

A Comparative *in vitro* Study of the Effect of Eosin B on Asexual Blood Stages and Gametocyte of *Plasmodium falciparum*

Alireza Sadeghi Tafreshi¹, Zahra Zamani², Marjan Sabbaghian^{1,3*}, Ramezan Ali Khavari-nejad¹, Mohammad Arjmand²

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran



[10.30699/ijmm.15.2.173](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.2.173)



ABSTRACT

Background and Aim: Malaria is one of the most life-threatening infectious diseases worldwide. Transmission of the parasite from human to vector mosquitoes is carried out by the gametocyte of the *Plasmodium* parasite, while these cells are not involved in the symptoms of the disease. The control of the human to mosquito transmission stage of the parasite life cycle by antigametocyte drugs is currently under increasing scrutiny in an effort to eradicate the disease globally. In this study the gametocytocidal activity of eosin B on asexual blood stages and gametocytes of *Plasmodium falciparum* has been probed.

Materials and Methods: The parasite *Plasmodium falciparum* 3D7 was first cultured and then gametocytogenesis was induced to obtain gametocyte cells. After microscopically studying the developmental stages of the parasite during the culture of the parasite, eosin B was tested on blood and sexual parasites and the viability was assessed by lactate dehydrogenase assay and the results were compared for the two groups.

Results: Mature gametocytes were produced during 12 days. The blood parasites in culture were increased until day 4 and then gradually diminished. The results of lactate dehydrogenase assay showed a stronger effect of eosin B on gametocytes ($IC_{50} = 23 \text{ nM}$) than asexual blood stages ($IC_{50} = 133 \text{ nM}$).

Conclusion: Due to the rarity of anti-gametocyte drugs and importance of these intervention on malaria elimination, eosin B appears to be a suitable candidate for combination therapy against *Plasmodium falciparum* gametocytes.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Gametocyte, Eosin B, Lactate dehydrogenase

Received: 2020/08/01;

Accepted: 2020/12/27;

Published Online: 2021/04/09

Corresponding Information: Marjan Sabbaghian, Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran. Email: marian.sabbaghian@gmail.com



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Sadeghi Tafreshi A, Zamani Z, Sabbaghian M, Khavari-Nejad R A, Arjmand M. A Comparative *in vitro* Study of the Effect of Eosin B on Asexual Blood Stages and Gametocyte of *Plasmodium falciparum*. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (2) :173-188

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to: [Mendeley](#) [Zotero](#) [RefWorks](#)

Introduction

Malaria is a preventable, treatable, and life-threatening disease caused by disease-related parasites, which are transmitted to humans by mosquito bites. According to the World Health Organization (WHO) annual report on malaria, in 2018

there were about 228 million cases of malaria and 405,000 deaths due to this disease worldwide (1). According to the official report of the WHO in 2017, 57 cases of native malaria were registered in Iran, which shows a significant decrease compared to 1800 cases

in 2010 and 12000 cases in 2000. In addition, no deaths from malaria were reported in Iran in 2017 (2).

In the complex life cycle of *Plasmodium* parasites, asexual blood stage parasites are responsible for the development of clinical signs and symptoms of the disease, and therefore major antimalarial drugs target this part of the parasite's life cycle and are used to improve the symptoms of the disease. Gametocytes, which are involved in the sexual part of the parasite's life cycle, play no role in causing the symptoms of the disease, but they play a role in transmission of the parasite from the human host to the *Anopheles* mosquito vector (3).

Drugs that can reduce gametocytogenesis, or can kill gametocytes, called gametocytocides, are very effective in counteracting the spread of malaria but due to lack of proper quantitative high throughput screening assays are still being studied. These transmission-blocking antimalarial drugs can work by targeting the following: 1. Effective and complete killing of adult gametocytes when they form in a human host. 2. Inhibition of gametocyte growth to oocytes and eventually sporozoites in mosquitoes. This requires enough medicine to reach the midgut of mosquito from the blood sample (4).

Gametocyte production occurs through five stages of maturation (I to V), and stage V is the only form that can infect mosquitoes. For *P. falciparum*, these mature gametocytes appear 12 days after symptoms and circulate for an average of 2.5 to 6.5 days, lasting up to 22 days. Thus, circulating gametocytes can maintain the process of malaria transmission from host to vector after drug treatment, which eliminates the symptoms of the disease (5).

Most currently approved antimalarial drugs, including artemisinin (ART)-based combination therapies (ACT), are effective only against blood stages and early-stage gametocytes up to stage III and possibly stage IV gametocyte maturation. In addition, some drug treatments such as chloroquine (CQ) and sulfadoxine-pyrimethamine induce gametocytogenesis and therefore effectively increase the number of cases of disease transmission and the rate of new infections (6).

Currently, the only antimalarial drug that has effective gametocytocidal activity is primaquine, which acts against gametocytes of all *Plasmodium* spp. and is the WHO recommended option against *P. falciparum* gametocytes. Unfortunately, the possibility of using this drug is also limited - due to the possibility of acute hemolytic anemia associated with deficiency of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) enzyme (7, 8). Because of the risks of the primaquine treatment, the new transmission-blocking interventions to achieve the ultimate goal of

eradicating malaria are currently receiving considerable attention. Extensive studies are recently underway on the biological characteristics of the transmission stages and the development of *in vitro* assays focusing on the late-stage gametocyte production, mature gametocytes lethality, and gametocyte-oocyte / sporozoite transmission (3). One of the new tests used for the parasite gametocyte stage is the parasite viability assay using the lactate dehydrogenase enzyme (LDH) (9). Lactate dehydrogenase is the enzyme located at the end of the anaerobic pathway of Embden-Meyerhof glycolysis and plays a critical role in the carbohydrate metabolism of human malaria parasites. LDH has been shown to play an important role in malaria infection and may be a possible drug target for malaria treatment (10). In addition to being a marker of parasite viability, *P. falciparum* LDH (*Pf*LDH) is also an interesting diagnostic biomarker, as it is highly conserved among all four species known to infect humans (11). However, *Pf*LDH activity in the host's circulation is cleared within 24 hours after successful treatment, resulting in much less false-positive diagnosis due to the continued presence of a biomarker after removal of the infection (12).

To achieve malaria elimination, antimalarial drugs or combination therapies must not only eliminate the asexual stages of the parasite that are responsible for the clinical symptoms of disease, but must also be able to clear the sexual stages of the parasite that maintain the host-to-vector transmission stage. Therefore, the results of such studies can be a way to prepare novel transmission-blocking antimalarial drugs.

Eosin B (EO) is a laboratory dye that has previously been proposed for its anti-parasitic ability through molecular docking methods and its antimalarial effect has been studied in *in vitro* and rodent malaria models (13-16). In the present study, after culturing *P. falciparum* gametocytes and carefully examining the blood and sex stages of the parasite during the culture period, the EO compound was investigated as a new anti-gametocyte agent and the results of treatment of asexual and sexual stages of the parasite by eosin B using LDH test eosin B has been compared.

