

Original Article

## Studying the Inhibitory Effect of Liposomes Containing Eosin B on Plasmodium Parasite in Vivo and in Vitro Models

Mana Najafzade<sup>1</sup>, PhD; Haleh Bakhshandeh<sup>2</sup>, PhD; Monireh Movahedi<sup>1</sup>, PhD; Zahra Zamani<sup>3\*</sup>, PhD

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Nanobiotechnology, New Technologies Research Group, Pasteur Institute of Iran

<sup>3</sup>Professor, Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran

### Article Information

**Article History:**

Received: May 13, 2023

Accepted: Nov. 19, 2023

**\*Corresponding Author:**

Zahra Zamani, PhD;

Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran

Tel: +98 21 66402770

Email: zamani@pasteur.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** In recent years, due to the spread of drug resistance in the Plasmodium parasite and the shortcomings of anti-malarial drugs, the use of liposome-based nanomedicines in treating malaria has garnered significant attention. This research studied the effect of liposomes containing the antimalarial compound Eosin B on the Plasmodium berghei parasite in murine malaria.

**Methods:** Liposomes containing Eosin B were prepared using cholesterol in the presence of Eosin B via solvent evaporation. Eosin B, Eosin B liposome, drug solvent, drug-free liposomes, and control drugs were administered to infected mice. The percentage of parasite inhibitory activity was evaluated using Peter's test. In the in vitro model, the Plasmodium falciparum parasite was first cultured, and the survival percentage of the parasite in each group was investigated using the parasite lactate dehydrogenase test.

**Results:** In each test group, the percentage of parasitemia under the effect of the Eosin B liposome was lower than that of Eosin B alone, and the inhibition percentage was significantly higher ( $P < 0.05$ ). Also, the survival percentage of the parasite in the in vitro model was lower in each group under the effect of the Eosin B liposome compared to Eosin B alone.

**Conclusion:** Liposomes containing Eosin B can increase efficacy in the mouse malaria model and reduce the drug's dose. Considering the reduction of drug dosage in treating malaria by the Eosin B liposome, using this liposome drug might be beneficial.

**Keywords:** Malaria, Plasmodium berghei, Eosine I Bluish, Liposomes

**Please cite this article as:**

Najafzade M, Bakhshandeh H, Movahedi M, Zamani Z. Studying the Inhibitory Effect of Liposomes Containing Eosin B on Plasmodium Parasite in Vivo and in Vitro Models. Sadra Med. Sci. J. 2024; 12(3): 300-307.



مقاله پژوهشی

## مطالعه اثر مهارکنندگی لیپوزوم‌های حاوی ائوزین B بر انگل پلاسمودیوم در مدل‌های درون تنی و برون تنی

مانا نجف‌زاده<sup>۱</sup>، هاله بخشنده<sup>۲</sup>، منیره موحدی<sup>۱</sup>، زهرا زمانی<sup>۳\*</sup>

استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران  
استادیار، بخش نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران  
استاد، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** در سال‌های اخیر به دلیل گسترش مقاومت دارویی انگل پلاسمودیوم و همچنین کاستی‌های داروهای ضد مالاریا، استفاده از نانوداروهای بر پایه لیپوزوم در درمان مالاریا به شدت مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق اثر لیپوزوم‌های حاوی ترکیب ضد مالاریای ائوزین B بر انگل پلاسمودیوم برگئی مالاریای موشی مورد مطالعه قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه با استفاده از کلسترویل در حضور ائوزین B، لیپوزوم‌های حاوی ائوزین B به روش تیخیر حلال تهیه شدند و ائوزین B، ائوزین B لیپوزوم، حلال دارو، لیپوزوم‌های فاقد دارو و داروهای کنترل برای موش‌های آلوده تجویز شد، سپس درصد فعالیت مهارکنندگی انگل با استفاده از آزمایش پیتز مورد بررسی قرار گرفت. در مدل برون تنی نیز ابتدا انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم کشت داده شد و درصد زنده‌مانی انگل در هر گروه با استفاده از تست لاکتات دهیدروژناز انگل بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در هر گروه آزمایش، درصد پارازیمی انگل تحت تاثیر ائوزین B لیپوزوم نسبت به ائوزین B تنها پایین‌تر، و درصد مهارکنندگی به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بالاتر بود. درصد زنده‌مانی انگل در مدل برون تنی نیز در هر گروه تحت تاثیر ائوزین B لیپوزوم نسبت به ائوزین B تنها، پایین‌تر بود.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از لیپوزوم‌های حاوی ائوزین B می‌تواند سبب افزایش کارایی داروی ائوزین B در مدل مالاریای موشی و کاهش دوز داروی مصرفی گردد. با توجه به کاهش دوز مصرفی دارو در تیمار مالاریا توسط ائوزین B لیپوزوم، استفاده از این دارو می‌تواند مفید باشد.

