

## *Cellulose in Acanthamoeba Cyst Wall: A Drug Target for Acanthamoeba Infection Treatment*

Samira Dodangeh<sup>1</sup>,  
Mahdi Fakhar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Parasitology and Mycology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 18, 2016 ; Accepted September 17, 2016)

### **Abstract**

*Acanthamoeba* is a free-living amoeba that is an opportunistic pathogen of humans and animals. Its prognosis is potentially poor that requires fast diagnosis and successful treatment. There are two phases in its life cycle: an active trophozoite form and the double-walled resistant cyst. This amoebic genus is the causative agent of two severe diseases in humans: *Acanthamoeba* keratitis (AK) and fatal granulomatous amoebic encephalitis (GAE). *Acanthamoeba* cysts almost remain viable after treatments and lead to serious and frequent recurrence of infection. Resistance of the double walled cysts is mainly due to cellulose molecules presented in the inner layer of the cysts. Thus, cellulose degradation or inhibiting the cellulose synthesis offers a potential strategy for effective treatment of *Acanthamoeba*. In this non-systematic review we aimed at providing an overview of the cellulose structure, its role in skeletal structure and also physicochemical activity of the protozoa and present it as new drug target for the treatment of amoebic infection. Overall, the degradation of the cyst wall will make amoeba susceptible to chemotherapeutic drugs, and at least inhibition of *Acanthamoeba* excystment, consequently it prevents the recurrence of infection. Furthermore, cellulose synthesis inhibitors cause current drugs to affect on *Acanthamoeba* in lower time and concentrations. Therefore, using compounds or drugs that inhibit the synthesis of cellulose can be a new treatment for amoebic infections.

**Keywords:** *Acanthamoeba*, cyst wall, cellulose, drug target

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 182-191 (Persian).

# سلولز موجود در دیواره کیست آکانتامبا: یک هدف دارویی برای درمان عفونت آکانتامبایی

سمیرا دودانگه<sup>۱</sup>مهدی فخار<sup>۲</sup>

## چکیده

آکانتامبا آمیب آزادی و از پاتوژن‌های فرصت طلب برای انسان‌ها و حیوانات است. پروگنوز آن به شدت ضعیف است و نیاز به تشخیص سریع و درمان موفقیت آمیز دارد. دو فاز در چرخه زندگی آن وجود دارد: فرم تروفوزوئیت فعال و کیست دو جداره مقاوم. این جنس آمیب عامل دو بیماری در انسان است: کراتیت آکانتامبائی و آنسفالیت آمیبی گرانولوماتوز. کیست‌های آکانتامبا اغلب بعد از درمان زنده می‌مانند و منجر به عودهای جدی و مکرر عفونت می‌شوند. مقاومت کیست‌های دو جداره اساساً به دلیل مولکول‌های سلولز حاضر در دیواره داخلی کیست‌هاست. بنابراین تخریب سلولز یا مهار سنتز سلولز، یک استراتژی بالقوه در درمان مؤثر آکانتامبا پیشنهاد می‌شود. در این مطالعه مروری غیرنظامی، سعی داریم با مروری بر ساختار سلولز، نقش آن را در ساختار اسکلتی و همچنین فعالیت‌های فیزیوشیمیایی این تک یاخته به عنوان تارگت جدید دارویی جهت درمان عفونت‌های آکانتامبایی معرفی نماییم. در مجموع تخریب دیواره سلولز، آمیب را حساس به داروهای شیمیایی خواهد ساخت و حداقل مانع آنکیسته شدن (encystment) آکانتامبا می‌شود، بنابراین از عود عفونت جلوگیری می‌نماید. علاوه بر این، مهارکننده‌های سلولز منجر می‌شوند که داروهای رایج علیه آکانتامبا در غلظت و زمان پایین‌تر از حد معمول اثر نمایند. بنابراین استفاده از ترکیبات یا داروهایی که مانع سنتز سلولز شوند، می‌تواند روش درمانی جدید و مناسبی برای عفونت‌های آکانتامبایی باشند.