Materials and Methods

In vitro Culture of *P. falciparum* Asexual Stage Parasites

Culture of *P. falciparum* strain 3D7 was performed at 37°C in human type O⁺ RBCs at 5% haematocrit. Culture medium contained complete medium including RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), 25 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 0.2% D-glucose (Sigma-Aldrich), hypoxanthine 200 µM (Sigma-Aldrich), 0.2% Sodium hydrogen carbonate (Sigma-Aldrich), gentamicin (Invitrogen) 40 mg. L⁻¹, 0.5% albumex

(Invitrogen) and 10% (vol/vol) O⁺ human serum. The parasite was cultured in an atmosphere containing 90% N₂, 5% O₂ and 5% CO₂ (17, 18).

The culture medium was daily gassed and replaced with a new medium (heated to 37°C). Parasite proliferation on each day of the culture period was microscopically examined by taking Giemsa-stained thin blood smear. To synchronize asexual culture, 5% D-sorbitol was used to prepare the parasite in the early trophozoite stage (ring) (19).

Induction of Gametocytogenesis and Gametocyte Culture

Asexual parasites were cultured to increase the parasitemia to 6-10%. Then the parasitemia was descended to 0.5% (in 6% hematocrit). Cultures were maintained in an atmosphere containing 90% N₂, 5% O₂ and 5% CO₂ without shaking. The cultures were also maintained at 37°C during daily media change. After 72 hours, the hematocrit was reduced to 3% (day 0). Gametocytogenesis was subsequently monitored by daily microscopic examination of the culture medium. On days 6 to 9, asexual forms were removed by treatment with 100 µg. mL⁻¹ heparin (Sigma-Aldrich). Gametocytes were monitored daily by examining Giemsa-stained thin blood smear until they reached stage V and were prepared for further testing (20).

Quality Control of Functionally Viable Mature Stage V Gametocyte Production and Male Gamete Exflagellation

After production of stage V gametocytes, during daily change of culture medium, the precipitated blood cells were resuspended. 200 µL was taken from the culture medium and quickly transferred to a 1.5 ml tube prewarmed to 37°C. After treating the sample with 50 µM xanthurenic acid in an exflagellation buffer (RPMI 1640 with 25 mM HEPES, 0.2% sodium bicarbonate, pH 8), the culture medium was placed in a microcentrifuge at 2000 g for 30 s at room temperature. Then a thin blood smear was prepared from it and stained with Giemsa and then a light microscope was used to control the quality of exflagellation (21).

Eosin B Test on the *P. falciparum* Ring Stage

In a 96-well plate, 20 µL of culture containing added asexual parasites was added to all rows except one row belonging to the control group. All samples were

repeated in triplicate and placed in a CO₂ incubator for 48 hours.

Eosin B Test on Plasmodium Falciparum Gametocyte

In a 96-well plate, 20 µL of gametocyte-containing culture was added to all rows except one row belonging to the control group. All samples were repeated triplicate and placed in a CO₂ incubator for 42 hours.

Parasitemia and Gametocytemia Evaluation by *P. falciparum* Lactate Dehydrogenase (PfLDH) Assay

Parasitemia evaluation by lactate dehydrogenase assay is a high-throughput screening assay for antimalarial agents. For this purpose, 100 µL of Malstat reagent (1.57 g Tris HCl, 2 g L-lactic acid, 200 µL Triton X-100 in 85 ml double-distilled water, 66 mg 3-acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD), pH 9.1) was added to the 96 -well microplate. Then 20 microliters of infected or uninfected red blood cells were added. The plate was incubated at room temperature and gently shaken for a few minutes to dissolve the red blood cells. During incubation, equal volumes of Nitro Blue Tetrazolium (NBT) and Phenazine Ethosulphate (PES) were mixed away from light and 20 µL of the mixture was added to the wells. The plate was placed away from light. After 30 to 60 minutes, the color change was controlled so that the color tended to dark purple. The plate was read using a BioTek PowerWave XS Microplate Reader at 650 nm. Uninfected red blood cells were used as a reference. Viability percentage was calculated from the following formula (9, 22, 23)

$$\text{Viability\%} = 100 \times (\text{OD treated sample} - \mu_{c-}) / (\mu_{c+} - \mu_{c-})$$

μ_{c+} = means (μ) of OD control gametocytes (c+)

$$\mu_{c-}$$
 = means (μ) of OD blank uninfected RBCs (c-)

Statistical analysis: In this study, the tests were repeated 3 times and the results were analyzed by one-way ANOVA at a significance level of p-value <0.05 using GraphPad Prism Version 7.05 software.

Results

Culture of Asexual Parasites

After adjusting the culture conditions and using the appropriate protocol, asexual parasites were cultured. [Figure 1](#) shows the number of parasites during the culture period

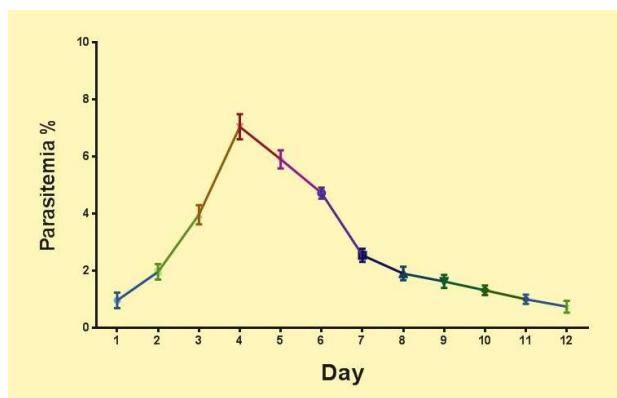


Figure 1. Asexual blood stages parasitemia during gametocyte culture.

As can be seen in the diagram, the number of parasites gradually increases from the beginning of the culture period and reaches its maximum on day 4. Then their number gradually decreased and the parasitemia of asexual sex blood parasites was diminished.

Gametocyte Culture

Figure 2 shows which stages of the parasite are found in the culture medium on different days of the culture period.

The diagram shows the asexual stages around the first to fifth days and the early (I, II and III) and late stage (IV and V) gametocytes were observed in the culture on the second to eighth and seventh to twelfth days, respectively.

Changes in the Number of Gametocytes During the Culture Period

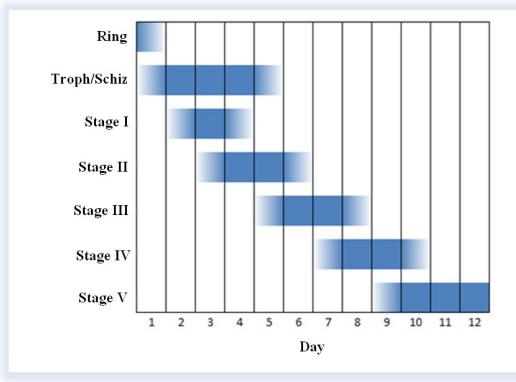


Figure 2. Different stages of *P. falciparum* 3D7 during the gametocyte culture period.

