



یک مطالعه مقایسه‌ای در مورد تاثیر ائوزین B بر مراحل خونی غیرجنسی و گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط برون‌تنی

علیرضا صادقی تفرشی^۱، زهرا زمانی^۲، مرجان صباغیان^{۳*}، رضاعلی خاوری نژاد^۱، محمد ارجمند^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳. گروه آندروولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: بیماری مالاریا به‌عنوان یکی از تهدیدکننده‌ترین بیماری‌های عفونی در سطح جهان مطرح است. انتقال انگل از انسان به پشه ناقل توسط گامتوسیت انگل پلاسمودیوم انجام می‌شود در حالی که این سلول‌ها در ایجاد علائم بیماری هیچ نقشی ندارند. در حال حاضر در راستای تلاش برای ریشه‌کنی بیماری در سطح جهانی، کنترل مرحله انتقال انگل از طریق داروهای ضد گامتوسیت به شدت مورد تأکید می‌باشد. در این تحقیق اثر ضد انگلی رنگ ائوزین B در شرایط برون‌تنی بر روی مراحل خونی و گامتوسیت پلاسمودیوم مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش کار: ابتدا انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم سویه 3D7 کشت داده شده و سپس با القای گامتوسیتوئنز، سلول‌های گامتوسیت تهیه شدند. پس از بررسی مراحل نمو انگل طی دوره کشت انگل با بررسی میکروسکوپی، ائوزین B روی انگل‌های خونی و گامتوسیت تست شده و میزان‌زنده‌مانی با استفاده از تست آنزیم لاکتات دهیدروژناز بررسی شد. نتایج برای گروه جنسی و غیرجنسی مقایسه گردید.

یافته‌ها: گامتوسیت‌ها پس از ۱۲ روز به بلوغ کامل (مرحله V) رسیدند. انگل‌های غیرجنسی در طول دوره کشت تا روز چهارم افزایش و سپس شروع به کاهش نمودند. نتایج تست آنزیم لاکتات دهیدروژناز حاکی از تاثیر قوی‌تر ائوزین B روی گامتوسیت (IC₅₀=23 nM) نسبت به مرحله غیرجنسی (IC₅₀=133 nM) بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به تعداد معدود داروهای ضد گامتوسیت و اهمیت این ترکیبات در کنترل بیماری مالاریا ائوزین B کاندیدای مناسبی برای درمان‌های ترکیبی علیه گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم است.

کلید واژه‌ها: مالاریا، پلاسمودیوم فالسیپاروم، گامتوسیت، ائوزین B، لاکتات دهیدروژناز

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران؛ دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۱

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۷

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰

موضوع: انگل شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

مرجان صباغیان، گروه آندروولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

ایمیل:

marjan.sabbaghian@gmail.com

مقدمه

مرگی در اثر ابتلا به بیماری مالاریا در سال ۲۰۱۷ در ایران ثبت نشده است (۲).

در چرخه زندگی پیچیده انگل پلاسمودیوم، انگل‌های مرحله خونی غیرجنسی مسئول ایجاد نشانه‌ها و علائم بالینی بیماری هستند و لذا عمده داروهای ضد مالاریا این بخش از زندگی انگل را هدفگیری نموده و در راستای بهبود علائم بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. گامتوسیت‌ها که مربوط به بخش جنسی چرخه زندگی انگل هستند هیچ نقشی در ایجاد علائم بیماری ندارند ولی در انتقال انگل از میزبان انسانی به ناقل پشه آنوفل ایفای نقش می‌نمایند (۳).

مالاریا یک بیماری قابل پیشگیری و قابل درمان و در عین حال تهدید کننده حیات انسان است که از طریق انگل‌های مربوط به این بیماری که توسط نیش پشه به انسان منتقل می‌گردند، ایجاد می‌شود. مطابق گزارش سالانه سازمان بهداشت جهانی (WHO) در مورد مالاریا، در سال ۲۰۱۸ حدود ۲۲۸ میلیون مورد ابتلا به مالاریا وجود داشته و ۴۰۵ هزار مورد مرگ به دلیل این بیماری در سطح جهانی رخ داده است (۱). طبق گزارش رسمی سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۷، ۵۷ مورد ابتلا به مالاریای بومی در ایران ثبت شده است که نسبت به ۱۸۰۰ مورد سال ۲۰۱۰ و ۱۲۰۰۰ مورد سال ۲۰۰۰، کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد. علاوه بر این، هیچ

گامتوسیت-اووکینت/اسپوروزوئیت در حال انجام است (۳). از جمله تست‌های سنجش جدید که برای مرحله گامتوسیتی انگل نیز مورد استفاده قرار گرفته تست سنجش زنده‌مانی انگل با استفاده از آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) است (۹). لاکتات دهیدروژناز، آنزیم انتهایی مسیر بی‌هوازی گلیکولیز امبدن- میرهوف بوده و نقش مهمی را در متابولیسم کربوهیدرات انگل‌های مالاریای انسانی بازی می‌کند. مشخص شده است که LDH نقش مهمی را در آلودگی مالاریا باشد (۱۰). علاوه بر آن که لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیوم فالسیپاروم (PfLDH) مارکری برای قابلیت زیستی انگل است، یک بیومارکر جالب توجه تشخیصی نیز است، زیرا این آنزیم در بین هر چهار گونه انسانی که آلوده کننده انسان شناخته شده‌اند حفاظت شده است (۱۱). همچنین فعالیت PfLDH در گردش خون میزبان ظرف ۲۴ ساعت پس از درمان موفقیت آمیز پاکسازی می‌شود و در نتیجه تشخیص مثبت کاذب بسیار کمتری به واسطه ادامه حضور بیومارکر پس از حذف آلودگی صورت می‌گیرد (۱۲).

برای نائل شدن به حذف مالاریا، داروهای ضد مالاریا یا درمان‌های دارویی ترکیبی نباید تنها به حذف مراحل غیرجنسی انگل که مسئول بیماری کلینیکی هستند بسنده کنند، بلکه همچنین باید قادر به پاکسازی مراحل جنسی انگلی که مرحله انتقال را حفظ می‌کند نیز باشند. لذا نتایج چنین مطالعاتی می‌توانند در جهت تهیه داروهای مسدود کننده مرحله انتقال راهگشا باشند.