**واژه های کلیدی:** آکانتامبا، دیواره کیست، سلولز، تارگت‌های دارویی

## مقدمه

القا تبدیل تروفوزوئیت به کیست می‌شود، روندی که به آن آنکیسته شدن گفته می‌شود (۱). کیست فرم مقاوم تک یاخته محسوب می‌شود و تقریباً غیرفعال است. کیست دارای دیواره دو لایه‌ای ضخیمی است که شامل اکتوکیست (لامینار، لایه خارجی فیروز) و اندوکیست (فین، لایه داخلی فیبر) می‌باشد. این دیواره در مقاومت تک یاخته در برابر شرایط نامساعد نقش مهمی را بر عهده

آکانتامبا تک یاخته فرصت طلبی است که به طور وسیع در محیط پراکنده می‌باشد. در چرخه زندگی آکانتامبا دو شکل تروفوزوئیت و کیست وجود دارد. آمیب از باکتری‌هایی نظیر اشرشیاکلی و دیگر باسیل‌های گرم منفی تغذیه می‌کند. شرایط نامساعد محیطی و غذایی از جمله کمبود مواد غذایی، اسمولاریته بالا یا پایین، دما و pH بالا و پایین، تراکم زیاد سلول و داروها منجر به

E-mail: Mahdi53@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** مهدی فخار - ساری، کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

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

۲. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۷

دارد (۲). آکانتامبا مسئول دو بیماری مهم شامل آنسفالیت گرانولومایی آمیبی و کراتیت آمیبی است. آنسفالیت گرانولوماتوز آکانتامبایی عفونتی نادر، مزمن و پیشرونده سیستم اعصاب مرکزی بوده و غالباً منجر به مرگ می‌شود. کراتیت آکانتامبایی یک عفونت قرنیه با سیر مزمن است که می‌تواند تهدیدکننده بینایی باشد. این بیماری معمولاً طی چند هفته یا چند ماه با درد شدید قرنیه و تورم که از مشخصات آن است، پیشرفت می‌کند و اگر به درستی تشخیص و درمان نشود، منجر به نابینایی می‌شود (۳). ابتدا تصور می‌شد که این بیماری نادر است، ولیکن در حال حاضر اهمیت کراتیت آکانتامبایی در سلامت انسان مورد توجه بسیار قرار گرفته است. این موضوع به علت افزایش استفاده کنندگان لنزهای تماسی است. براساس مطالعه‌ای که طی ۱۰ سال توسط رضائیان و همکاران بر روی ۱۴۲ فرد مبتلا به کراتیت چشمی انجام شد، در ۳۴/۵ درصد موارد، انگل آکانتامبا عامل این بیماری عنوان شد (۴).

درمان عفونت آکانتامبایی مشکل می‌باشد. پیش‌آگهی خوب این عفونت، مستلزم تشخیص سریع همراه با درمان مناسب این عفونت است. اگرچه ترکیبات ضد میکروبی متعددی شامل عوامل موثر بر غشاء، مهارکننده‌های سنتز DNA و RNA یا بلوکه‌کننده‌های متابولیک در آزمایشات برون تنی (in vitro)، فعالیت آمیب‌کشی و کیست‌کشی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. یکی از ترکیبات غشاء که در مطالعه‌ای مورد بررسی قرار گرفت، ارگوسترول بود. ارگوسترول یکی از مهم‌ترین استرول‌ها در غشاء آکانتامبا می‌باشد. به همین دلیل، ترکیبات مختلف آزولی که بیوستنز ارگوسترولی را مورد هدف قرار می‌دهند، آزمایش شدند که شامل کتوکونازول، میکونازول و فلوکونازول بودند. عموماً اثرات ضد آکانتامبایی ترکیبات آزولی علیه ایزوله‌های بالینی بیش از این که خاصیت ضد ترفوزوئیت یا ضد کیست داشته باشند، خاصیت مهار بر روی رشد ترفوزوئیت‌ها دارند (۵). بر اساس مطالعات انجام شده، تاکنون هیچ دارویی به تنهایی بر روی تمام ایزوله‌های آکانتامبا مؤثر نبوده

است (۶). بنابراین ضرورت یافتن ترکیبات ضد آکانتامبایی جدید اهمیت ویژه‌ای داشته و باید در راستای چگونگی کنترل بیماری و عفونت در سطح مولکولی و فیزیولوژیکی صورت گیرد. لذا مطالعه حاضر، قصد دارد با مروری بر نقش سلولز در ساختار اسکلتی و هم‌چنین فعالیت‌های فیزیولوژیک این تک‌یاخته، تارگت جدید دارویی جهت درمان عفونت‌های آکانتامبایی را معرفی نماید.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مروری غیرنظاممند است. مقالات مورد استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی قابل دسترس نظیر (SID) Scientific Information Database، Google Scholar، Pubmed، ScienceDirect، IranMedex، Magiran و کتاب‌های مرجع آمیب‌های آزادی گردآوری شدند.