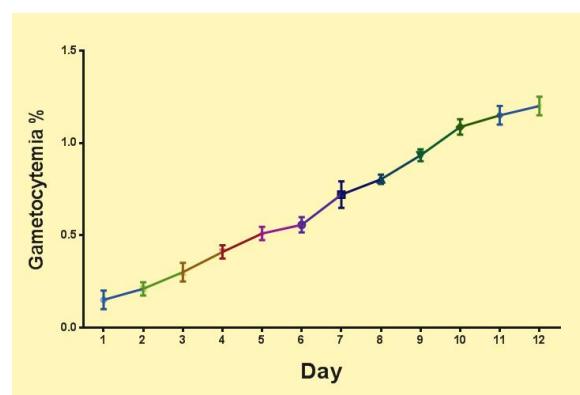


Figure 3. Percentage of gametocytemia during gametocyte culture.

As can be seen in **Figure 3**, the number of gametocytes gradually increases during the culture period and reaches its maximum on day 12 at the same time as the gametocyte matures (stage V). In this condition, the gametocytes are capable of infecting the vector and are ready to perform an anti-gametocyte reagent test.

The Effect of Eosin B on Asexual Stages of *P. falciparum*

Figure 4 shows the effect of EO on the asexual stages of *P. falciparum*. Compared to the control group, the viability decreased for each test group by increasing the concentration of EO. The IC₅₀ of EO for the asexual stages of the parasite is 133 nM.

Figure 5 compares the effects of EO and the control drugs CQ and ART on the parasite ring of *P. falciparum* 3D7. The IC₅₀ level of EO is higher than standard control drugs and is 133 nM. IC₅₀ values for CQ and ART were 6.8 and 7.6 nM, respectively.

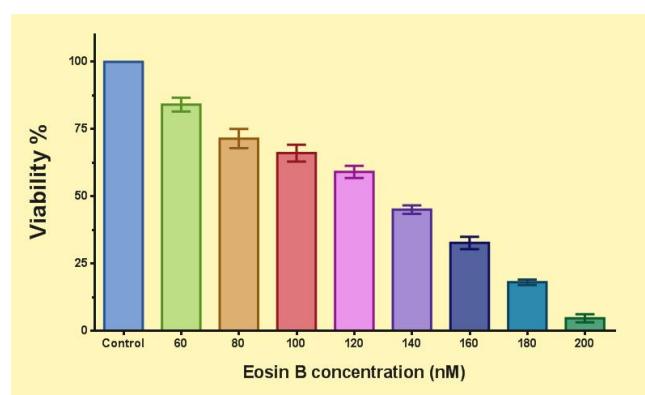


Figure 4. The effect of eosin B on the ring of *P. falciparum* 3D7 parasite. The viability (%) compared to the control group is shown for each test group.

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

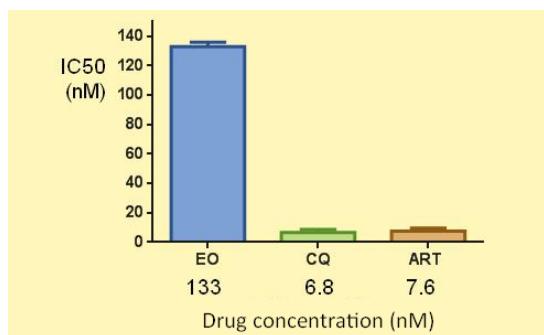


Figure 5. Comparison of the effect of eosin B (EO) and control drugs chloroquine (CQ) and artemisinin (ART) on *P. falciparum* 3D7 parasite ring. IC₅₀ values for EO, CQ and ART are shown below each group. (Means ± SEM (n=5 & P<0.05), One Way-ANOVA test with GraphPad Prism version 7.05)

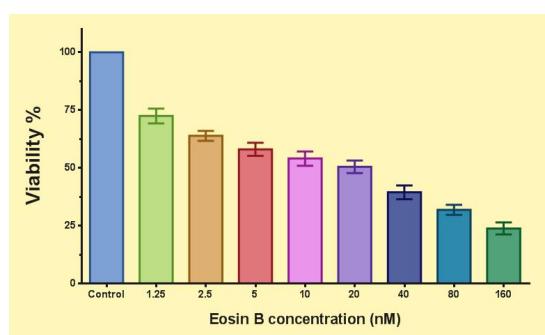


Figure 6. Effect of eosin B on *P. falciparum* 3D7 gametocyte.(Means ± SEM (n=5 & P<0.05), One Way-ANOVA test with Graph Pad prism version 7.05)

The Effect of Eosin B on *P. falciparum* Gametocytes

Figure 6 shows the effect of EO on *P. falciparum* parasite gametocytes. Compared to the control group, the viability decreased for each test group by increasing the concentration of EO. The IC₅₀ of EO for the parasite gametocyte is 23 nM.

Figure 7 compares the effects of EO and the control drugs CQ and ART on *P. falciparum* 3D7 gametocytes. The IC₅₀ value of EO is lower than 23 nM compared to standard control drugs. IC₅₀ values for CQ and ART were 41 and 85 nM, respectively. Contrary to the results of the EO test on the blood stages of the parasite, it was observed that EO inhibited the gametocyte growth at a lower dose than standard drugs, indicating a potent inhibitory effect of EO on the *P. falciparum* 3D7 gametocyte.

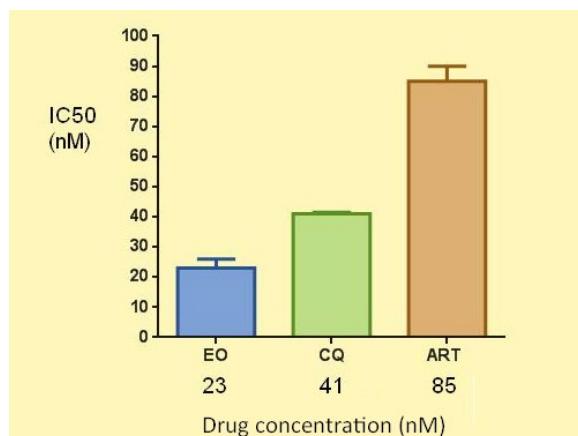


Figure 7. Comparison of the effect of eosin B (EO) and chloroquine (CQ) and artemisinin (ART) control drugs on *P. falciparum* 3D7 parasite gametocytes. IC₅₀ values for EO, CQ and ART are shown below each group.(Means ± SEM (n=5 & P<0.05), One Way-ANOVA test with Graph Pad prism version 7.05)