ائوزین B یک رنگ آزمایشگاهی است که پیشتر از طریق روش‌های داکینگ مولکولی قابلیت ضدانگلی آن مطرح گردیده و اثر ضد مالاریایی آن در مدل برون‌تنی و مدل مالاریای جوندگان مطالعه شده است (۱۶-۱۳). در تحقیق حاضر پس از کشت گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم و بررسی دقیق مراحل خونی و جنسی انگل طی دوره کشت، ترکیب ائوزین B به‌عنوان یک ترکیب ضدگامتوسیت جدید مورد بررسی قرار گرفته و نتایج تیمار مراحل غیرجنسی و جنسی انگل توسط این ترکیب با استفاده از تست لاکتات دهیدروژناز مقایسه گردیده است.

روش پژوهش

کشت برون‌تنی انگل‌های مرحله غیرجنسی پلاسمودیوم فالسیپاروم

کشت پلاسمودیوم فالسیپاروم سویه 3D7 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در اریتروسیت‌های انسانی گروه خونی O⁺ با هماتوکریت ۵

داروهایی که می‌توانند گامتوسیتوژنز را کاهش دهند یا می‌توانند باعث کشته شدن گامتوسیت‌ها گردند و گامتوسیتوسید نامیده می‌شوند، از نظر کارایی علیه گسترش مالاریا، بسیار مطلوب اند ولی هنوز تحت مطالعه قرار دارند که علت این امر فقدان سنجش‌های با بازدهی بالای کمی (مقداری) است. این داروهای بلوکه‌کننده مرحله انتقال می‌توانند با هدف‌گیری موارد زیر عمل کنند: ۱- کشتن مؤثر و کامل گامتوسیت‌های بالغ وقتی که در میزبان انسانی تشکیل می‌شوند. ۲- مهار نمو گامتوسیت‌ها به اووکینت و نهایتاً اسپوروزوئیت‌ها در پشه. این عمل مستلزم آن است که داروی کافی از نمونه خونی به بخش گوارشی پشه برسد (۴).

تولید گامتوسیت از طریق طی کردن ۵ مرحله بلوغ (I تا V) انجام می‌شود و مرحله V تنها شکلی است که می‌تواند باعث آلوده کردن پشه‌ها گردد. برای پلاسمودیوم فالسیپاروم این گامتوسیت‌های بالغ بعد از ۱۲ روز پس از علائم بیماری حضور پیدا می‌کنند و برای به‌طور متوسط ۲/۵ تا ۶/۵ روز در گردش هستند و تا ۲۲ روز پدیدارند. بنابراین گامتوسیت‌های در گردش می‌توانند فرایند انتقال مالاریا از میزبان به ناقل را بعد از تیمار دارویی - که موجب حذف علائم بیماری می‌گردد - حفظ نمایند (۵).

بیشتر داروهای ضد مالاریای مورد تأیید فعلی شامل درمان‌های ترکیبی بر پایه آرتیمیزینین (ACT) فقط علیه مراحل خونی و گامتوسیت‌های جوان تا مرحله III و احتمالاً مرحله IV بلوغ گامتوسیت مؤثر هستند. ضمناً بعضی تیمارهای دارویی مانند کلروکوئین و سولفادوکسین- پیریمتامین سبب القای گامتوسیتوژنز گردیده و بنابراین به‌طور مؤثری در افزایش تعداد انتقال‌ها و بالا بردن میزان آلودگی‌های جدید نقش دارند (۶).

در حال حاضر تنها داروی ضد مالاریایی که به‌طور مؤثر فعالیت گامتوسیتوسیدی دارد پریماکوئین است که علیه گامتوسیت‌های همه گونه‌های مالاریایی عمل می‌کند و گزینه توصیه شده WHO علیه گامتوسیت‌های پلاسمودیوم فالسیپاروم است. متأسفانه امکان استفاده از این دارو نیز - به دلیل احتمال ایجاد آنمی همولیتیک حاد به دلیل نقص آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) - محدود است (۷، ۸). به واسطه خطرات همراه با پریماکوئین، داروهای بلوکه‌کننده مرحله انتقال جدید به منظور رسیدن به هدف نهایی ریشه‌کنی مالاریا در حال حاضر به شدت مورد توجه هستند. اخیراً مطالعات گسترده‌ای در زمینه ویژگی‌های بیولوژی مراحل انتقال و در تولید سنجش‌های *in vitro* متمرکز روی مراحل انتهایی تولید گامتوسیت، کشنده بودن گامتوسیت‌های بالغ و انتقال

سپس گسترش خونی نازک از آن تهیه شده و با گیمسا رنگ آمیزی گردیده، سپس برای کنترل کیفی exflagellation از میکروسکوپ نوری استفاده شد (۲۱).

تست آنوزین B بر روی مرحله حلقه پلاسمودیوم فالسیپاروم

در پلیت ۹۶ تایی به تمام ردیف‌ها به جز یک ردیف که مربوط به گروه کنترل است، ۲۰ میکرولیتر از کشت حاوی انگل‌های غیرجنسی اضافه شده ورق‌های مختلف از دارو به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. همه نمونه‌ها به صورت سه تایی تکرار شدند و به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور CO₂ گذاشته می‌شوند.

تست آنوزین B بر روی گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم

در پلیت ۹۶ تایی به تمام ردیف‌ها به جز یک ردیف که مربوط به گروه کنترل است، ۲۰ میکرولیتر از کشت حاوی گامتوسیت اضافه شده ورق‌های مختلف از دارو به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. همه نمونه‌ها به صورت سه تایی تکرار شدند و به مدت ۴۲ ساعت در داخل انکوباتور CO₂ گذاشته می‌شوند.