### خصوصیات کیست آکانتامبا

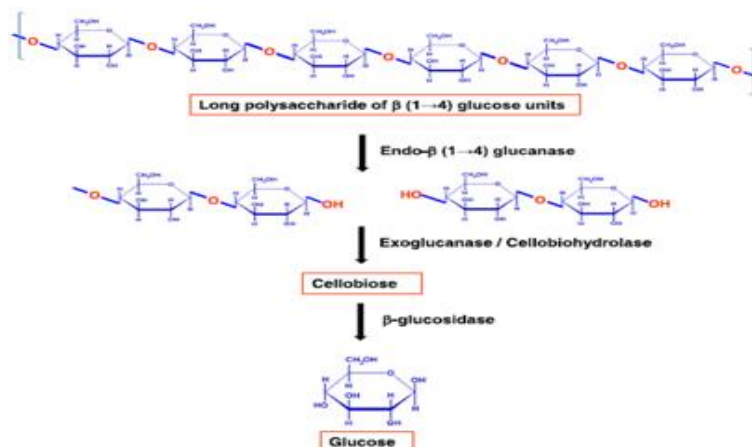
نگران‌کننده‌ترین جنبه عفونت‌های آکانتامبا، عود آن‌ها به دلیل شکست درمان و توانایی انگل برای تبدیل به فرم مقاوم کیست است. کیست‌ها، سلول‌های زنده و معلق در هوا هستند که قادرند عدم وجود مواد غذایی به مدت طولانی، ضد عفونی‌کننده‌ها، سرما و گرما را تحمل نمایند و بنابراین این نکته به انتشار آکانتامبا در محیط و یا انتقال این پاتوژن‌ها به میزبانان حساس کمک می‌نماید (۷). ماهیت انعطاف‌پذیر دیواره‌های کیست نشان‌دهنده حضور پلی‌ساکارید است. آنالیز کربوهیدرات دیواره کیست آکانتامبا کاستلانی (*Acanthamoeba castellanii*) با استفاده از کروماتوگرافی به دلیل حضور 4-linked-glucopyranose (۲۲ درصد)، حضور سلولز را تایید کرده است (۹۸). هم‌چنین Dudley و همکاران مهار آنکسیسته شدن آکانتامبا را در حضور 2-6 دی‌کلروبنزونیتریل (مهارکننده سنتز سلولز) مشاهده نمودند. علاوه بر این، وجود آنزیم‌های سنتز و تجزیه سلولز در آکانتامبا کاستلانی نشانگر حضور سلولز در دیواره‌های کیست

ترکیب مذکور منجر به تحریک تشکیل سلولز با استفاده از UDP-گلوکز (اوریدین دی فسفات گلوکز) می شود. شایان ذکر است که آدنوزین-۵-دی فسفات گلوکز (ADP-glucose)، تیمیدین-۵-دی فسفات گلوکز (TDP-glucose)، سیتیدین-۵-دی فسفات گلوکز (CDP-glucose) و گوانین-۵-دی فسفات گلوکز (GDP-glucose) قادر به جایگزینی UDP-glucose به عنوان دهنده گلوکز نیستند. مطلب مذکور مبین این است که در دسترس بودن UDP-glucose در طی آنکلیست شدن از فاکتورهای اصلی در بیوسنتز دیواره سلولی می باشد. بتاگلوکان سنتاز، تشکیل (۱ به ۴)  $\beta$  گلوکان را کاتالیز می نماید (۱۶). حدود ۳۰ مولکول منفرد سلولز به هم متصل می شوند و واحد بزرگ تری به نام فیبرهای ابتدایی (پروتوفیبریل) را ایجاد می کنند و سپس واحد بزرگ تری به نام میکروفیبریل را منجر می شوند (۱۷). زنجیره ها در میکروفیبریل ها دارای پیوند هیدروژنی می باشند. پیوندهای هیدروژنی بین لایه های موازی متعدد سلولز، منجر به شکل گیری محکم میکروفیبریل می گردند. علاوه بر این، سلولز حاوی بی نظمی های متعددی در ساختار است که منجر به دهیدراته شدن سلولز توسط سلولاز در محیط آبی می شود (۱۵، ۲۰). به طور کلی سلولز بخشی از دیواره سلول در گیاهان، جلبک، باکتری ها، دیکتیوستلیوم و آمیب های آزادی مثل کیست آکانتامبا است.