Discussion

Sustained control of malaria is achieved if, in addition to using therapeutic strategies that target the asexual forms that cause the symptoms of malaria, the sexual forms of the parasite, which are the same as gametocytes, are also targeted by drugs that control the parasite transmission stage (24). In the present study, by an improved protocol of using heparin, induction of gametocytogenesis and production of parasite sex cells was performed to test a new compound in the treatment of *P. falciparum* strain 3D7. It should also be noted that the control of cultured gametocytes should be done carefully so that at least 90% of gametocytes have reached full IV-V growth stage in order to test the drug composition (25). Also, direct comparison of data from studies of drug discovery against gametocytes is difficult due to several factors, including the following: 1- Parasite strain used; 2- Protocol used to induce gametocytogenesis; 3- Combination of culture medium Used; 4- Gametocyte isolation protocols; 5- Developmental stage of gametocytes in the study; 6- Principles of assays used in the experiment; 7- Presence or absence of erythrocytes; 8- Number of gametocytes in each test well; 10- Concentration of tested compounds; 11- Duration of drug administration; 12- How to express the obtained data such as inhibition percentage in a certain concentration or IC₅₀ alone, etc. (14).

EO has shown a significant inhibitory effect on *Toxoplasma gondii* and the blood stage of *P. falciparum*. IC₅₀ values for EO in *T. gondii* and *P. falciparum* asexual blood stages were 180 μM and 124 nM, respectively (13, 14). Since the IC₅₀ of EO for *P. falciparum* gametocytes is 23 nM, EO can inhibit gametocytes more severely than asexual blood parasites. Due to the fact that many antimalarial drugs do not have much ability to eliminate the sexual stage of the parasite and even some (such as CQ) induce

gametocyte production and increase the number of gametocytes (26), the significant effect of EO on gametocytes and its anti-gammocyte effect *in vitro* can be considered for the preparation of drugs that block human-to-mosquito transmission.

Methylene blue, which is a dye used in the laboratory, has an inhibitory effect against all stages of *P. falciparum* (4) and has been proposed as a strong inhibitor of the transition from host to vector (27). Also, its significant effect on gametocytes of this parasite through morphological deformation of gametocytes has been recently reported (28). The IC₅₀ value of methylene blue for *P. falciparum* gametocyte *in vitro* is 12.49 nM (24). The IC₅₀ value for EO is close to this combination, indicating the high efficacy of EO against the sexual stage of the parasite.

Compared to the main antimalarial drugs, it can be mentioned that ART, which is an important antimalarial drug, especially in combination therapies, as well as cases of severe and drug-resistant malaria, cannot directly inhibit gametocytes in the patient's body, but it reduces the gametocytemia indirectly by eliminating the blood stages of the parasite (6). The effect of Artesunate, a derivative of ART, on *P. falciparum* gametocytes has been previously reported *in vitro* with an IC₅₀ of 102.3 nM (24). Also, primaquine, which is the only drug used clinically to remove gametocytes, has a much higher IC₅₀ *in vitro* than EO (IC₅₀ 15 μM). Unfortunately, the use of this drug is also limited due to the possibility of hemolytic anemia in people with deficiency in glucose-6-phosphate dehydrogenase (7). Other drugs used clinically against malaria blood stages include quinine and mefloquine, each of which has a higher IC₅₀ than eosin with an IC₅₀ of 50 nM (29). Hydroxychloroquine is another derivative of the important antimalarial drug (CQ) *in*

vitro with an IC₅₀ of 22.78 nM against gametocytes has shown its inhibitory effect (24), which is very close to IC₅₀ EO. Therefore, the efficacy of EO against the sexual stage of *P. falciparum* is close to or higher than some of the important known antimalarial drugs. Therefore, due to the possibility of using EO as an oral drug and its strong anti-gametocytic effect compared to some conventional drugs, this combination can be considered as a suitable candidate for use as a drug that blocks the transmission from host to vector.

Conclusion

Given the significant effect of EO on the number of gametocytes and also the comparison of its effect on the blood stage of *P. falciparum* *in vitro*, this combination will probably be able to effectively control the transmission from human host to mosquito vector. This effect can be tested by infecting Anopheles mosquitoes, which can be considered in future research using the standard Membrane-Feeding Assay test, which is the gold standard test for blocking transmission to be examined (30). Given the lack of known pharmacological agents that block human-to-vector transmission, identifying the EO compound as an antigamete agent could be important for future research.

Acknowledgment

None.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.

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

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

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

حکیمه

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: بیماری مالاریا به عنوان یکی از تهدیدکننده‌ترین بیماری‌های عغوفی 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 افزایین B در شرایط برونشی بروی مراحل خونی، و گامتوسیت پلاسمودیوم مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش کار: ابتدا انگل پالاسمودیوم فالسپیاروم سویه 3D کشت داده شده و سپس با القای گاماتوستیوژن، سلول های گاماتوسیت تهیه شدند. پس از بررسی مراحل نمو انگل طی دوره کشت انگل با بررسی میکروسکوپی، اثوزین B روی انگل های خونی و گاماتوسیت تست شده و میزان زندگمانی با استفاده از تست آنزیم لاكتات دهیدروژناز بررسی شد. نتایج برای گروه جنسی غیر جنسی مقایسه گردید.

یافته‌ها: گامتوپیت‌ها پس از ۱۲ روز به بلوغ کامل (مرحله V) رسیدند. انگل‌های غیرجنSSI در طول دوره کشت تا روز چهارم افزایش و سپس شروع به کاهش نمودند. نتایج تست آنژیم لاكتات دهیدروژناز حاکی از تاثیر قوی‌تر اینوزین B روی گامتوپیت (IC₅₀=23 nM) نسبت به مرحله غیرجنSSI (IC₅₀=133 nM) بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به تعداد محدود داروهای ضد گامتوسیت و اهمیت این ترکیبات در کنترل بیماری مalaria انوزین B کاندیدای مناسبی برای درمان های ترکیبی علیه گامتوسیت پلاسموپاروم فایسبیاروم است.