ارزیابی پارازیتمی و گامتوسیتمی از طریق سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیوم فالسیپاروم (PfLDH)

ارزیابی پارازیتمی از طریق سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز یک روش غربالگری با توان عملیاتی بالا (High-Throughput Screening Assay) برای بررسی عوامل ضد مالاریا است. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر شناساگر Malstat (۱/۵۷) گرم Tris HCl، ۲ گرم L-لاکتیک اسید، ۲۰۰ میکرولیتر Triton X-100 در ۸۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر شده، ۶۶ میلی گرم ۳-استیل پیریدین آدنین دی‌نوکلوئید (APAD)، pH (۹/۱) به میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر گلبول قرمز خون آلوده یا غیر آلوده به آن اضافه شد. پلیت در دمای اتاق انکوبه شده و به مدت چند دقیقه به ملایمت تکان داده شد تا گلبول‌های قرمز خونی حل شوند. در طول انکوباسیون، حجم‌های مساوی از Nitro Blue Tetrazolium (NBT) و Phenazine Ethosulphate (PES) در دور از نور مخلوط شده و ۲۰ میکرولیتر از مخلوط به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به دور از نور قرار داده شد. بعد از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه تغییر رنگ کنترل شد تا رنگ به ارغوانی تیره متمایل شد. پلیت با استفاده از دستگاه Microplate Reader مدل BioTek PowerWave XS در طول موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. گلبول‌های قرمز غیر آلوده به عنوان رفرانس به کار برده شد. درصد زنده‌مانی از فرمول زیر محاسبه شد (۹، ۲۲، ۲۳):

درصد انجام شد. محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت کامل شامل RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) به علاوه HEPES ۲۵ میلی مولار (Sigma-Aldrich)، D-گلوکز (Sigma-Aldrich) ۰/۲ درصد، هیپوگزانتین ۲۰۰ میکرومولار (Sigma-Aldrich)، سدیم هیدروژن کربنات ۰/۲ درصد (Sigma-Aldrich)، جنتامایسین (Invitrogen) ۴۰ mg.L⁻¹ همراه با آلبومکس II ۰/۵ درصد (Invitrogen) و سرم انسانی ۱۰ درصد بود. انگل در اتمسفری شامل ۹۰ درصد N₂، ۵ درصد O₂ و ۵ درصد CO₂ کشت داده شد (۱۷ و ۱۸).

محیط کشت به طور روزانه گازدهی شده و با محیط جدید (گرم شده تا دمای ۳۷ درجه سلسیوس) تعویض شد. تکثیر انگل از طریق بررسی روزانه میکروسکوپی گسترش‌های نازک خونی رنگ شده با گیمسا مورد بررسی قرار گرفت. برای همگام‌سازی کشت غیرجنسی از D-سوربیتول ۵ درصد برای تهیه انگل در مرحله تروفوزوئیت اولیه (حلقه) استفاده شد (۱۹).

القای گامتوسیتوزن و کشت گامتوسیت

انگل‌های غیرجنسی کشت داده شدند تا درصد پارازیتمی به ۶ تا ۱۰ درصد برسد. سپس درصد پارازیتمی به ۰/۵ درصد کاهش داده شد (در هماتوکریت ۶ درصد). کشت‌ها در اتمسفری شامل ۹۰ درصد N₂، ۵ درصد O₂ و ۵ درصد CO₂ بدون تکان دادن نگهداری شدند. همچنین کشت‌ها طی تعویض محیط روزانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حفظ شدند. بعد از ۷۲ ساعت هماتوکریت به ۳ درصد کاهش داده شد (روز صفر). متعاقباً گامتوسیتوزن با بررسی روزانه میکروسکوپی محیط کشت در هنگام تعویض محیط پایش گردید. در روزهای ۶ تا ۹ اشکال غیرجنسی از طریق تیمار با هپارین (Sigma-Aldrich) ۱۰۰ μg.mL⁻¹ حذف گردیدند. گامتوسیت‌ها به طور روزانه از طریق بررسی گسترش‌های خونی نازک رنگ شده با گیمسا مورد مشاهده قرار گرفتند تا به مرحله ۷ رسیدند و برای انجام تست‌های بعدی آماده شدند (۲۰).

کنترل کیفی تولید گامتوسیت‌های بالغ زنده با عملکرد

فعال در مرحله V و Exflagellation گامت نر

پس از تولید گامتوسیت‌های مرحله V، در طول تعویض روزانه محیط کشت، سلول‌های خونی ته‌نشین شده را مجدداً به حالت تعلیق درآورده و ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشت شده و به سرعت به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری که پیشتر تا دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم شده بود منتقل شد. پس از تیمار نمونه با زانتونیک اسید ۵۰ میکرومولار در بافر exflagellation (RPMI ۱۶۴۰ با HEPES ۲۵ میلی مولار، ۰/۲ درصد سدیم بی‌کربنات، ۸ pH)، محیط کشت در میکروسانتریفیوژ در ۲۰۰۰ g برای ۳۰ s در دمای اتاق قرار داده شد.

GraphPad Prism Version با استفاده از نرم افزار $P\text{-value} < 0.05$ و 7.05 آنالیز گردید.

زنده بودن $(\mu c^+ - \mu c^-) / (\mu c^+ + \mu c^-) \times 100 =$ درصد

یافته‌ها

میانگین ODهای گامتوسیت‌های کنترل $(c^+) = \mu c^+$

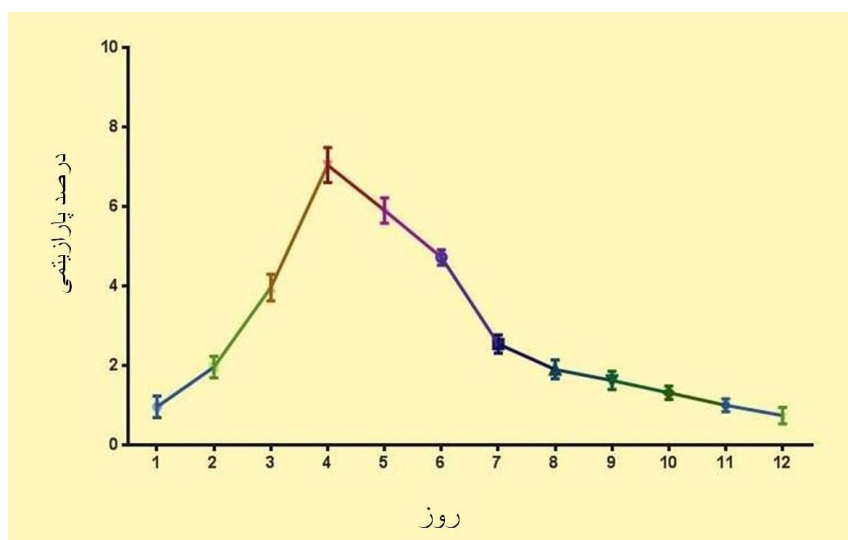
میانگین ODهای اریتروسیت‌های غیرآلوده $(c^-) = \mu c^-$

