخ ایمنی مورد نیاز می‌باشد که تا به امروز در حال تحقیق و بررسی می‌باشد (۵۹).

اخیرا نقش واکسن‌های پروآپوپتوزی (Proapoptosis) در تحریک واکنش‌های ایمنی مورد مطالعه قرار گرفته است و عملکرد موثری در برابر بیماری‌های عفونی و سرطان داشته‌اند. اجسام ناشی از آپوپتوز که در القای التهاب نقش دارند، ممکن است سبب افزایش کارایی واکسن شوند چرا که سیستم ایمنی را بهتر تحریک می‌کند. دانستن مکانیسم‌های آپوپتوز و سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی برای طراحی واکسن‌های موثر برای بیماری‌های عفونی و سرطان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۶۰). اخیرا مشاهده شده است که سلول‌های آپوپتوز شده و نه نکروز شده، می‌توانند کاندید مناسبی برای واکسن در شرایط درون‌تنی

واکسن علیه عفونت‌های انگلی به خصوص انواع زئونوز آنها فراهم آورد.

باشند (۶۱). بنابراین با توجه به مطالعه حاضر، در آینده می‌توان با تکیه بر این اصول زمینه‌ای را برای ساخت

References

- Douglas R. Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms. New York: Cold Spring Harbor; 2011.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-257.
- Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *J Qazvin Univ Med Sci* 2013; 17(3): 48-57.
- Dustar Y, Hashemi M, Malayeri H, Jahani ZG, Gharamaleki MN, Shaveisi-Zadeh F, et al. Studying Variation in Cell Apoptosis Caused by Corticosteroids in Thymus of the Rat. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology* 2017; 1(4).
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456-1462.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157(5): 1415-1430.
- Krysko DV, Berghe TV, D'Herde K, Vandenebee P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008; 44(3): 205-221.
- Cliffe LJ, Potten CS, Booth CE, Grecis RK. An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1556-1564.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60(1): 619-642.
- Karami-Tehrani F. Caspase dependent apoptosis induced by cladribine in the estrogen receptor negative breast cancer cell line, MDA-MB468. *J. Sci I R Iran* 2003; 14(4): 303-310.
- Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S. Cytotoxicity effect of Cladribine on the MCF-7 human breast cancer cell line. *IBJ* 2004; 8(1): 7-12.
- Bienvenu AL, Gonzalez-Rey E, Picot S. Apoptosis induced by parasitic diseases. *Parasit Vectors* 2010; 3: 106.
- Wong WWL, Puthalakath H. Bcl 2 family proteins: The sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 2008; 60(6): 390-397.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35(4): 495-516.
- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 27-33.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11(12): 526-534.
- Kolomecki K, Maciaszczyk P, Stepień H, Stepień T, Kuzdak K, Ulanska J. P53 concentration and soluble FasL (sFasL) serum level as indicators of apoptosis in patients with benign and malignant thyroid tumors. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(10): 297-300.

18. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 2002; 265(1-2): 97-110.
19. Opferman J. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 2008; 15(2): 234-242.
20. Verbrugge I, De Vries E, Tait S, Wissink E, Walczak H, Verheij M, et al. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 2008; 27(5): 574-584.
21. Heussler VT, Küenzi P, Rottenberg S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* 2001; 31(11): 1166-1176.
22. Barcinski M, DosReis G. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(4): 395-401.
23. Mirzaei F, Bafghi AF, Mohaghegh MA, Jaliani HZ, Faridnia R, Kalani H. In vitro anti-leishmanial activity of *Satureja hortensis* and *Artemisia dracunculoides* extracts on *Leishmania major* promastigotes. *J Parasit Dis* 2016; 40(4): 1571-1574.
24. Parvizi P, Baghban N, Novin EA, Absavaran A. Detection, identification and molecular typing of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* from a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central of Iran. *Exp Parasitol* 2010; 124(2): 232-237.
25. Faridnia R, Kalani H, Fakhar M, Akhtari J. Investigating in vitro anti-leishmanial effects of silibinin and silymarin on *Leishmania major*. *Ann Parasitol* 2018; 64(1): 29-35.
26. El-Hani CN, Borges VM, Wanderley JL, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 96.
27. Gannavaram S, Debrabant A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 95.
28. Jimenez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Luder CG, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 2010; 3: 104.
29. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummel-Smith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(1): 88-101.
30. Basmaciyan L, Azas N, Casanova M. Different apoptosis pathways in *Leishmania* parasites. *Cell Death Discovery* 2018; 4(90): 27.
31. Zarean M, Maraghi S, Hajjaran H, Mohebbi M, Feiz-Hadad MH, Assarehzadegan MA. Comparison of Proteome Profiling of Two Sensitive and Resistant Field Iranian Isolates of *Leishmania major* to Glucantime(R) by 2-Dimensional Electrophoresis. *Iran J Parasitol* 2015; 10(1): 19-29.
32. Kumar D, Singh R, Bhandari V, Kulshrestha A, Negi NS, Salotra P. Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitol Res* 2012; 111(1): 223-230.
33. Jaffary F, Nilforoushzaheh MA. Review of the prevalence and causes of antimony compounds resistance in different societies