تاریخچہ مقالہ

۱۳۹۹/۰۵/۱۱ دریافت:

۱۳۹۹/۱۰/۰۷: پذیرش

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰

موضع: انگل شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

مرجان صباغیان ، گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه روابط ایران.

mariann.sabbaghian@gmail.com

٤٦٩

مرگی در اثر ابتلا به بیماری مalaria 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 عمدۀ داروهای ضدمالاریا این بخش از زندگی انگل را هدفگیری نموده و در راستای بهبود علائم بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. گامتوسبیت‌ها 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 می‌گردد، ایجاد می‌شود. مطابق گزارش سالانه سازمان بهداشت جهانی (WHO) در مورد مalaria، در سال ۲۰۱۸ حدود ۲۲۸ میلیون مورد ابتلا به مalaria 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 مalariaیای 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 (۲). از جمله تست‌های سنجش جدید که برای مرحله گامتوسیتی انگل نیز مورد استفاده قرار گرفته تست سنجش زنده‌مانی انگل با استفاده از آنزیم لاكتات دهیدروژناز (LDH) است (۹). لاكتات دهیدروژناز، آنزیم انتهایی مسیر بی‌هوایی گلیکولیز امبدن-میرهوف بوده و نقش مهمی را در متابولیسم کربوهیدرات‌انگل‌های مالاریای انسانی بازی می‌کند. مشخص شده است که LDH نقش مهمی را در آلودگی مالاریایی داشته و می‌تواند یک هدف دارویی ممکن برای تیمار مالاریا باشد (۱۰). علاوه بر آن که لاكتات دهیدروژناز پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Pf/LDH*) 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 *Pf/LDH* در گردش خون میزان ۶/۵ ساعت پس از درمان موقتی آمیز پاکسازی می‌شود و در ظرف ۲۴ ساعت پس از درمان موقتی 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 ضدمالاریا یا درمان‌های دارویی ترکیبی نباید تنها به حذف مراحل غیرجنSSI انگل که مسئول بیماری کلینیکی هستند بسته کنند، بلکه همچنین باید قادر به پاکسازی مراحل جنسی انگلی که مرحله انتقال را حفظ می‌کنند نیز باشند. لذا نتایج چنین مطالعاتی می‌توانند در جهت تهیه داروهای مسدود کننده مرحله انتقال راهگشا باشند.

اوزین 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 (۱۳-۱۶). در تحقیق حاضر پس از کشت گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم و بررسی دقیق مراحل خونی و جنسی انگل طی دوره کشت، ترکیب اوزین B به عنوان یک ترکیب ضد گامتوسیت جدید مورد بررسی قرار گرفته و نتایج تیمار مراحل غیرجنSSI و جنسی انگل توسط این ترکیب با استفاده از تست لاكتات دهیدروژناز مقایسه گردیده است.

روش پژوهش

کشت برون‌تنی انگل‌های مرحله غیرجنSSI پلاسمودیوم فالسیپاروم

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

داروهایی که می‌توانند گامتوسیتوژنر را کاهش دهند یا می‌توانند باعث کشته شدن گامتوسیت‌ها گردند و گامتوسیتوسید نامیده می‌شوند، از نظر کارآیی 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 و قوی که در میزان 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 به طور متوسط ۲/۵ تا ۶/۵ روز در گردش هستند و تا ۲۲ روز پایدارند. بنابراین گامتوسیت‌های در گردش می‌توانند فرایند انتقال مالاریا از میزان به ناقل را بعد از تیمار دارویی - که موجب حذف علائم بیماری می‌گردد - حفظ نمایند (۵).

بیشتر داروهای ضدمالاریایی 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 گامتوسیتوژنر گردیده و بنابراین به طور مؤثری در افزایش تعداد انتقال‌ها و بالا بردن میزان آلودگی‌های جدید نقش دارند (۶).

در حال حاضر تنها داروی ضد مالاریایی که به طور مؤثر فعالیت گامتوسیتوسیدی دارد پریماکوئین است که علیه گامتوسیت‌های همه گونه‌های مالاریایی عمل می‌کند و گزینه توصیه شده WHO علیه گامتوسیت‌های پلاسمودیوم فالسیپاروم است. مatasفانه امکان استفاده از این دارو نیز - به دلیل احتمال ایجاد آنمی همولیتیک - حاد به دلیل نقص آنزیم گلوكز 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 گسترهای در زمینه ویژگی‌های بیولوژی مراحل انتقال و در تولید سنجش‌های *in vitro* متمنکر روی مراحل انتهایی تولید گامتوسیت، کشنده بودن گامتوسیت‌های بالغ و انتقال

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

تست ائوزین 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 غیرجنسي اضافه شده ورقتهای مختلف از دارو به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. همه نمونه‌ها به صورت سه تائی تکرار شدند و به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور CO_2 گذاشته می‌شوند.

تست ائوزین 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 ورقتهای مختلف از دارو به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. همه نمونه‌ها به صورت سه تائی تکرار شدند و به مدت ۴۲ ساعت در داخل انکوباتور CO_2 گذاشته می‌شوند.

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

ارزیابی پارازیتمی از طریق سنجش آنزیم لاكتات دهیدروژناز یک روش غربالگری با توان عملیاتی بالا (High-Throughput Screening) برای بررسی عوامل ضدمالاریا است. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر شناساگر Malstat ۱/۵۷، ۲ گرم L-لакتیک اسید، ۲۰۰ میکرولیتر Triton X-100 در ۸۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده، ۶۶ میلی‌گرم ۳-استیل پیریدین آدنین دی‌نوکلوتید (APAD)، ۹/۱ pH به میکرولیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر گلوبول قرمز خون آلوده یا غیرآلوده به آن اضافه شد. پلیت در دمای اتاق انکوبه شده و به مدت چند دقیقه به ملایمیت تکان داده شد تا گلوبول‌های قرمز خونی حل شوند. در طول انکوباسیون، حجم‌های مساوی از Nitro Blue Tetrazolium (NBT) و Phenazine Ethosulphate (PES) 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 تعییر رنگ کنترل شد تا رنگ به ارغوانی تیره متمایل شد. پلیت با استفاده از دستگاه BioTek PowerWave XS مدل Microplate Reader در طول موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. گلوبول‌های قرمز غیرآلوده به عنوان رفرانس به کار برده شد. درصد زنده‌مانی از فرمول زیر محاسبه شد (۲۲، ۲۳):

درصد انجام شد. محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت کامل شامل ۲۵ HEPES medium (Sigma-Aldrich) میلی‌مولار، ۰/۲ D-گلوکز (Sigma-Aldrich)، ۰/۲ سدیم هیدروژن کربنات (Sigma-Aldrich)، ۰/۵ درصد (Invitrogen) mg.L^{-۱}، همراه با آلبومکس II (Invitrogen) و سرم انسانی ۱۰ درصد بود. انگل در اتمسفری شامل ۹۰ درصد O_2 و ۵ درصد CO_2 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 غیرجنسي از D-سوربیتول ۵ درصد برای تهیه انگل در مرحله تروفوزوئیت اولیه (حلقه) استفاده شد (۱۹).