کشت انگل غیرجنسی

بعد از تنظیم شرایط کشت و استفاده از پروتکل مناسب انگل‌های غیرجنسی کشت داده شدند شکل ۱ تعداد انگل‌ها را در دوره کشت نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه آزمون‌ها ۳ بار تکرار شدند و نتایج توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) در سطح معنی‌داری

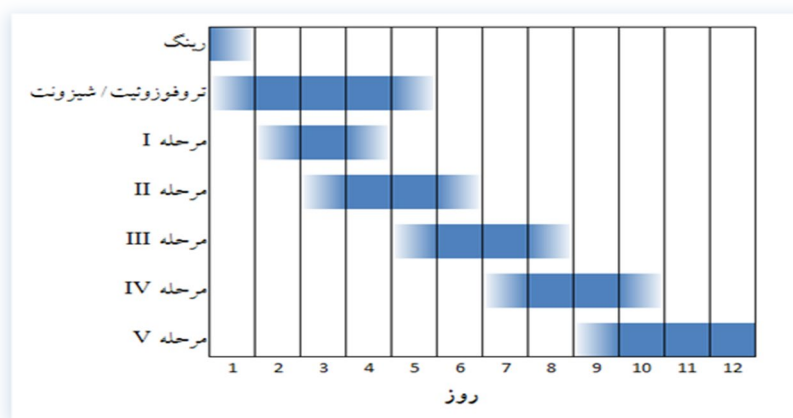


شکل ۱. درصد پارازیتی در طول دوره کشت گامتوسیت.

کشت گامتوسیت

شکل ۲ نشان می‌دهد که در روزهای مختلف دوره کشت کدام مراحل انگل در محیط کشت یافت می‌شوند.

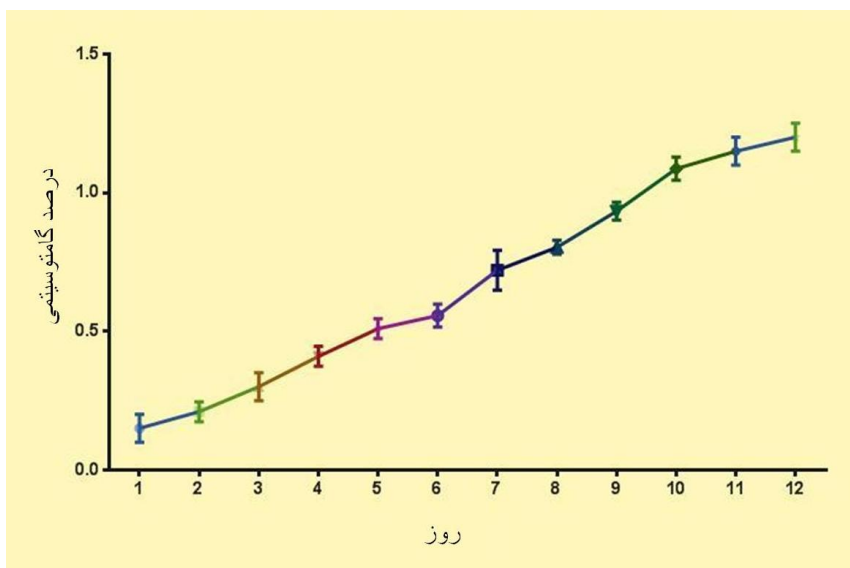
چنان که در شکل مشاهده می‌شود تعداد انگل‌ها از آغاز دوره کشت به تدریج افزایش یافته و در روز ۴ به حداکثر مقدار خود می‌رسد. سپس به تدریج تعداد آن‌ها رو به کاهش می‌گذارد و درصد پارازیتی انگل‌های خونی غیرجنسی کاهش می‌یابد.



شکل ۲. مراحل مختلف انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم 3D7 در طول دوره کشت گامتوسیت.

و (V) به ترتیب در روزهای دوم تا هشتم و هفتم تا دوازدهم در محیط مشاهده شدند.

شکل نشان می‌دهد مراحل غیرجنسی در حدود روزهای اول تا پنجم و گامتوسیت‌های مراحل ابتدایی (I, II و III) و نهایی (IV)

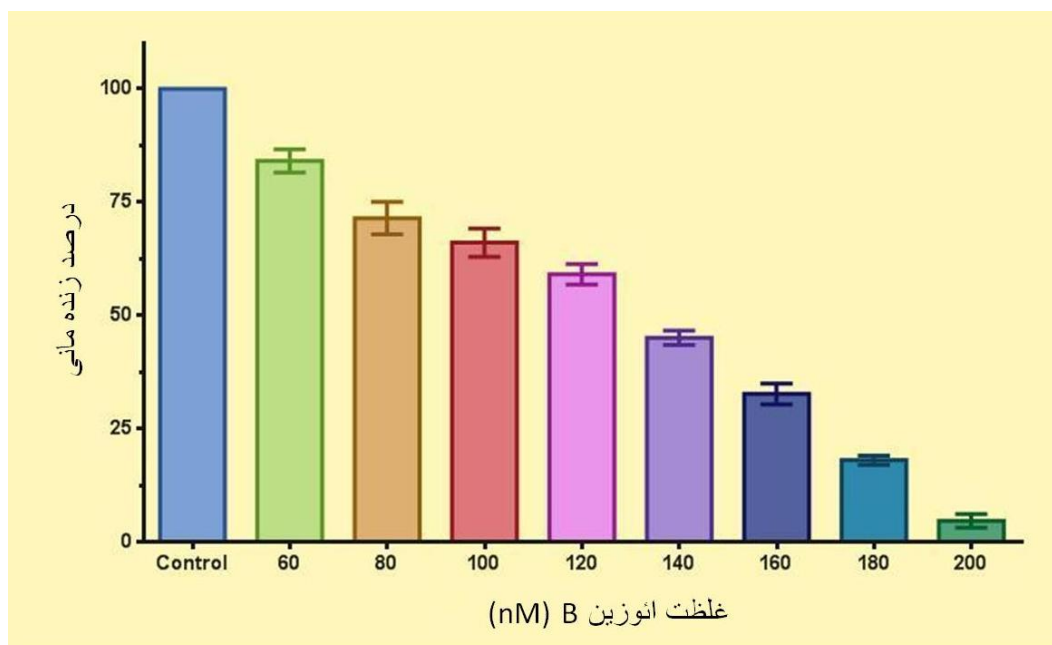


شکل ۳. درصد گامتوسیتیمی در طول کشت دوره‌ای گامتوسیت.