این ارگانسیم است (۱۱، ۱۰). طبق مطالعات انجام شده مشاهده شده که در اولین ۴ ساعت آنکلیست شدن، میزان گلیکوژن فسفوریلاز افزایش یافته که منجر به تجزیه گلیکوژن ذخیره در آمیب می گردد و در نهایت گلوکز تبدیل به سلولز می شود. در مطالعه ای که توسط Trevisan انجام شد، پرایمر 8399/8400 در آکانتامبا کاستلانی و آکانتامبا پلی فاگا (*Acanthamoeba castellanii*) موجب تایید تکثیر گلیکوژن فسفوریلاز به روش RT-PCR گردید (۱۲). از این رو ماهیت محکم کیست های آکانتامبا به سلولز نسبت داده شده است، بنابراین سلولز می تواند به عنوان تارگت دارویی مناسبی مطرح باشد. قابل ذکر است که تخریب دیواره کیست، آمیب را مستعد به داروهای شیمیایی موجود خواهد ساخت.

#### سلولز

سلولز فراوان ترین پلیمر روی زمین است که ترکیب بزرگی از توده گیاهی است. هم چنین در مقادیر قابل توجهی توسط جلبک سبز، دیکتیوستلیوم، برخی باکتری ها، حیوانات دریایی و جانداران دیگر مثل تونیکات ها و غیره تولید می شود (۱۳، ۱۴). یک ویژگی استثنایی سلولز، ساختار کریستالی آن است. سلولز آکانتامبا، پلیمری از گلوکز می باشد و پلی مر تکرار شونده آن  $\beta$ -1,4 است (۱۵) (تصویر شماره ۱). گلوکز تجزیه شده از گلیکوژن ذخیره ای جهت تبدیل به گلوکز-۱- فسفات، توسط ATP فسفریله شده و نهایتاً

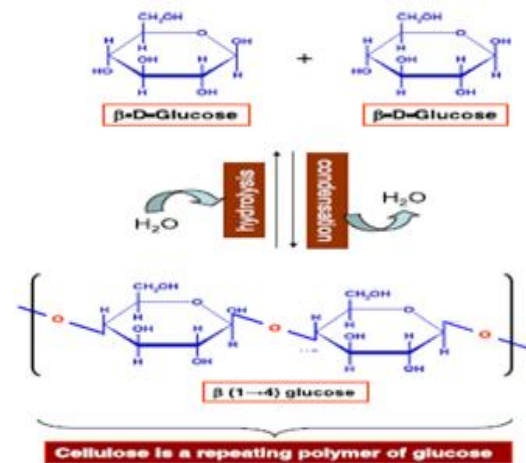


تصویر شماره ۱: بتا دی گلوکز واحد اصلی سلولز (ترکیب مهم اجزای دیواره داخلی کیست آکانتامبا) (۱۵)

## سلولز

تخریب سلولز توسط آنزیم‌های سلولاز صورت می‌گیرد. سلولاز مسئول هیدرولیز  $\beta$ -1,4 حاضر در گلوکز است (۱۹). با توجه به ساختار سلولز، هیدرولیز آن توسط یک آنزیم غیرممکن است. بنابراین سلولز توسط انواعی از آنزیم‌های فعال (حداقل ۳ نوع) از جمله اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز (سلودکستریناز یا سلویوهیدرولاز) و بتا گلوکوزیداز هیدرولیز می‌شود (۲۰، ۲۱، ۱۴). اثر اندوگلوکاناز بر روی سلولز، موجب ایجاد الیگوساکاریدهای با طول مختلف (زنجیره‌های جدید) می‌گردد (۲۱، ۱۴). علاوه بر این، آگزوگلوکاناز بر روی سلویوز و یا سلوگلیکوساکاریدها اثر می‌کند. این سلودکسترینازها و سلویوز در نهایت توسط بتاگلوکوزیداز به گلوکز تجزیه می‌شوند (۲۲) (تصویر شماره ۲).