الای گامتوسیتوژن و کشت گامتوسیت

انگل‌های غیرجنسي 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 N_2 ، ۵ درصد O_2 و ۵ درصد CO_2 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 گامتوسیتوژن با بررسی روزانه میکروسکوپی ۹ در هنگام تعویض محیط پایش گردید. در روزهای ۶ تا ۹ اشکال غیرجنسي از طریق تیمار با هپارین (Sigma-Aldrich) $\mu\text{g.mL}^{-۱}$ داده شد گردیدند. گامتوسیت‌ها به طور روزانه از طریق بررسی گسترش‌های خونی نازک 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 تنهشین شده را مجدداً به حالت تعليق درآورده و ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشت شده و به سرعت به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری که پيشتر تا دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم شده بود منتقل شد. پس از تیمار نمونه با زانتورنیک اسید ۵۰ میکرومولار در بافر exflagellation ۱۶۴۰ RPMI با ۲۵ HEPES میلی‌مولار، ۰/۲ درصد سدیم بیکربنات، ۸ pH، محیط کشت در میکروسانتریفیوژ در g ۲۰۰۰ برای ۵ در دمای اتاق قرار داده شد.

GraphPad Prism Version 8 با استفاده از نرم افزار P-value < 0.05 آنالیز گردید.

$\text{دراصد} = \frac{\text{OD}_{\mu\text{c}+} - \text{OD}_{\mu\text{c}-}}{\text{OD}_{\mu\text{c}+} + \text{OD}_{\mu\text{c}-}} \times 100$ زنده بودن

یافته‌ها

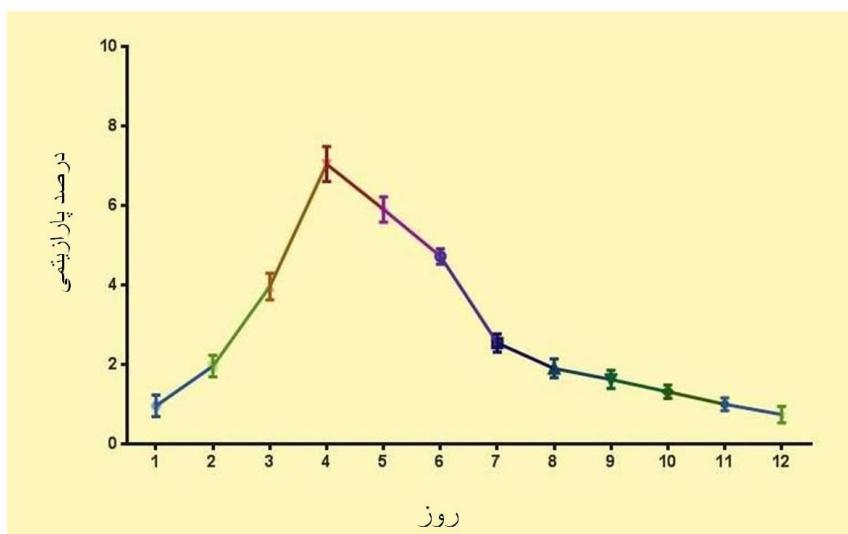
کشت انگل غیرجنسی
بعد از تنظیم شرایط کشت و استفاده از پروتکل مناسب انگل‌های غیرجنسی کشت داده شدند شکل ۱ تعداد انگل‌ها را در دوره کشت نشان می‌دهد.

میانگین OD_{c+} = میانگین OD_{c-}

میانگین OD_{c-} = میانگین OD_{c+}

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

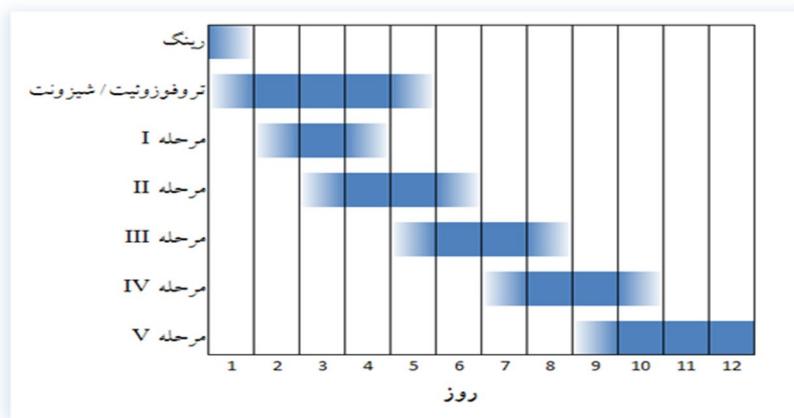


شکل ۱. درصد پارازیتمی در طول کشت دوره‌ای گامتوسیت.

کشت گامتوسیت

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

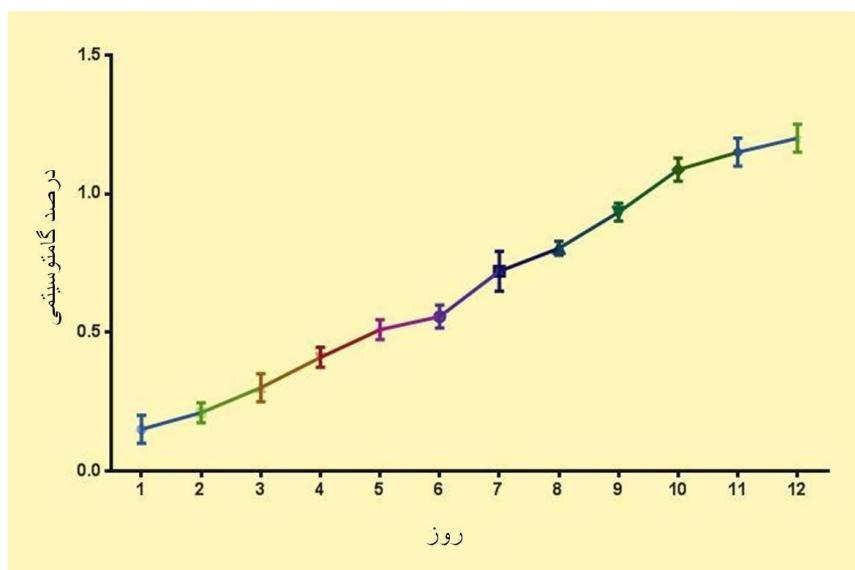
چنان‌که در شکل مشاهده می‌شود تعداد انگل‌ها از آغاز دوره کشت به تدریج افزایش یافته و در روز ۴ به حداقل مقدار خود می‌رسد. سپس به تدریج تعداد آن‌ها رو به کاهش می‌گذارد و درصد پارازیتمی انگل‌های خونی غیرجنسی کاهش می‌یابد.



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.