با بلوغ گامتوسیت (مرحله V) به حداکثر مقدار خود می‌رسد. در این وضعیت گامتوسیت‌ها توان آلوده کردن ناقل را دارند و آماده برای انجام تست ترکیب ضد گامتوسیت هستند.

تغییرات تعداد گامتوسیت‌ها در طول دوره کشت

مطابق آنچه در شکل ۳ مشاهده می‌شود تعداد گامتوسیت‌ها به تدریج در طول دوره کشت افزایش می‌یابد و در روز ۱۲ همزمان

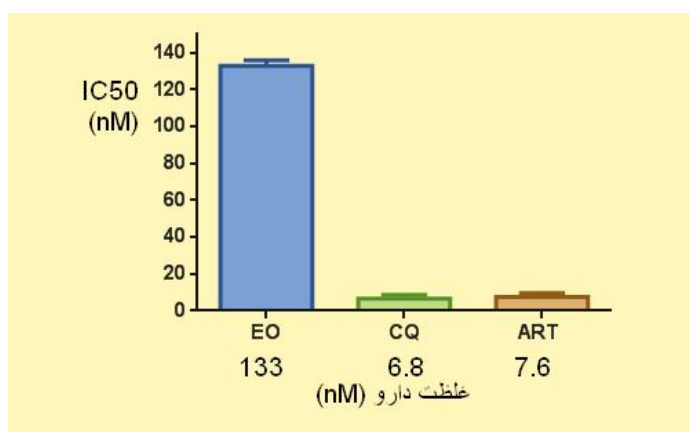


شکل ۴. تاثیر اتوزین B بر رینگ انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم 3D7. درصد زنده ماننی در مقایسه با گروه کنترل برای هر گروه تست نشان داده شده است.

(Means ± SEM (n=5 & P< 0.05), One Way-ANOVA test with Graph Pad prism version 7.05)

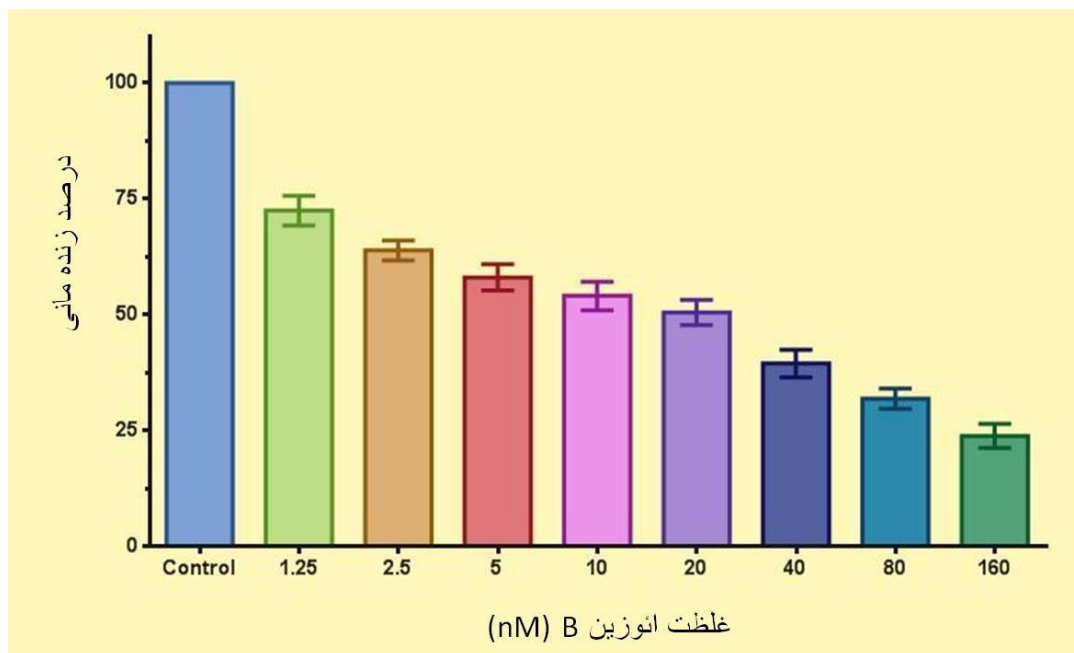
در شکل ۵ تاثیر ائوزین B و داروهای کنترل کلروکین و آرتمیزینین بر رینگ انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم 3D7 مقایسه شده است. مقدار IC_{50} ائوزین B نسبت به داروهای کنترل استاندارد بالاتر و برابر 133 nM است. در شرایط آزمایش مقادیر IC_{50} برای کلروکوئین (CQ) و آرتمیزینین (ART) به ترتیب برابر 6.8 nM و 7.6 به دست آمد.

تأثیر ائوزین B بر مراحل غیرجنسی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم
 شکل ۴ تأثیر ائوزین B بر مراحل غیرجنسی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم را نشان می‌دهد. درصد زنده‌مانی در مقایسه با گروه کنترل، برای هر گروه تست با افزایش غلظت ائوزین B کاهش می‌یابد. مقدار IC_{50} ائوزین B برای مراحل غیرجنسی انگل 133 nM است.



شکل ۵. مقایسه تاثیر ائوزین B و داروهای کنترل کلروکین و آرتمیزینین بر رینگ انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم 3D7. مقادیر IC_{50} برای ائوزین B (EO)، کلروکوئین (CQ) و آرتمیزینین (ART) در زیر هر گروه نشان داده شده است.

(Means \pm SEM (n=5 & $P < 0.05$), One Way-ANOVA test with Graph Pad prism version 7.05)



شکل ۶. تاثیر ائوزین B بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم 3D7.