**کلمات کلیدی:** مالاریا، پلاسمودیوم برگئی، پلاسمودیوم فالسیپاروم، ائوزین B، لیپوزوم

### اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۸

\*نویسنده مسئول:

زهرا زمانی

استاد، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۶۶۴۰۲۷۷۰

پست الکترونیکی: zamani@pasteur.ac.ir

لطفاً این مقاله را به این صورت استناد کنید:

نجف‌زاده م، بخشنده ه، موحدی م، زمانی ز. مطالعه اثر مهارکنندگی لیپوزوم‌های حاوی ائوزین B بر انگل پلاسمودیوم در مدل‌های درون تنی و برون تنی. مجله علوم پزشکی صدرا. دوره ۱۲، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۳۰۰-۳۰۷.

پیش‌بینی می‌کند، ائوزین<sup>۱۱</sup> به‌عنوان یک داروی بالقوه ضد تک‌یاخته‌شناسایی شده است (۸). حساسیت ائوزین B در شرایط آزمایشگاهی روی انگل‌های توکسوپلازما گوندی<sup>۱۲</sup> و لیشمانیا ماژور<sup>۱۳</sup> آزمایش شده است. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که ائوزین B یک مهارکننده بسیار انتخابی و قوی برای انواع سویه‌های مالاریا مقاوم به دارو با میانگین<sup>۱۴</sup> IC50 برابر با ۱۲۴ نانومولار است و می‌تواند یک ترکیب مؤثر برای توسعه داروهای جدید و مؤثرتر ضد مالاریا باشد (۹). در این مطالعه با توجه به ساختار مولکولی ائوزین B این ترکیب لیپوزومه گردید و سپس اثر مهارکنندگی آن در شرایط درون‌تنی بر انگل پلاسمودیوم برگئی<sup>۱۵</sup> حساس به کلروکین در مدل مالاریای موشی مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی تغییرات پارازیتمی از مطالعه میکروسکوپی گسترش‌های نازک خونی‌رنگ شده توسط گیمسا<sup>۱۶</sup> استفاده شد. در بخش دیگر این تحقیق، انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم<sup>۱۷</sup> کشت داده شد و درصد زنده‌مانی انگل در غلظت‌های مختلف داروی لیپوزومه و بدون لیپوزوم از طریق تست آنزیم لاکتات دهیدروژناز<sup>۱۸</sup> انجام شد، همچنین نتایج با داروی کنترل کلروکین مقایسه گردید.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه، یک تحقیق مداخله‌ای تجربی و بنیادی - کاربردی در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی بود و در انستیتو پاستور ایران انجام شد. مواد مصرفی در مطالعه از شرکت‌های مرک<sup>۱۹</sup> و سیگما آلدریش<sup>۲۰</sup> تهیه شد.

### آماده‌سازی لیپوزوم

برای این منظور از نسبت‌های مولی مختلف DSPC<sup>۲۱</sup>، کلسترول در حضور ائوزین B برای تشکیل لیپوزوم استفاده شد. کل لیپید (DSPC و کلسترول) مصرف‌شده (۲۲/۴ میلی‌مولار) به فلاسک ته گرد و محلول در ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم منتقل شد. دمای چرخشی برای تبخیر حلال ۶۰ درجه سانتیگراد و ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه است تا یک لایه نازک از کل لیپیدها در دیواره داخلی ظرف تشکیل شود. برای

مالاریا<sup>۱</sup> یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی است که به علت شیوع بالا و پیچیدگی چرخه زندگی عامل مولد آن، از مشکلات اصلی سلامت و اقتصاد مناطق فقیر جهان محسوب می‌شود (۱). بعد از حدود ۱۰۰ سال پس از استفاده از داروهای ضد مالاریا، هنوز این بیماری ریشه‌کن نشده است. از مهم‌ترین علل پیچیدگی کنترل مالاریا خواص فیزیکوشیمیایی<sup>۲</sup> داروها (مانند انحلال‌پذیری و پایداری دارو)، فارماکوکینتیک<sup>۳</sup> (مانند جذب و توزیع زیستی)، فارماکودینامیک<sup>۴</sup> (مانند قدرت و اثربخشی) و خواص سم‌شناسی داروهای موجود و در حال ظهور است (۲، ۳). لیپوزوم‌های دارویی با طراحی مناسب می‌توانند بر برخی از این مشکلات غلبه کنند. لیپوزوم‌ها<sup>۵</sup> به دلیل زیست تخریب‌پذیری، روش آماده‌سازی ساده و تطبیق‌پذیری، مطالعه‌شده‌ترین نانوسیستم‌های دارویی برای درمان و پیشگیری از مالاریا هستند (۴، ۵). علاوه بر این، لیپوزوم‌ها قابلیت کپسوله کردن یک یا چند داروی ضد مالاریا را روی سطح (از طریق فعل و انفعالات الکترواستاتیک)، در دولایه لیپیدی (برای داروهای چربی‌دوست<sup>۶</sup>) یا در هسته آبی خود (برای داروهای آب‌دوست<sup>۷</sup>) دارند (۶). به‌طور کلی کپسوله‌سازی داروهای ضد مالاریا در لیپوزوم‌های معمولی، کارایی آن‌ها را در بدن در برابر بیماری بهبود می‌بخشد. اکثر مطالعات مربوط به لیپوزوم‌های ضد مالاریا، مرحله گلبول قرمز مالاریا را هدف قرار می‌دهند. با این وجود، باید توجه داشت که فرآیندهای اندوسیتیک<sup>۸</sup> بسیار ضعیف گلبول‌های قرمز و عدم انتخاب هدف در مورد گلبول‌های قرمز آلوده و غیر آلوده به انگل بر روند درمان تأثیر منفی می‌گذارد. سیستم‌های دارورسانی لیپوزوم که برای درمان مالاریا اعمال می‌شوند، رشد انگل را به میزان بیشتری مهار می‌کنند و توسعه سویه‌های انگل مقاوم را به حداقل می‌رسانند. علاوه بر این، وزیکول‌های لیپوزومی<sup>۹</sup> تزریقی، داروهای جدید قوی ضد مالاریا را با دقت بهتری به گلبول‌های قرمز آلوده به انگل می‌رسانند (۷).