هم‌چنین ساختار بیش تر سلولازها حاوی یک دومین باند شده با سلولز (CBD) و یک دومین کاتالیتیک (CD) است.



تصویر شماره ۲: اندوگلوکاناز بر روی سلولز و آگزوگلوکاناز (سلویوهیدرولاز) بر روی سلویوز اثر می‌کند. سلویوز توسط بتاگلوکوزیداز به گلوکز تجزیه می‌شود (۱۵)

## CBD

CBD، لایه در دسترسی توسط بی ثبات کردن ساختار سلولز، برای CD ایجاد می‌کند (۲۳، ۲۴). محل

اتصال CBD در یک زنجیره پلی‌پپتیدی می‌تواند C یا N ترمینال یا به طور مرکزی باشد (۲۵). CBDها در سلولازها توسط سکانس متصل کننده غنی از پرولین و تروئونین به CDها متصل می‌شوند (۲۶). آن‌ها برای آغاز و پردازش آنزیم‌ها به ویژه آگزوگلوکانازها مهم هستند. حذف CBD از واحد آنزیماتیک، فعالیت واحد آنزیمی را کاهش می‌دهد. علاوه بر این CBD برای سلویوهیدرولاز نقش اساسی دارد.

## CD

سلولازها در ۱۱ خانواده مختلف (۹-۱۲، ۳۰-۲۷) یافت می‌شوند (۱۴). از نظر تکامل خانواده ۹، سلولازهای قارچ‌ها، باکتری‌ها، حیوانات و گیاهان را شامل می‌شود. در مقابل خانواده ۷، فقط هیدرولازهای منشأ قارچی را شامل می‌گردد. در صورتی که خانواده ۸ فقط هیدرولازهای باکتری‌ها را موجب می‌گردد (۳۱).

## مکانیسم‌های تخریب سلولز

تاکنون حداقل چهار مکانیسم مختلف برای تخریب سلولز مطرح شده است:

سلولایزیز کمپلکس: اساساً برای میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی استفاده می‌شود (۳۲).

سلولایزیز بدون سلولازهای processive: این استراتژی حداقل دو سلولز مختلف، مثل *Cytophagahutchinsonii* (ارگانیسم سلولیتیک خاکی *Fibrobactersuccinogenes* (باکتری شکمبه‌ای بی‌هوازی) را تخریب می‌کند (۳۳).

سلولایزیز به وسیله آنزیم‌های نان هیدرولیتیک: در قارچ‌های رشته‌ای مشاهده شده است (۳۴).

سلولایزیز نان کمپلکس: غالباً در ارگانیسم‌های هوازی مشاهده شده است (۳۴). بهترین مثال، سلولاز قارچ *Trichoderma reesei* (۳۵) است، که شامل پنج اندوگلوکاناز EG2، EG1، EG5، EG4، EG3، دو آگزوگلوکاناز (CBH1، CBH2) و دو بتاگلوکوزیداز (BGL1، BGL2) می‌باشد (۳۶).

مکانیسم چهارم بسیار با اهمیت است، چرا که در مطالعه ای، از سلولاز کتزوگه شده *تریکودرما* رستی جهت تشخیص آکانتامبا استفاده شده و به نتایج رضایت بخشی دست یافتند (۳۷).