(Means \pm SEM (n=5 & $P < 0.05$), One Way-ANOVA test with Graph Pad prism version 7.05)

گامتوسیت‌ها هستند نیز مورد هدف داروهای کنترل کننده مرحله انتقال انگل قرار گیرند (۲۴). در تحقیق حاضر با استفاده از هپارین توسط یک پروتکل بهبود یافته، القای گامتوسیتوز و تولید سلول‌های مرحله جنسی انگل به منظور تست ترکیب جدید در تیمار پلاسمودیوم فالسیپاروم سویه 3D7 انجام شده است. همچنین باید توجه داشت کنترل گامتوسیت‌های کشت شده باید به طور دقیق انجام شود تا حداقل ۹۰ درصد گامتوسیت‌ها به منظور تست ترکیب دارویی به مرحله رشد کامل IV-V رسیده باشند (۲۵). همچنین مقایسه مستقیم داده‌های مطالعات کشف دارو علیه گامتوسیت‌ها به دلیل عوامل متعددی دشوار است که از جمله این عوامل می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد: ۱- سویه انگل مورد استفاده ۲- پروتکل مورد استفاده برای القای گامتوسیتوز ۳- ترکیب محیط کشت به کار رفته ۴- پروتکل‌های جداسازی گامتوسیت ۵- مرحله نمو گامتوسیت‌ها در مطالعه ۶- اصول سنجش‌های مورد استفاده در آزمایش ۷- حضور یا غیاب اریتروسیت‌ها ۸- تعداد گامتوسیت‌ها در هر چاهک تست ۹- پنل ترکیب یا داروهای مورد استفاده ۱۰- غلظت ترکیبات تست شده ۱۱- مدت زمان اعمال دارو ۱۲- نحوه بیان داده‌های به دست آمده مانند درصد مهار در یک غلظت خاص یا مقادیر IC₅₀ به تنهایی و غیره (۱۴).

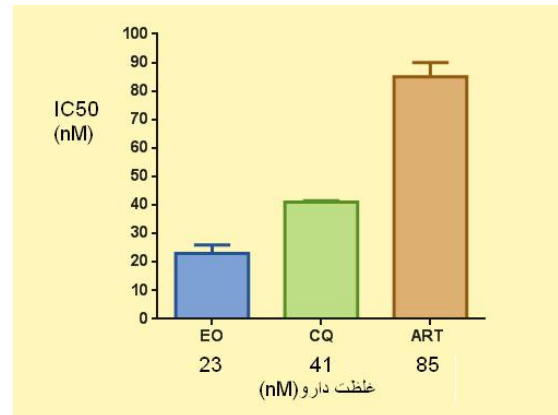
اثوزین B بر روی انگل *Toxoplasma gondii* و مرحله خونی پلاسمودیوم فالسیپاروم اثر مهارکنندگی قابل توجهی نشان داده است. مقادیر IC₅₀ مربوط به اثوزین B در تیمار *Toxoplasma gondii* و مراحل غیرجنسی خونی پلاسمودیوم فالسیپاروم به ترتیب ۱۸۰ μM و ۱۲۴ nM است (۱۳، ۱۴). نظر به این که IC₅₀ اثوزین B برای گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم ۲۳ nM است، اثوزین B می‌تواند گامتوسیت را نسبت به انگل‌های خونی غیرجنسی با شدت بیشتری مهار کند. با توجه به این که بسیاری از داروهای ضد مالاریا توانایی چندانی در حذف مرحله جنسی انگل ندارند و حتی بعضی (مانند کلروکوئین) سبب القای گامتوسیت‌زایی و افزایش تعداد گامتوسیت‌ها می‌شوند (۲۶)، تاثیر چشمگیر اثوزین B بر گامتوسیت و اثر ضدگامتوسیتی آن در شرایط *in vitro* می‌تواند برای تهیه داروهای بلوکه‌کننده انتقال از انسان به پشه مورد توجه قرار گیرد.

ترکیب متیلن بلو نیز که یک رنگ مورد استفاده در آزمایشگاه می‌باشد در برابر تمامی مراحل در پلاسمودیوم فالسیپاروم اثر مهارکنندگی داشته (۴) و به عنوان یک ترکیب قوی مهارکننده مرحله انتقال از میزبان به ناقل مطرح شده است (۲۷). همچنین

تأثیر اثوزین B بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم

فالسیپاروم

شکل ۶ تأثیر اثوزین B بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم را نشان می‌دهد. درصد زنده‌مانی در مقایسه با گروه کنترل، برای هر گروه تست با افزایش غلظت اثوزین B کاهش می‌یابد. مقدار IC₅₀ اثوزین B برای گامتوسیت انگل 23 nM است.



شکل ۷. مقایسه تأثیر اثوزین B و داروهای کنترل کلروکوئین و

آرتمیزینین بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم 3D7. مقادیر IC₅₀ برای اثوزین B (EO)، کلروکوئین (CQ) و آرتمیزینین (ART) در زیر هر گروه نشان داده شده است.

(Means ± SEM (n=5 & P< 0.05), One Way-ANOVA test with Graph Pad prism version 7.05)

در شکل ۷ تأثیر اثوزین B و داروهای کنترل کلروکوئین و آرتمیزینین بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم 3D7 مقایسه شده است. مقدار IC₅₀ اثوزین B نسبت به داروهای کنترل استاندارد پایین‌تر و برابر 23 nM است. در شرایط آزمایش مقادیر IC₅₀ برای کلروکوئین (CQ) و آرتمیزینین (ART) به ترتیب برابر ۴۱ و ۸۵ نانومتر به دست آمد. بر خلاف نتایج حاصل از تست ترکیب اثوزین B بر مراحل خونی انگل مشاهده شد که اثوزین B با دوز پایین‌تری نسبت به داروهای استاندارد کنترل رشد گامتوسیت را مهار نموده که بیانگر تأثیر مهاری قابل توجه اثوزین B بر گامتوسیت است.