با استفاده از روش‌های داکینگ مولکولی<sup>۱۰</sup> که جهت‌گیری ترجیحی یک مولکول به مولکول دیگر را

11. Eosin B  
12. Toxoplasma gondii  
13. Leishmania Major  
14. Half maximal inhibitory concentration (IC50)  
15. Plasmodium berghei  
16. Gimsa  
17. Plasmodium falciparum  
18. Lactate dehydrogenase  
19. Merck  
20. Sigma Aldrich  
21. Distearoylphosphatidylcholine

1. Malaria  
2. Physicochemical properties  
3. Pharmacokinetic  
4. Pharmacodynamics  
5. Liposomes  
6. Lipophile  
7. Hydrophile  
8. Endocytic Pathway  
9. Liposomal Vesicle  
10. Molecular docking

محلول ۷ درصد توئین ۸۰ و اتانول ۳ درصد به عنوان حامل دارو (DV<sup>۲۷</sup>) استفاده شد. ۱۶۰ میلی گرم ائوزین B در ۱ میلی لیتر حامل دارو حل شد تا محلول استوک حاصل شود. ۱۰۰ میکرولیتر از استوک رقیق نشده برای تهیه دوز ۷۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد و سپس دوزهای ۳۸۷، ۱۹۳، ۹۶ و ۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شدند. چهار دوز از هر یک از داروها به صورت داخل صفاقی (IP<sup>۲۸</sup>) به هر گروه از موشها تجویز شد. تعداد موشهایی که به عنوان گروه شاهد و گروه اصلی در نظر گرفته شدند، ۱۰ عدد و با وزن متوسط ۲۰ گرم بودند. ۴۰ میلی گرم CQ<sup>۲۹</sup> در ۵ میلی لیتر DV حل شد تا محلول تزریقی حاوی ۸ میلی گرم بر میلی لیتر CQ به دست آید. ۱۰۰ میکرولیتر به صورت داخل صفاقی تزریق شد و چهار دوز به صورت داخل صفاقی (IP) به هر گروه از موشها تجویز شد.

#### تست سرکوب کننده ۴ روزه پیترز<sup>۳۰</sup>

آزمایش سرکوبی ۴ روزه پیترز پس از تعیین درصد انگل خونی با بررسی میکروسکوپی فیلمهای خونی رنگ آمیزی شده با گیمسا که در روز چهارم و دو بار در هفته تا روز سیام یا مرگ حیوان گرفته شده بود، روی موشهای فوق الذکر انجام شد (۱۰). تفاوت در درصد پارازیتمی بین گروههای تحت درمان و حیوانات درمان نشده با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه با استفاده از GraphPad Prism 6 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوتها در سطح (P < ۰/۰۵) معنی دار در نظر گرفته شد. علاوه بر این، تفاوت بین مقدار میانگین گروه کنترل (در نظر گرفته شده به عنوان ۱۰۰ درصد) و گروههای تست به عنوان درصد کاهش فعالیت با استفاده از معادله زیر بیان می شود:

$$\text{Growth inhibition \%} = \frac{\text{Parasitemia in control} - \text{parasitemia in test}}{\text{parasitemia in control}}$$

#### کشت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم

انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم سویه ۳ (D7) School of Tropical Medicine, London در ۷ میلی لیتر محیط کشت کامل RPMI ۱۶۴۰ با سرم ۰/۵٪، هماتوکریت ۱۰٪، هیپوگزانترین ۰/۱ mM و جنتامایسین ۵۰ mg/L در فلاسک ۷۵ میلی لیتری با استفاده از روش Trager & Jensen کشت داده شد (۱۱). تعویض محیط کشت هر ۴۸ ساعت انجام شده

هیدراتاسیون<sup>۲۲</sup>، ۶ میلی لیتر محلول استات کلسیم ۱۲۰ میلی مولار (pH 7.3) به لایه نازک لیپیدها اضافه شد و هیدراتاسیون لیپید توسط اوپراتور چرخشی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. سپس برای حذف استات کلسیم اضافی توسط غشای دیالیز، فرمولاسیون به مدت ۱۸ ساعت در محیط دیالیز MES-HBSS (بافرهایی که در نسبت ۵۰:۵۰ با pH 6 به عنوان محیط دیالیز مخلوط شده بودند) در دمای ۴ درجه سانتی گراد هم زده شدند. در نهایت، سوسپانسیون حاصل با ۱ میلی لیتر ائوزین B و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر مخلوط گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور چرخشی<sup>۲۴</sup> با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۱۰).