#### درمان شیمیایی آکانتامبا

درمان کنونی آنسفالیت گرانولوماتوز معمولاً به صورت ترکیبی و با استفاده از داروهایی شامل کتوکونازول، فلوکونازول، سولفادیازین، پنتامیدین ایزونیات، آموتریسین B، آزیترومایسین، ایتراکونازول همراه با ریفامپسین است که ندرتاً به پیش آگهی خوب منتهی می شوند (۳۸). درمان رایج بیماری کراتیت آمیبی در ایران استفاده از داروهای ترکیبی پروپامیدین ایزونیات (برولن ۰/۱ درصد) و کلرگزیدین ۰/۰۲ درصد است. از دیگر داروهای مورد استفاده در بیماری کراتیت آکانتامبایی، نئومایسین و پلی میکسین B می باشد (۳۹). داروهای مذکور دارای اثرات درمانی کمی هستند. هم چنین بعضی از ژنوتایپ های آکانتامبا به این داروها پاسخ مناسب نمی دهند و تنها نیمی از بیماران با استفاده از داروهای نامبرده بهبود می یابند (۴۰). لازم به ذکر است که طول درمان با داروهای نامبرده می تواند به بیش تر از شش ماه برسد (۴۱). اما پیش آگهی موفق و رضایت بخش عفونت های آکانتامبایی شدیداً به درمان سریع بیماری وابسته است.

#### مقاومت دارویی

به نظر می آید که مهم ترین دلیل درمان ناموفق عفونت آکانتامبایی، حضور کیست های دو جداره است که با ایجاد سد فیزیکی، مقاومت بالایی به داروهای موجود نشان می دهند. به علاوه، ترکیبات ضد میکروبی در غلظت های توصیه شده ممکن است علیه اشکال کیستی آمیب مؤثر نبوده که دلیل آن عدم تکثیر و یا فعالیت بسیار کم آن ها است. توانایی آکانتامبا در بروز مقاومت علیه داروهای موجود، نگرانی جدی در درمان موفق این عفونت است و بروز مقاومت به داروی

پروپامیدین ایزونیات در طول درمان نیز گزارش شده است (۴۲). از مکانیسم های احتمالی مقاومت دارویی می توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱- تبدیل دارو به اشکال غیر فعال توسط آنزیم

۲- ایجاد تغییر در ناحیه حساس دارو

۳- تغییر در نفوذپذیری دارو

۴- مسیرهای آلترناتیو در جهت ایجاد واکنش های مهارتی

۵- افزایش آنزیم هایی که دارو به آن ها حساسیت دارد.

اما در مجموع مکانیسم های مقاومت دارویی در آکانتامبا ناشناخته است (۴۲).

#### استفاده از حامل برای جابه جایی دارو در بدن

آزمایشی تحت این عنوان که آیا دی متیل سولفو کساید (DMSO) می تواند منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء کیست شود و به دنبال آن دارو با سهولت بیش تری وارد آمیب شده و نهایتاً سبب القا مرگ کیست شود، صورت گرفته است. هیچ کدام از سه داروی استاندارد یعنی پروپامیدین ایزونیات ۰/۱ درصد، نئومایسین ۱ درصد و میکونازول ۱ درصد در مواجهه با کیست های آمیب خاصیت کیست کشی قابل توجهی نداشتند. در مقابل، وقتی پروپامیدین ایزونیات با دی متیل سولفو کساید ۳۰ درصد ترکیب شد، خاصیت کیست کشی پیدا کرد. بر اساس این مطالعات به نظر می رسد که استفاده از حامل برای داروهای شناخته شده ضد آکانتامبایی می تواند به افزایش نفوذ آن ها به داخل کیست ارگانیزم که در حالت عادی به داروها مقاوم هست، منتهی شود. از آنجائی که در گذشته دی متیل سولفو کساید به صورت موضعی در چشم استفاده می شود و بی ضرر بودن آن نسبتاً ثابت شده است، لذا استفاده از ترکیب فوق می تواند درمان جدیدی برای این بیماری به ارمغان آورد (۴۳).