بحث

کنترل پایدار بیماری مالاریا در صورتی محقق می‌گردد که علاوه بر استفاده از استراتژی‌های درمانی هدف گیرنده اشکال غیرجنسی مولد علائم بیماری مالاریا، اشکال جنسی انگل که همان

جنسی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم نزدیک و یا بالاتر از بعضی داروهای مهم شناخته شده ضد مالاریا است. لذا با توجه به امکان استفاده ائوزین B به صورت داروی خوراکی و اثر قوی ضد گامتوسیتی آن در مقایسه با بعضی داروهای مرسوم، این ترکیب می تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای استفاده به صورت داروی مسدود کننده انتقال از میزبان به ناقل مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به تاثیر معنی دار ائوزین B بر تعداد گامتوسیت ها و همچنین مقایسه تاثیر آن بر مرحله خونی پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط *in vitro* این ترکیب احتمالا قادر به کنترل مؤثر انتقال از میزبان انسانی به پشه خواهد بود که لازم است ابتدا این امر از طریق آلوده کردن پشه های آنوفل ناقل مورد آزمون قرار بگیرد که این امر می تواند در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گرفته و با استفاده از آزمون استاندارد Membrane-Feeding Assay که آزمون استاندارد طلایی برای بررسی مسدود کردن انتقال است (۳۰) مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به کمبود عوامل دارویی شناخته شده مسدود کننده انتقال از انسان به ناقل، شناسایی ترکیب ائوزین B به عنوان عامل آنتی گامتوسیت می تواند برای تحقیقات آتی حائز اهمیت باشد.

سپاسگزاری

ندارد.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارضی در منافع گزارش نکردند.

منابع مالی

ندارد.

تاثیر قابل توجه آن بر گامتوسیت این انگل از طریق تغییر شکل مورفولوژیکی گامتوسیت ها اخیرا گزارش شده است (۲۸). مقدار IC_{50} متیلن بلو برای گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط *in vitro* برابر با ۱۲/۴۹ nM می باشد (۲۴). مقدار IC_{50} مربوط به ائوزین B به این ترکیب نزدیک است که نشان دهنده کارایی بالای ائوزین B علیه مرحله جنسی انگل است.

در مقایسه با داروهای اصلی ضد مالاریا می توان اشاره نمود آرتیمیزینین که یک داروی مهم ضد مالاریا به ویژه در درمان های ترکیبی و همچنین موارد مالاریای شدید و مقاوم به دارو است نمی تواند به طور مستقیم در بدن بیمار مبتلا گامتوسیت ها را نابود سازد ولی به طور غیرمستقیم با حذف مراحل خونی انگل سبب کاهش گامتوسیتی می گردد (۶). تاثیر Artesunate که یکی از مشتقات آرتیمیزینین است بر گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط *in vitro* با IC_{50} برابر با ۱۰۲.۳ nM پیشتر گزارش شده است (۲۴). همچنین پریماکوئین که تنها داروی مورد استفاده به صورت بالینی برای حذف گامتوسیت می باشد در شرایط *in vitro* دارای IC_{50} بسیار بالاتری نسبت به ائوزین B می باشد ($IC_{50} = 15 \mu M$). متاسفانه استفاده از این دارو نیز به علت احتمال ایجاد آنتی همولیتیک در افراد مبتلا به نقص در آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز با محدودیت همراه می باشد (۷). از دیگر داروهای مورد استفاده بالینی علیه مراحل خونی مالاریا می توان به کینین و مفلوکین اشاره کرد که هر یک با IC_{50} برابر ۵۰ nM دارای IC_{50} بالاتری نسبت به ائوزین هستند (۲۹). هیدروکسی کلروکوئین یکی از مشتقات داروی دیگر مهم ضد مالاریا (کلروکوئین) در شرایط *in vitro* با IC_{50} برابر با ۲۲/۷۸ nM در برابر گامتوسیت اثر مهارکنندگی خود را نشان داده است (۲۴) که بسیار نزدیک به IC_{50} ائوزین B می باشد. بنابراین کارایی ائوزین B در برابر مرحله

Referance

- World Health Organization. "World Malaria Report 2019. 2019." Reference Source. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/en/>
- World Health Organization, Update on the E-2020 Initiative of 21 Malaria-Eliminating Countries, Report and Country Briefs. 2018. Reference Source.
- <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/e-2020-progress-report/en/>
- Gaur D, Chitnis CE, Chauhan VS, editors. Advances in malaria research. John Wiley & Sons, Incorporated; 2017. [DOI:10.1002/9781118493816]
- Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. Bioorg Med Chem Lett. 2013 May 15;23(10):2829-43. [DOI:10.1016/j.bmcl.2013.03.067] [PMID] [PMCID]