#### کشت انگل پلاسمودیوم برگئی

سویه پلاسمودیوم برگئی هافکین<sup>۲۵</sup> جهت کشت در موشهای NMRI استفاده شد. برای ذخیره سازی انگل در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد از محلول السور<sup>۲۶</sup> شامل گلوکز ۲،۳۳ درصد، سدیم کلرید ۰،۵۲۵ درصد و سیترات سدیم ۱ درصد در آب دیونیزه و گلیسرول (۱:۹ V/V) استفاده شد. دوز آلوده کننده شامل ۱ میلیون RBC آلوده در ۰،۲ میلی لیتر بود که با تزریق داخل صفاقی به موشها اعمال شد.

#### نگهداری حیوانات

موشهای مورد مطالعه موش سفید نژاد NMRI با سن ۷ هفته و وزن ۲۵±۳ گرم بود. نگهداری از حیوانات و پروتکل های مورد استفاده مورد تأیید کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران است. هر گروه متشکل از پنج موش بود که در قفسهای پلاستیکی تحت شرایط آزمایشگاهی استاندارد دما (درجه سانتی گراد)، رطوبت (۵۰ تا ۶۰ درصد) قرار گرفتند و در رژیم غذایی پلت تجاری موجود نگهداری شدند. تغییرات انگل در خون با بررسی میکروسکوپی گسترش خونی نازک رنگ آمیزی شده با گیمسا به دست آمده از ورید دم بررسی شد.

#### تهیه داروها

محلولی از ۷۰ درصد توئین ۸۰ و اتانول ۳۰ درصد تهیه شد و با ده برابر آب مقطر استریل رقیق گردید. این

22. Hydration
23. Calcium acetate
24. Shaker Incubator
25. P. berghei Haffkine
26. Alsever Solution

27. Drug Vehicle

28. Intraperitoneal

29. Chloroquine

30. Peters 4-day suppression test

درمان نشده با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه با استفاده از GraphPad Prism 6, version 5.11 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت‌ها در سطح  $(P < 0.05)$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### ملاحظات اخلاقی

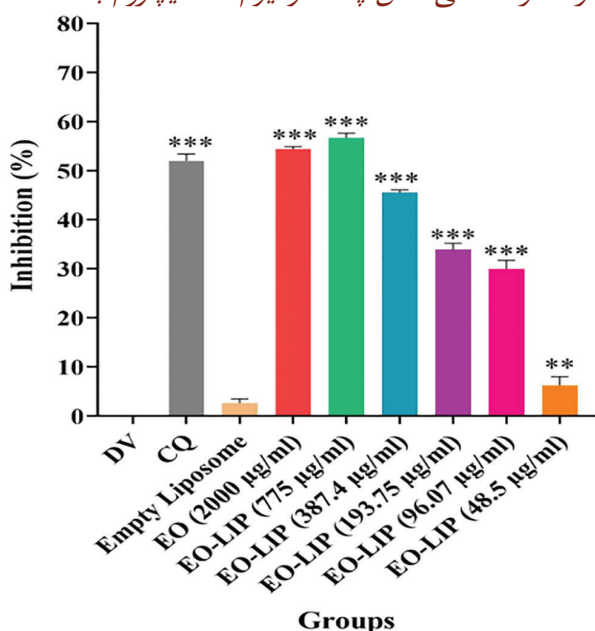
کلیه ملاحظات اخلاقی در هنگام کار با نمونه حیوانی در این مطالعه طبق دستورالعمل‌های استاندارد انستیتو پاستور ایران رعایت گردیده است و این تحقیق از کد اخلاق با شناسه IR.PII.REC.1395.102 دریافت نموده است.

### یافته‌ها

#### اثرات ضد انگلی

نتایج ارائه شده در (شکل ۱) نشان می‌دهد که انگل پلاسمودیوم بالاترین درصد مهار رشد را در حضور داروی لیپوزومی با غلظت ۷۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارد و این میزان بازداری به‌طور قابل توجهی بیشتر از اتوزین B آزاد و لیپوزوم خالی است. شکل ۱ همچنین تأیید می‌کند که رشد انگل در حضور لیپوزوم‌های خالی به‌طور قابل توجهی مهار نشده است، بنابراین لیپوزوم‌ها سمی نیستند و فقط در انتقال دارو به پلاسمودیوم نقش دارند. داده‌های به دست آمده در این شکل ۱ برای مقایسه بیشترین بازداری در مقایسه با کلروکین نشان داده شده‌اند.