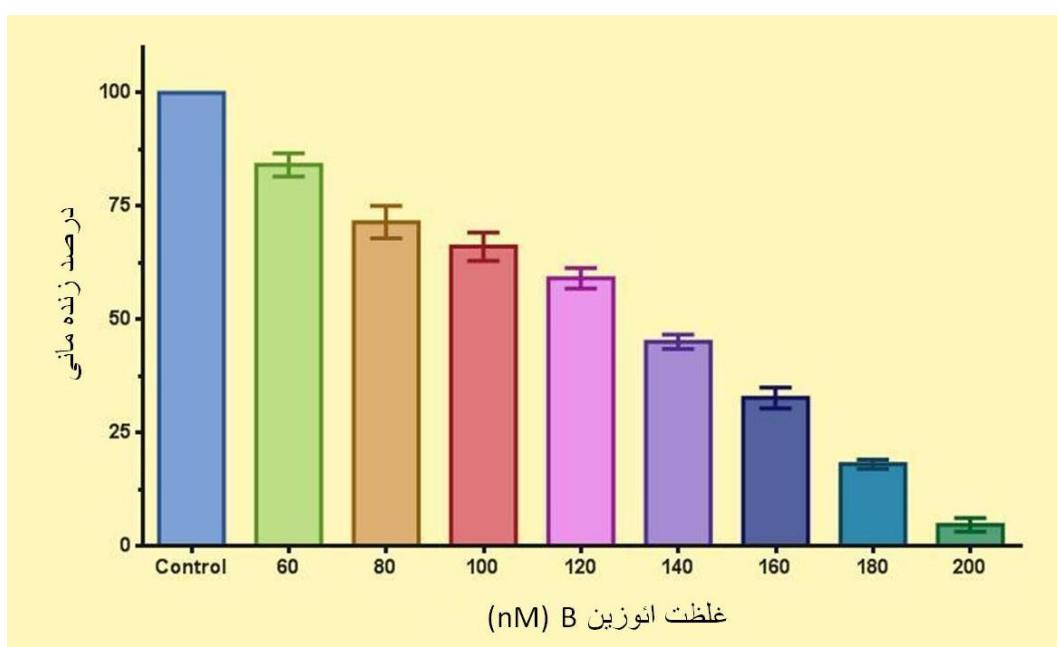
شکل نشان می‌دهد مراحل غیرجنسی در حدود روزهای اول تا پنجم و گامتوسیت‌های مرافق ابتدایی (I، II و III) و نهایی (IV)



شکل ۳. درصد گامتوسیت‌می در طول کشت دوره‌ای گامتوسیت.

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

تفییرات 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



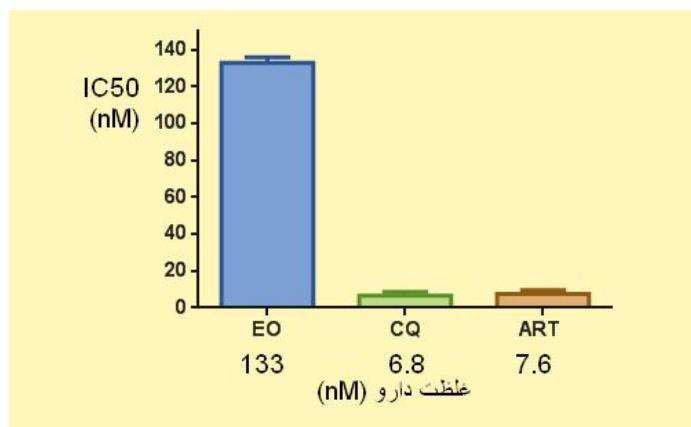
شکل ۴. تاثیر ائوزین B بر رینگ انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم ۳D7 درصد زنده‌مانی در مقایسه با گروه کنترل برای هر گروه تست نشان داده شده است.

(Means \pm 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 nM به دست آمد.

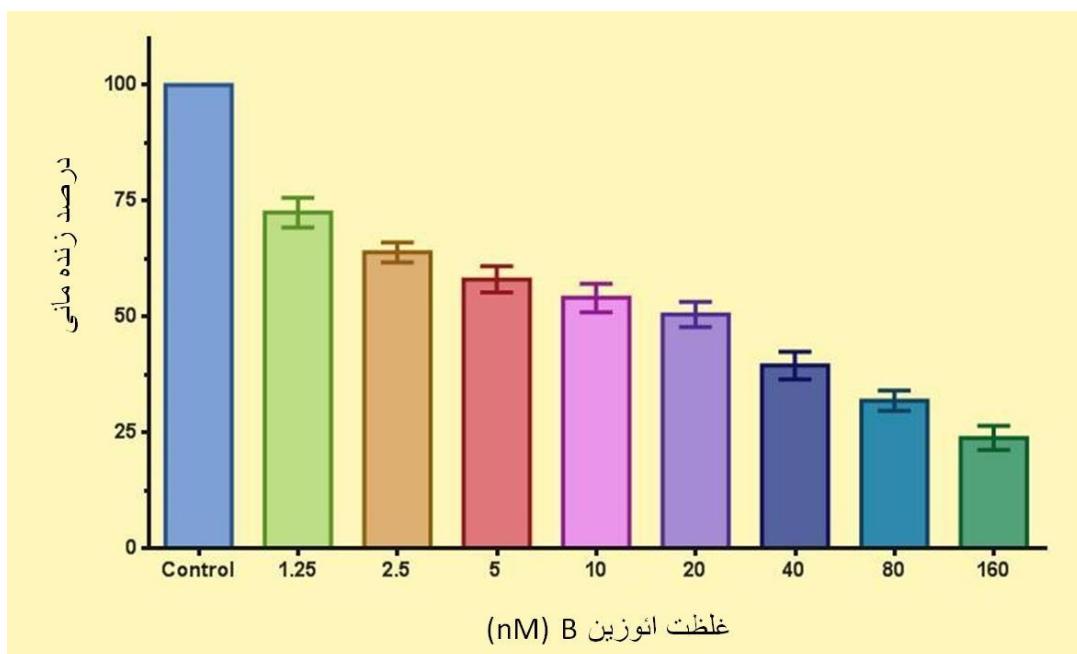
تأثیر ائوزین B بر مراحل غیرجنسی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم

شکل ۴ تاثیر 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، 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)

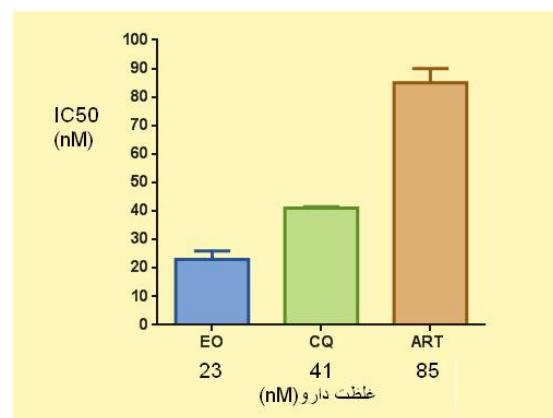
گامتوسیت‌ها هستند نیز مورد هدف داروهای کنترل کننده مرحله انتقال انگل قرار گیرند (۲۴). در تحقیق حاضر با استفاده از هپارین توسط یک پروتکل بهبود یافته، القای گامتوسیت‌وژن و تولید سلول‌های مرحله جنسی انگل به منظور تست ترکیب جدید در تیمار پلاسمودیوم فالسیپاروم سویه 3D7 ۳۱ جام شده است. همچنین باید توجه داشت کنترل گامتوسیت‌های کشت شده باید بهطور 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 گامتوسیت‌وژن -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 به‌دست‌آمده مانند درصد مهار در یک غلظت خاص یا مقادیر IC_{50} به تنها یا غیره (۱۴).