6. Abdul-Ghani R, Basco LK, Beier JC, Mahdy MA. Inclusion of gametocyte parameters in anti-malarial drug efficacy studies: filling a neglected gap needed for malaria elimination. *Malar J*. 2015 Dec;14(1):1-6. [[DOI:10.1186/s12936-015-0936-4](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0936-4)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
7. Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Chantira A, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ. Activities of artesunate and primaquine against asexual and sexual-stage parasites in falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Apr 1;48(4):1329-34. [[DOI:10.1128/AAC.48.4.1329-1334.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1329-1334.2004)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
8. Staines HM, Krishna S, editors. Treatment and prevention of malaria: antimalarial drug chemistry, action and use. Springer Science & Business Media; 2012 Jan 5. [[DOI:10.1007/978-3-0346-0480-2](https://doi.org/10.1007/978-3-0346-0480-2)]
9. World Health Organization (2012) Management of severe malaria: a practical handbook, 3rd edn. WHO, Geneva, http://www.who.int/iris/bitstream/10665/79317/1/9789241548526_eng.pdf?ua=1
10. D'alessandro S, Silvestrini F, Decherig K, Corbett Y, Parapini S, Timmerman M, Galastri L, Basilico N, Sauerwein R, Alano P, Taramelli D. A Plasmodium falciparum screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Sep 1;68(9):2048-58. [[DOI:10.1093/jac/dkt165](https://doi.org/10.1093/jac/dkt165)] [[PMID](#)]
11. Markwalter CF, Davis KM, Wright DW. Immunomagnetic capture and colorimetric detection of malarial biomarker Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase. *Anal Biochem*. 2016 Jan 15;493:30-4. [[DOI:10.1016/j.ab.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.10.003)] [[PMID](#)]
12. Brown WM, Yowell CA, Hoard A, Vander Jagt TA, Hunsaker LA, Deck LM, Royer RE, Piper RC, Dame JB, Makler MT, Vander Jagt DL. Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from the four species of human malarial parasites. *Biochemistry*. 2004 May 25;43(20):6219-29. [[DOI:10.1021/bi049892w](https://doi.org/10.1021/bi049892w)] [[PMID](#)]
13. Iqbal J, Siddique A, Jameel M, Hira PR. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of Plasmodium falciparum mono-infection. *J Clin Microbiol*. 2004 Sep 1;42(9):4237-41. [[DOI:10.1128/JCM.42.9.4237-4241.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4237-4241.2004)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
14. Atreya CE, Johnson EF, Irwin JJ, Dow A, Massimine KM, Coppens I, Stempluk V, Beverley S, Joiner KA, Shoichet BK, Anderson KS. A molecular docking strategy identifies Eosin B as a non-active site inhibitor of protozoal bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):14092-100. [[DOI:10.1074/jbc.M212690200](https://doi.org/10.1074/jbc.M212690200)] [[PMID](#)]
15. Massimine KM, McIntosh MT, Doan LT, Atreya CE, Gromer S, Sirawaraporn W, Elliott DA, Joiner KA, Schirmer RH, Anderson KS. Eosin B as a novel antimalarial agent for drug-resistant Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep 1;50(9):3132-41. [[DOI:10.1128/AAC.00621-06](https://doi.org/10.1128/AAC.00621-06)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
16. Zamani Z, Tafreshi AS, Nahrevanian H, Lame-Rad B, Pourfallah F, Eslamifar H, Sadeghi S, Vahabi F, Iravani A, Arjmand M. Efficacy of eosin B as a new antimalarial drug in a murine model. *Malar Res Treat*. 2012;2012. [[DOI:10.1155/2012/381724](https://doi.org/10.1155/2012/381724)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
17. Federal Register, D&C Red no. 21 and D&C Red no. 22. Federal Register vol. 47, pp. 53843-53846, 1982.
18. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *J Parasitol*. 2005 Jun;91(3):484-6. [[DOI:10.1645/0022-3395\(2005\)091\[0484:HMPICC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2005)091[0484:HMPICC]2.0.CO;2)]
19. Allen RJ, Kirk K. Plasmodium falciparum culture: the benefits of shaking. *Mol Biochem Parasit*. 2010 Jan 1;169(1):63-5. [[DOI:10.1016/j.molbiopara.2009.09.005](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.09.005)] [[PMID](#)]
20. Fivelman QL, McRobert L, Sharp S, Taylor CJ, Saeed M, Swales CA, Sutherland CJ, Baker DA. Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro. *Mol Biochem Parasit*. 2007 Jul 1;154(1):119-23. [[DOI:10.1016/j.molbiopara.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.04.008)] [[PMID](#)]
21. Carter R, Ranford-Cartwright L, Alano P. The culture and preparation of gametocytes of Plasmodium falciparum for immunochemical, molecular, and mosquito infectivity studies. *Protocols in Molecular Parasitology*. 1993 (pp. 67-88). Humana Press. [[DOI:10.1385/0-89603-239-6:67](https://doi.org/10.1385/0-89603-239-6:67)] [[PMID](#)]
22. Reader J, Botha M, Theron A, Lauterbach SB, Rossouw C, Engelbrecht D, Wepener M, Smit A, Leroy D, Mancama D, Coetzer TL. Nowhere to hide: interrogating different metabolic parameters of Plasmodium falciparum gametocytes in a transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination. *Malar J*. 2015 Dec 1;14(1):213. [[DOI:10.1186/s12936-015-0718-z](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0718-z)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
23. Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of Plasmodium falciparum as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Feb 1;48(2):205-10. [[DOI:10.4269/ajtmh.1993.48.205](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.205)] [[PMID](#)]

24. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Jun 1;48(6):739-41. [[DOI:10.4269/ajtmh.1993.48.739](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.739)] [[PMID](#)]
25. Peatey CL, Spicer TP, Hodder PS, Trenholme KR, Gardiner DL. A high-throughput assay for the identification of drugs against late-stage *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol Biochem Parasit.* 2011 Dec 1;180(2):127-31. [[DOI:10.1016/j.molbiopara.2011.09.002](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.002)] [[PMID](#)]
26. Ngwa C, Rosa TF, Pradel G. The biology of malaria gametocytes. *Current Topics in Malaria.* 2016 Nov 30;117-44. [[DOI:10.5772/65464](https://doi.org/10.5772/65464)]
27. Dechy-Cabaret O, Benoit-Vical F. Effects of antimalarial molecules on the gametocyte stage of *Plasmodium falciparum*: the debate. *J Med Chem.* 2012 Dec 13;55(23):10328-44. [[DOI:10.1021/jm3005898](https://doi.org/10.1021/jm3005898)] [[PMID](#)]
28. Adjalley SH, Johnston GL, Li T, Eastman RT, Ekland EH, Eappen AG, Richman A, Sim BK, Lee MC, Hoffman SL, Fidock DA. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *P Natl A Sci.* 2011 Nov 22;108(47):E1214-23. [[DOI:10.1073/pnas.1112037108](https://doi.org/10.1073/pnas.1112037108)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
29. Wadi I, Pillai CR, Anvikar AR, Sinha A, Nath M, Valecha N. Methylene blue induced morphological deformations in *Plasmodium falciparum* gametocytes: implications for transmission-blocking. *Malar J.* 2018 Dec 1;17(1):11. [[DOI:10.1186/s12936-017-2153-9](https://doi.org/10.1186/s12936-017-2153-9)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
30. Peatey CL, Skinner-Adams TS, Dixon MW, McCarthy JS, Gardiner DL, Trenholme KR. Effect of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *J Infect Dis.* 2009 Nov 15;200(10):1518-21. [[DOI:10.1086/644645](https://doi.org/10.1086/644645)] [[PMID](#)]
31. Delves MJ, Straschil U, Ruecker A, Miguel-Blanco C, Marques S, Dufour AC, Baum J, Sinden RE. Routine in vitro culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nat Protoc.* 2016 Sep;11(9):1668-80. [[DOI:10.1038/nprot.2016.096](https://doi.org/10.1038/nprot.2016.096)] [[PMID](#)]