#### درصد زنده‌مانی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم با استفاده



شکل ۱. درصد مهار رشد انگل پلاسمودیوم (Means±SEM و  $P < 0.001$ ) در لیپوزوم بارگذاری شده با اتوزین (EO-LIP) B، اتوزین B آزاد (EO)، لیپوزوم خالی و کلروکین (CQ).

و فلاسک‌ها در دمای  $36.5^{\circ}\text{C}$  در اتمسفری شامل ۵٪  $\text{CO}_2$ ، ۵٪  $\text{O}_2$  و ۹۰٪  $\text{N}_2$  نگهداری شدند.

#### تعیین درصد زنده‌مانی انگل‌ها بعد از تست دارو از طریق تست کلریمتری آنزیم PLDH<sup>31</sup>

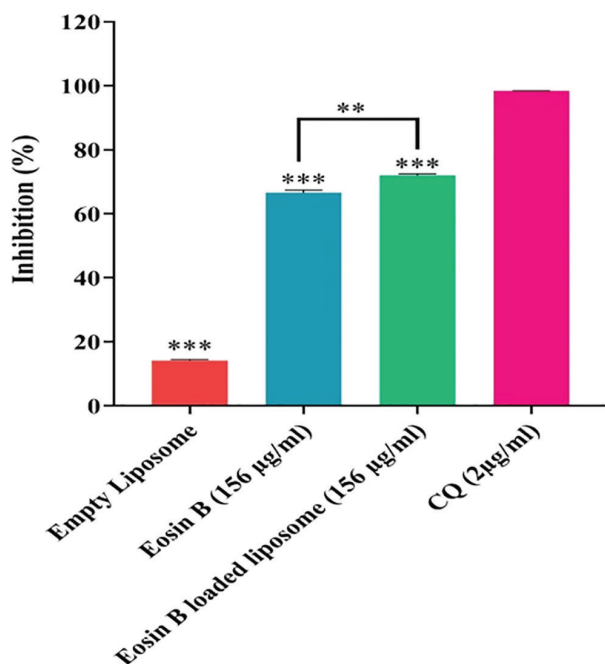
آنزیم لاکتات دهیدروژناز انگل (PLDH) نسبت به آنزیم انسانی (hLDH) ۳۰۰ مرتبه فعالیت بیشتری با APAD+ دارد. با به دست آوردن این مزیت کینتیکی، Makler و Hinrichs سنجش مالستات را برای تشخیص اختصاصی PLDH توسعه دادند. در این سنجش PLDH در یک نمونه خونی آلوده لیز شده باعث اکسایش لاکتات به پیرووات و درعین حال کاهش APAD+ به APAD می‌گردد. APADH سپس باعث کاهش (احیاء) نایتروبلو تترازولیوم (NBT) به یک ترکیب دی فورمازان آبی با کمک فنازین اتوسولفات (PES) می‌گردد. پیشرفت واکنش در ۶۵۰ نانومتر بررسی می‌شود. این سنجش به‌طور مکرر جهت برآورد کردن قابلیت زیستی انگل در سنجش حساسیت دارویی به کار گرفته می‌شود زیرا نشان داده شده است که فعالیت (PLDH) به‌طور نزدیک با پارازیتی ارتباط دارد (۱۱).

در اینجا انگل‌ها به‌منظور تعیین درصد پارازیتی همراه با غلظت‌های مختلف دارو و همچنین اریتروسیت‌های غیر آلوده و محیط کشت فاقد انگل به یک پلیت ۹۶ خانه اضافه شدند. درصد زنده‌مانی انگل‌ها به روش اسپکتروفتومتری با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز انگل و مطابق با متد Makler و Hinrichs تعیین گردید. مطابق این متد ۱۰۰ میکرولیتر شناساگر مالستات - شامل محلول ۱۱/۰ حجمی، Triton-100 لیتیم L- لاکتات ۷/۱۱۵ میلی مولار، تریس ۲۷/۳۰ میلی مولار، ۳- استیل پیریدین آدنین دی نوکئوتاید (APAD) با pH ۹ تنظیم شده با هیدروکلریک اسید ۱ مولار - با ۲۵ میکرولیتر PES/NBT شامل نایتروبلو تترازولیوم کلراید ۹۶/۱ و فنازین اتوسولفات ۲۴/۰ میلی مولار مخلوط شد. برای اسپکتروفتومتری حجم ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی پارازیت با شناساگرها مخلوط شدند و چگالی نوری (OD) توسط دستگاه میکروپلیت ریدر مدل BioTek PowerWave XS در طول موج ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۱).