اوزین B بر روی انگل *Toxoplasma gondii* و مرحله خونی پلاسمودیوم فالسیپاروم اثر مهارکننده‌گی قابل توجهی نشان داده است. مقادیر IC_{50} مربوط به اوزین B در تیمار *Toxoplasma gondii* و مراحل غیرجنسی خونی پلاسمودیوم فالسیپاروم به ترتیب μM ۱۸۰ و nM ۱۲۴ است (۱۴، ۱۳). نظر به این که اوزین B برای گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم nM ۲۳ است، اوزین B می‌تواند گامتوسیت را نسبت به انگل‌های خونی غیرجنسی با شدت بیشتری مهار کند. با توجه به این که بسیاری از داروهای ضدمالاریا توانایی چندانی در حذف مرحله جنسی انگل ندارند و حتی بعضی (مانند کلروکوئین) سبب القای گامتوسیت‌زایی و افزایش تعداد گامتوسیت‌ها می‌شوند (۲۶)، تاثیر چشمگیر اوزین B بر گامتوسیت و اثر ضدگامتوسیتی آن در شرایط *in vitro* می‌تواند برای تهیه داروهای بلوکه کننده انتقال از انسان به پشه مورد توجه قرار گیرد.

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

تأثیر اوزین B بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم

شکل ۶ تأثیر اوزین B بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم را نشان می‌دهد. درصد زنده‌مانی در مقایسه با گروه کنترل، برای هر گروه تست با افزایش غلظت اوزین B کاهش می‌یابد. مقدار IC_{50} اوزین B برای گامتوسیت انگل nM ۲۳ است.



شکل ۷. مقایسه تأثیر اوزین B و داروهای کنترل کلروکوئین و آرتیزینین بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم ۳D7 . مقدار IC_{50} برای اوزین B (EO)، کلروکوئین (CQ) و آرتیزینین (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)

در شکل ۷ تأثیر اوزین B و داروهای کنترل کلروکوئین و آرتیزینین بر گامتوسیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم ۳D7 مقایسه شده است. مقدار IC_{50} اوزین B نسبت به داروهای کنترل استاندارد پایین‌تر و برابر nM ۲۳ است. در شرایط آزمایش استاندارد پایین‌تر و برابر nM ۴۱ است. در شرایط آرتیزینین (ART) به ترتیب برابر nM ۸۵ نانومتر به‌دست آمد. بر خلاف نتایج حاصل از تست ترکیب اوزین B بر مراحل خونی انگل مشاهده شد که اوزین B با دوز پایین‌تری نسبت به داروهای استاندارد کنترل رشد گامتوسیت را مهار نموده که بیانگر تاثیر مهاری قابل توجه اوزین B بر گامتوسیت است.

بحث

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

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

نتیجه‌گیری

با توجه به تاثیر معنی دار اوزین B بر تعداد گامتوسیت‌ها و همچنین مقایسه تاثیر آن بر مرحله خونی پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط *in vitro*، این ترکیب احتمالاً قادر به کنترل مؤثر انتقال از میزبان انسانی به پشه خواهد بود که لازم است ابتدا این امر از طریق آلوده کردن پشه‌های آنوفل ناقل مورد آزمون قرار بگیرد که این امر می‌تواند 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 اوزین B به عنوان عامل آنتی گامتوسیت می‌تواند برای تحقیقات آتی حائز اهمیت باشد.

سپاسگزاری

ندارد.

تعارض در منافع

نویسنده‌گان هیچ‌گونه تعارضی در منافع گزارش نکردند.

منابع مالی

ندارد.

Reference

- 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]

تأثیر قابل توجه آن بر گامتوسیت این انگل از طریق تغییر شکل مورفولوژیکی گامتوسیت‌ها اخیراً گزارش شده است (۲۸). مقدار IC₅₀ متیلن بلو برای گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط *in vitro* برابر با ۱۲/۴۹ nM می‌باشد (۲۴). مقدار IC₅₀ مربوط به اوزین B به این ترکیب نزدیک است که نشان‌دهنده کارآیی بالای اوزین B علیه مرحله جنسی انگل است.

در مقایسه با داروهای اصلی ضدمالاریا می‌توان اشاره نمود آرتیزینین که یک داروی مهم ضدمالاریا بهویژه در درمان‌های ترکیبی و همچنین موارد مالاریای شدید و مقاوم به دارو است نمی‌تواند به طور مستقیم در بدن بیمار مبتلا گامتوسیت‌ها را نابود سازد ولی به طور غیرمستقیم با حذف مراحل خونی انگل سبب کاهش گامتوسیتی می‌گردد (۶). تاثیر Artesunate که یکی از مشتقات آرتیزینین است بر گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط *in vitro* با IC₅₀ ۱۰۲.۳ nM برابر با ۱۰۲.۳ nM در شرایط *in vitro* پیشتر گزارش شده است (۲۴). همچنین پریماکوئین که تنها داروی مورد استفاده به صورت بالینی برای حذف گامتوسیت می‌باشد در شرایط *in vitro* دارای IC₅₀ بسیار بالاتری نسبت به اوزین B می‌باشد (۱۵) (۱۵). متسافانه استفاده از این دارو نیز به علت احتمال ایجاد آنemi همولیتیک در افراد مبتلا به نقص در آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز با محدودیت همراه می‌باشد (۷). از دیگر داروهای مورد استفاده بالینی علیه مراحل خونی مالاریا می‌توان به کینین و مفلوکین اشاره کرد که هر یک با IC₅₀ ۵۰ nM دارای ۵۰ دارای IC₅₀ بالاتری نسبت به اوزین هستند (۲۹). هیدروکسی کلروکوئین یکی از مشتقات داروی دیگر مهم ضدمالاریا (کلروکوئین) در شرایط *in vitro* با IC₅₀ برابر با ۲۲/۷۸ nM در برابر گامتوسیت اثر مهارکننده‌گی خود را نشان داده است (۲۴) که بسیار نزدیک به اوزین B می‌باشد. بنابراین کارآیی اوزین B در برابر مرحله

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, Chantra 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, Dechering 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 monoinfection. *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, Stempliuk 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, Coetzter 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]