- review article. *Tehran University Medical Journal* 2017; 75(6): 399-407.
34. Eidsmo L, Nylen S, Khamesipour A, Hedblad MA, Chiodi F, Akuffo H. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous Leishmaniasis. *Am J Pathol* 2005; 166(4): 1099-1108.
35. Ruhland A, Leal N, Kima PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol* 2007; 9(1): 84-96.
36. Pestechian N, Khanahmad Shahreza H, Faridnia R, Kalani H. Manipulation of IL-10 gene expression by *Toxoplasma gondii* and its products. *Med J Islam Repub Iran* 2016; 30: 410 (Persian).
37. Besteiro S. *Toxoplasma* control of host apoptosis: the art of not biting too hard the hand that feeds you. *Microb Cell* 2015; 2(6): 178-181.
38. Wei S, Marches F, Borvak J, Zou W, Channon J, White M, et al. *Toxoplasma gondii*-infected human myeloid dendritic cells induce T-lymphocyte dysfunction and contact-dependent apoptosis. *Infect Immun*. 2002; 70(4): 1750-1760.
39. Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, et al. Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis* 2007; 195(12): 1852-1859.
40. James E. Apoptosis: key to the attenuated malaria vaccine? *J Infect Dis*. 2005; 191(10): 1573-1575.
41. Klotz C, Frevert U. *Plasmodium yoelii* sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. *Int J Parasitol* 2008; 38(14): 1639-1650.
42. Decote-Ricardo D, Nunes MP, Morrot A, Freire-de-Lima CG. Implication of Apoptosis for the Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Front Immunol* 2017; 8: 518.
43. Denninger V, Figarella K, Kubata B, Duszenko M. Differentiation and apoptosis in the sleeping sickness inducing parasite *Trypanosoma brucei*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. J Appl Microbiol* 2007: 820-829.
44. Faridnia R, Khanahmad KA, Carmen J, Sinai AP, Burleigh BA. *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infect Immun* 2006; 74(3): 1580-1587.
45. Faridnia R TS, Khanahmad-Shahreza H, Kalani H, Yousefi-Darani H. Evaluating the gene expression level of IL-12 in the fibrous layer of hepatic hydatid cysts isolated from slaughtered animals. *Comp Clin Pathol* 2015; 24(5): 1193-1196.
46. Paredes R, Jimenez V, Cabrera G, Iraguen D, Galanti N. Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J Cell Biochem* 2007; 100(5): 1200-1209.
47. Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology* 2006; 118(2): 271-278.
48. Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med* 2004; 95(2): 159-164.
49. Cabrera G, Cabrejos ME, Morassutti AL, Cabezon C, Orellana J, Hellman U, et al. DNA damage, RAD9 and fertility/infertility of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J Cell Physiol* 2008; 216(2): 498-506.

50. Mokhtari Amirmajdi M, Sankian M, Eftekharzadeh Mashhadi I, Varasteh A, Vahedi F, Sadrizadeh A, et al. Apoptosis of human lymphocytes after exposure to hydatid fluid. *Iran J Parasitol* 2011; 6(2): 9-16 (Persian).
51. Hu H, Kang J, Chen R, Mamuti W, Wu G, Yuan W. Drug-induced apoptosis of *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitol Res* 2011; 109(2): 453-459.
52. Spotin A, Sankian M, Varasteh A, Shamsian AA, Vahedi F. Expression of Apoptosis Inducing-Ligands, TRAIL and Fas-L in Hydatid Cyst Germinal Layer and Normal Tissue. *J Ardabil Univ Med Sci* 2012; 12(1): 7-15 (Persian).
53. Arefkhan N, Mosavi F, Taghipor S, Daneshpor S, Yousofidarani H. Effects of hydatid cyst antigen on Hella cells in vitro. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013; 15(5): 65-71 (Persian).
54. Nono JK, Pletinckx K, Lutz MB, Brehm K. Excretory/secretory-products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(2): e1516.
55. Rutitzky LI, Mirkin GA, Stadecker MJ. Apoptosis by neglect of CD4⁺ Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 2003; 171(4): 1859-1867.
56. Chen L, Rao KV, He YX, Ramaswamy K. Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells. *J Biol Chem* 2002; 277(37): 34329-34335.
57. Javad Akhtari MS, Hajar Ziaei, Mahdi Fakhar. Last Decade Developments on Leishmania Vaccines with Emphasis on Nanovaccines. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 26(146): 232-253 (Persian).
58. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther* 2018; 12: 25-40.
59. Taheri T RS. Leishmaniasis: recombinant DNA vaccination and different approaches for vaccine development. *Clin Inves* 2013; 3(11): 1023-1044.
60. Restifo NP. Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(5): 597-603.
61. Bartholomae WC, Rininsland FH, Eisenberg JC, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. T cell immunity induced by live, necrotic, and apoptotic tumor cells. *J Immunol* 2004; 173(2): 1012-1022.