#### تجزیه و تحلیل آماری

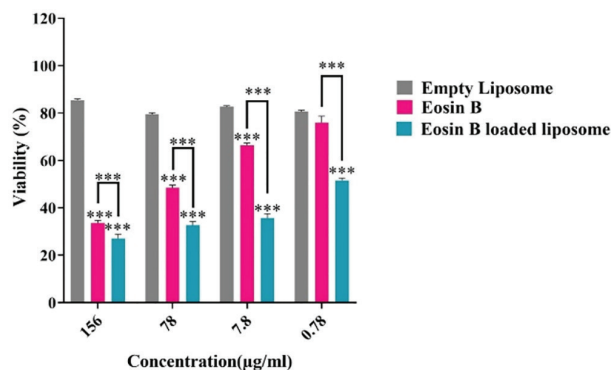
تفاوت در گروه‌های تحت درمان و حیوانات

31. Plasmodium lactate dehydrogenase



شکل ۳. بررسی و مقایسه‌ای اثر ۴ گروه شامل لیپوزوم بلانک، ائوزین لیپوزومه، ائوزین آزاد و کلروکوئین در بالاترین رقت مورد مطالعه بر میزان بازدارندگی زیستی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط برون‌تنی با استفاده از تست لاکتات دهیدروژناز و اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۵۰ نانومتر (Means±SEM و  $P < 0.001$ ).

بوده‌اند (۱۲). اخیراً نشان داده شده است که ائوزین B یک اثر گامتوسیتوسیدی<sup>۳۶</sup> بر پلاسمودیوم فالسیپاروم<sup>۳۷</sup> در شرایط برون‌تنی دارد (۱۳). پیشتر ائوزین B در ترکیب با داروهای استاندارد ضد مالاریا در شرایط آزمایشگاهی روی پلاسمودیوم فالسیپاروم و در داخل بدن روی موش‌های آلوده به پلاسمودیوم برگئی آزمایش شده است و یک اثر هم‌افزایی معنی‌دار با سولفادوکسین<sup>۳۸</sup> پیریمتامین<sup>۳۹</sup> مشاهده شده است. مکانیسم اثر سولفادوکسین-پیریمتامین، مهار عمل دو آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز<sup>۴۰</sup> و دی هیدروپتروات سنتاز<sup>۴۱</sup> است که در مسیر بیوسنتزی فولات انگل مهم هستند. ائوزین B در مطالعات پیشین، هم‌افزایی قوی با دو دارو، سولفادوکسین-پیریمتامین و آرتسونات<sup>۴۲</sup> و هم‌افزایی نسبتاً مناسبی با کلروکین نشان داده است. (۱۴). رنگ آزمایشگاهی دیگری که مورد مطالعه قرار گرفته است متیلن بلو<sup>۴۳</sup> است که در آن آزمایش‌های بالینی در ترکیب با کلروکین نسبت به زمانی که کلروکین به تنهایی استفاده می‌شد شکست‌های درمانی کمتری نشان داد (۱۵ و ۱۶). از سوی دیگر، ائوزین B فعالیت ضد مالاریای انتخابی قوی در



شکل ۲. بررسی و مقایسه اثر ۳ گروه بلانک لیپوزوم، ائوزین و ائوزین لیپوزومه بر میزان قابلیت زیستی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در شرایط برون‌تنی با استفاده از تست لاکتات دهیدروژناز و روش اسپکتروفتومتری (Means±SEM و  $P < 0.001$ ).

### از تست لاکتات دهیدروژناز

بررسی نتایج حاصل از تست لاکتات دهیدروژناز و اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۵۰ نانومتر در ۴ رقت مختلف از ۳ گروه بلانک لیپوزوم، ائوزین و ائوزین لیپوزومه نشان داد که علیرغم عدم تأثیر لیپوزوم بلانک بر انگل پلاسموریوم در مرحله رینگ، در تمام رقت‌ها ائوزین لیپوزومه به شکل معنی‌دار نسبت به داروی آزاد، سبب کاهش قابلیت زیستی انگل در مرحله رینگ شده است (شکل ۲).

بررسی نتایج حاصل از تست لاکتات دهیدروژناز و اسپکتروفتومتری<sup>۳۲</sup> در طول موج ۶۵۰ نانومتر در بالاترین رقت از ۴ گروه لیپوزوم تنها<sup>۳۳</sup>، ائوزین، ائوزین لیپوزومه و کلروکوئین، نشان داد که وقتی میزان بازدارندگی داروی کلروکوئین ( $\mu\text{g/ml}$ ) به عنوان کنترل مثبت بر انگل در مرحله رینگ حدود ۹۸٪ بود، لیپوزوم بلانک کمترین تأثیر را در بازدارندگی انگل داشت و داروی لیپوزومه نیز در مقایسه با داروی آزاد، در رقت ۱۵۶  $\mu\text{g/ml}$  که بالاترین رقت مورد بررسی بود، به شکل معنی‌دار سبب بازدارندگی بیشتر بر انگل پلاسمودیوم در مرحله رینگ شده است (شکل ۳).