#### روش های مهار سلولز در آکانتامبا

در مطالعه ای Moon و همکاران در سال ۲۰۱۵ از 2,6-dichlorobenzonitrile (DCB) و isoxaben به

عنوان مهارکننده‌های سنتز سلولز، مانع آنکیسته شدن آکانتامبا شدند. در این مطالعه از داروی ترکیبی پلی‌هگزامتیلین بی‌گوآنید (PHMB) به همراه DCB و isoxaben استفاده نمودند و نتایج مبین این بود که این نوع داروی ترکیبی موجب از بین رفتن کیست‌های آکانتامبا در غلظت و زمان کم‌تر از معمول (PHMB به تنهایی) شد و حتی بر روی سلول‌های قرنیه اثر سمی نداشتند (۴۴). علاوه بر این Dudley و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز از داروی ترکیبی پنتامیدین ایزوتیونات و DCB علیه آکانتامبا استفاده نمودند و به نتایج رضایت‌بخشی دست یافتند (۴۵). نکته قابل‌تأمل این است که با تکمیل ژنوم آکانتامبا، ژن مسئول سنتز و تجزیه سلولز در آکانتامبا کاستلانی تشخیص داده شده است. با استفاده از این داده در مطالعه‌ای با استفاده از روشی به نام Down-Regulation سلولز، مانع از آنکیسته شدن آکانتامبا گردید (۴۶). لازم به ذکر است، بر اساس داده‌های سکانس، سلول‌های آکانتامبا کاستلانی شبیه به پروتئین‌های باکتریال می‌باشند و شامل هیدرولاز گلیکوزیل خانواده ۵ است (۴۷، ۲۷).

#### کایتوسان (ترکیب طبیعی)

کایتوسان، یک پلیمر طبیعی آب دوست و کاتیونی است که از حذف گروه‌های استیل کیتین در محیط بازی به دست می‌آید و از نظر ساختار، کیتین شباهت زیادی با سلولز دارد. کایتوسان به شکل‌های مختلف و با درجه‌های داستیلاسیون و وزن‌های مولکولی مختلف وجود دارد و با درجه خلوص بالا برای سیستم‌های حامل دارویی کاربرد دارد، به طوری که به عنوان یک حامل دارویی قرن بیست و یکم نام برده شده است. کایتوسان با درجه خلوص مناسب در سیستم‌های آزادسازی دارویی، همدیالیز، پوست مصنوعی، لنزهای تماسی، بانداژ چشمی، ارتوپدی، نخ جراحی و دندان پزشکی به عنوان یک ماده طبیعی غیر سمی برای انسان

و دارای سازگاری زیستی بالا به کار می‌رود (۴۹، ۴۸، ۲۸). فرضیات زیادی مبنی بر مکانیسم‌های ضد میکروبی کایتوسان بیان شده است. تداخل بین کایتوسان و غشا میکروب منجر به از هم گسیختگی غشا و خروج محتویات سلول به بیرون می‌گردد. هم‌چنین به‌طور غیر مستقیم سنتز DNA و RNA را مهار می‌کند (۲۹). کایتوسان خاصیت ضد میکروبی گسترده‌ای علیه سوش‌های گرم مثبت و گرم منفی باکتریایی و گونه‌های مختلف قارچ‌ها و انگل‌های کرمی و تک‌یاخته‌ای نشان داده است (۵۳-۴۹). هم‌چنین Rassu و همکاران در سال ۲۰۰۸ از کایتوسان به عنوان حامل داروی Rokitamycin (داروی ضد آکانتامبا) استفاده کردند و مشاهده نمودند که اثر ضد آکانتامبایی دارو به همراه کایتوسان افزایش یافت (۵۴). بنابراین با توجه به مطالعات وسیع انجام شده در خصوص خواص ضد میکروبی و ضد انگلی کایتوسان و از سوی دیگر مکانیسم اثر این ترکیب طبیعی و بیومولکول با تداخل در غشاء سلول می‌توان نتیجه گرفت که کایتوسان می‌تواند به عنوان یک ماده آسیب‌رسان به سلولز موجود در دیواره کیست‌های آکانتامبا به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم (به عنوان حامل) باعث از بین رفتن کیست‌ها شوند.

وجود کیست‌های دو جداره از کلیدی‌ترین چالش‌ها در عدم کارایی داروهای رایج هستند. کیست‌ها در اغلب مواقع به داروهای شیمیایی معمول و شرایط فیزیولوژیکی مقاوم بوده و عموماً جهت کشته شدن کیست‌های زنده نیاز به زمان و غلظت‌های بالاتر از حد مجاز می‌باشد، که استفاده از داروهای با غلظت بالا خود اثر سمی قابل توجهی بر سلول‌های قرنیه دارد. با توجه به مطالب ارائه شده، استفاده از ترکیبات یا داروهایی با منشاء طبیعی مانند کیتوسان و یا داروهای سنتتیک که مانع سنتز سلولز می‌شوند، می‌تواند روش درمانی جدید و مناسبی برای عفونت‌های آکانتامبایی باشند.