### بحث

ائوزین B یک رنگ آزمایشگاهی است که ایمنی آن توسط سازمان غذا و دارو تأیید شده است. موش‌ها با مصرف تا ۲ درصد از آن در رژیم غذایی روزانه، هیچ نوع سمیت ائوزین B از خود نشان ندادند. همچنین یک دوز واحد یا حتی دوزهای متناوب ائوزین B با رشد بلاستوسیست<sup>۳۴</sup> در جنین موش تداخلی ندارد و دوزهای تا ۱۵۰ نانومولار برای سلول‌های هلا<sup>۳۵</sup> در شرایط آزمایشگاهی غیرسمی

36. Gametocide

37. Plasmodium falciparum

38. Sulfadoxine

39. Pyrimethamine

40. Dihydrofolate reductase (DHFR)

41. Dihydropteroate synthase (DHPS)

42. Artesunate

43. Methylene blue

32. Spectrophotometry

33. Blank Liposomes

34. Blastocyst

35. Hela cells

به دارورسانی بالاتر لیپوزوم‌های برگیری شده با ائوزین B در نظر گرفت. همچنین مشاهده شد که درصد مهار توسط ائوزین لیپوزومه ۷۷۵  $\mu\text{g/ml}$  نسبت به داروی استاندارد کلروکین نیز با توجه به سازوکار متفاوت ائوزین B و کلروکین در برابر پلاسمودیوم برگئی قابل توجه است.

### محدودیت‌های پژوهش

این مطالعه روی انگل پلاسمودیوم برگئی و پلاسمودیوم فالسیپاروم انجام شد. نظر به این که ممکن است سویه‌های خاص انگل بر اساس مقاومت به دارو نتایج متفاوتی از خود نشان دهند، انجام بررسی بیشتر روی سایر سویه‌های انگل می‌تواند نتایج دقیق‌تری به دست دهد، همچنین تکنیک‌های مورد استفاده برای تهیه لیپوزوم‌های حامل دارو نیز باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

### نتیجه‌گیری

جهت افزایش کارایی داروهای ضد مالاریا در مدل‌های درون تنی استفاده از لیپوزوم‌های حاوی دارو، یکی از روش‌های مناسب است و دارورسانی را به نحو قابل توجهی افزایش می‌دهد. استفاده از لیپوزوم‌های حاوی ائوزین B می‌تواند سبب کاهش دوز داروی اعمال‌شده در مالاریای موشی ناشی از پلاسمودیوم برگئی گردد. این روش، کارایی دارو را حتی نسبت به دوزهای قابل تحمل کلروکین در برابر انگل افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد با توجه به ایمن بودن ائوزین B، لیپوزوم‌های حاوی ائوزین B می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسبی در درمان بیماری در انسان نیز در نظر گرفته شوند و در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرند.

### تشکر و قدردانی

از بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران جهت تأمین مالی این تحقیق قدردانی می‌گردد.

### تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

برابر سویه‌هایی دارد که به این داروهای استاندارد مقاوم هستند؛ بنابراین، مقاومت ائوزین B به درمان‌های مرسوم نشان می‌دهد که می‌توان از آن به‌عنوان یک ترکیب اولیه برای توسعه داروهای جدید ضد مالاریا استفاده کرد.

مطالعات نشان داده‌اند ائوزین B به‌عنوان یک داروی ضد مالاریا برای پلاسمودیوم فالسیپاروم با میانگین  $IC_{50}$  124 نانومولار شناسایی شده است. تفاوت بین سطوح  $IC_{50}$  ائوزین B در ارگان‌های مختلف به دلیل محل هدف انگل‌های مختلف است. پلاسمودیوم فالسیپاروم به گلبول‌های قرمز بالغ حمله می‌کند، درحالی‌که توکسوپلازما گوندی<sup>۴۴</sup> در سلول‌های هسته‌ای تکثیر می‌شود؛ بنابراین تصور می‌شود که دسترسی نسبتاً مستقیم ائوزین B به انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در گلبول‌های قرمز آسان باشد. ائوزین B هنگامی که وارد انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم می‌شود باعث آسیب گسترده به غشای انگل، واکوئل گوارشی و میتوکندری می‌شود (۷). درمان مؤثر مالاریا در حال حاضر به دلیل عوارض جانبی سمی داروها و گسترش مقاومت به رژیم‌های دارویی فعلی محدود شده است. کپسوله کردن عوامل درمانی در داخل لیپوزوم‌ها می‌تواند به‌طور مطلوب دوز داروها را در بدن تغییر، و به‌طور قابل توجهی عوارض جانبی سموم ناخواسته را کاهش دهد. همچنین این روش می‌تواند خطر مقاومت دارویی را کاهش و کارایی درمان را افزایش دهد (۱۷). مطالعات اولیه نشان داده است که لیپوزومه شدن عامل ضد مالاریای کلروکین حداکثر دوز قابل تحمل خود را افزایش می‌دهد و اثربخشی آن را در برابر عفونت‌های مالاریای موش نسبت به کلروکین به‌تنهایی افزایش می‌دهد (۱۸، ۱۹). علاوه بر این، در یک مطالعه، توانایی افزایش دوزهای کلروکین در هر تزریق پس از کپسوله کردن لیپوزوم امکان درمان موفقیت‌آمیز را برای عفونت با پلاسمودیوم برگئی مقاوم به کلروکین که با یک دوره ۷ روزه با حداکثر دوز قابل تحمل آزاد قابل درمان نبود، فراهم کرد (۱۹). در مطالعه حاضر ائوزین B لیپوزومه با غلظت ۷۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان ۵۷ درصد مهار رشد انگل را نشان می‌دهد که در برابر ۵۵ درصد مهار انگل توسط غلظت ائوزین B تنها نشان‌دهنده کاهش چشمگیر غلظت لازم جهت مهار انگل است. این افزایش کارایی دارو را می‌توان

44. *Toxoplasma gondii*

### منابع

1. Organization WH. World Malaria reports 2020–20 years of global progress and

challenges. Geneva: World Health Organization; 2020.

2. Fujioka H, Aikawa M. Structure and life cycle. *Chem Immunol.* 2002;80:1-26.
3. Anamika J, Nikhar V, Laxmikant G, Priya S, Sonal V, Vyas SP. Nanobiotechnological modules as molecular target tracker for the treatment and prevention of malaria: options and opportunity. *Drug Deliv Transl Res.* 2020;10(4):1095-110.
4. Crommelin DJA, van Hoogevest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *J Control Release.* 2020;318:256-63.
5. Suresh M, Jeevanandam J, Chan YS, Danquah MK, Kalaiarasi J. Opportunities for metal oxide nanoparticles as a potential mosquitocide. *Bionanoscience.* 2020;10(1):292-310.
6. Rajendran V, Singh C, Ghosh PC. Improved efficacy of doxycycline in liposomes against *Plasmodium falciparum* in culture and *Plasmodium berghei* infection in mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(11):1145-52.
7. Raza M, Bharti H, Singal A, Nag A, Ghosh PC. Long circulatory liposomal maduramicin inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* blood stages in culture and cures murine models of experimental malaria. *Nanoscale.* 2018;10(28):13773-91.
8. Atreya CE, Johnson EF, Irwin JJ, Dow A, Massimine KM, Coppens I, et al. A molecular docking strategy identifies Eosin B as a non-active site inhibitor of protozoal bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14092-100.
9. Zamani Z, Tafreshi AS, Nahrevanian H, Lame-Rad B, Pourfallah F, Eslamifar H, et al. Efficacy of eosin B as a new antimalarial drug in a murine model. *Malar Res Treat.* 2012;2012:381724.
10. Najafzadeh M, Bakhshandeh H, Zamani Z, Movahedi M, Atyabi SM. Preparation, characterization, and evaluation of eosin B-loaded nano-liposomes for growth inhibition of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* 2022;121(1):383-93.
11. Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(2):205-10.
12. Massimine KM, McIntosh MT, Doan LT, Atreya CE, Gromer S, Sirawaraporn W, et al. Eosin B as a novel antimalarial agent for drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):3132-41.
13. Sadeghi Tafreshi A, Zamani Z, Sabbaghian M, Khavari-Nejad RA, Arjmand M, Sadeghi S, et al. A Metabolomic Investigation of the Effect of Eosin B on Game-toocyte of *Plasmodium falciparum* Using 1HNMR Spectroscopy. *Iran J Parasitol.* 2019;14(4):592-603.
14. Sadeghi S, Valadkhani Z, Tafreshi AS, Arjmand M, Nahravanian H, Vahabi F, et al. A Study of Synergy of Combination of Eosin B with Chloroquine, Artemisinin, and Sulphadoxine-Pyrimethamine on *Plasmodium falciparum* In Vitro and *Plasmodium berghei* In Vivo. *J Trop Med.* 2020;2020:3013701.
15. West African Network for Clinical Trials of Antimalarial D. Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *Lancet.* 2018;391(10128):1378-90.
16. Tiwari S, Goyal AK, Mishra N, Khatri K, Vaidya B, Mehta A, et al. Development and characterization of novel carrier gel core liposomes based transmission blocking malaria vaccine. *J Control Release.* 2009;140(2):157-65.
17. Peeters PA, Huiskamp CW, Eling WM, Crommelin DJ. Chloroquine containing liposomes in the chemotherapy of murine malaria. *Parasitology.* 1989;98 Pt 3:381-6.
18. Ismail M, Ling L, Du Y, Yao C, Li X. Liposomes of dimeric artesunate phospholipid: A combination of dimerization and self-assembly to combat malaria. *Biomaterials.* 2018;163:76-87.
19. Moles E, Urban P, Jimenez-Diaz MB, Viera-Morilla S, Angulo-Barturen I, Busquets MA, et al. Immunoliposome-mediated drug delivery to *Plasmodium*-infected and non-infected red blood cells as a dual therapeutic/prophylactic antimalarial strategy. *J Control Release.* 2015;210:217-29.