## References

- Clarke DW, Neiderkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoebakeratitis*. *Trend Parasitol* 2006; 22(4): 175-180.
- Gagnon MR, Walter KA. A case of *Acanthamoebakeratitis* as a result of a cosmetic contactlens. *Eye Contact Lens* 2006; 32(1): 37-38.
- Selby DM, Chandra RS, Rakusan TA, Loechelt B, Markle B, Visvesvara GS. Amoebic osteomyelitis in a child with *Pediatr. Pathol Mol Med* 1998; 18(1): 89-95.
- Rezaeian M, Niyiyati M. Pathogenic free living amoebae in human. 1<sup>th</sup> ed. Tehran: University of Medical Sciences; 2011. (Persian).
- Nagington J, Richards E. Chemotherapeutic compounds and *Acanthamoebae* from eye infections. *J Clin Pathol* 1976; 29(7): 648-651.
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoebakeratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 2015; 22.
- Gagnon MR, Walter KA. A case of *Acanthamoebakeratitis* as a result of a cosmetic contact lens. *Eye Contact Lens* 2006; 32(1):37-38.
- Barrett RA, Alexander M. Resistance of cysts of amoebae to microbial decomposition. *Appl Environ Microbiol* 1977; 33(3): 670-674.
- Neff RJ, Neff RH. The biochemistry of amoebic encystment. *Symp Soc Exp Biol* 1969; 23: 51-81.
- Dudley R, Alsam S, Khan NA. Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba keratitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75(41): 133-140.
- Deichmann U, Jantzen H. The cellulase enzyme system during growth and development of *Acanthamoeba castellanii*. *Arch Microbiol* 1977; 113(3): 309-313.
- Trevisan BC. Encystment of *Acanthamoeba* and Evaluating the Biobus Program. Georgia State University. 2010. Summer, 8-18.
- Schwarz WH. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 56(5-6): 634-649.
- Lynd LR, Weiner PJ, Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol MolBiol Rev* 2002; 66(3): 506-577.
- Beguin P, Aubert JP. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13(1): 25-58.
- Khan N. *Acanthamoeba* Biology and pathogenesis. UK: University of Nottingham; Caister Academic Press; 2009.
- Potter JL, Weisman RA. Correlation of cellulose synthesis in vivo and in vitro during the encystment of *Acanthamoeba*. *Dev Biol* 1972; 28(3): 472-427.
- Brown RM, Saxena IM. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol Biochem* 2000; 38(1-2): 57-67.
- Perez S, Mazeau K. Conformations, structures and morphologies of celluloses. In: Dumitriu S, editor. *Structural Diversity and Functional Versatility*. 2<sup>nd</sup> ed. 2005. ISBN: 978-0-8247-5480-8.
- Bishop JD, Byoung CM, Harrow F, Ratner D, Gomer RH, Dottin RP, et al. A second UDP-glucose pyrophosphorylase is required for differentiation and development in *Dictyosteliumdiscoideum*. *J Biol Chem* 2002; 277(36): 32430-32437.
- Haan RD, Rose SH, Lynd LR, Zyl WH.

- Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 2007; 9(1): 87-94.
22. Teeri TT. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol* 1997; 15(5): 160-167.
  23. Beguin P. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 219-248.
  24. Reese ET, Sui RGH, Levinson HS. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* 1950; 59(4): 485-497.
  25. Din N, Damude HG, Gilkes NR, Miller RC, Warren RAJ, Kilburn DG. C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24): 11383-11387.
  26. Shoseyov O, Shani Z, Levy I. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbial Mol Boil Rev* 2006; 70(2): 283-295.
  27. Teeri TT, Koivula A, Linder M, Wohlfahrt G, Divne C, Jones TA. Trichodermarees Cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *BiochemSoc Trans* 1998; 26(2): 173-178.
  28. Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T, Knowles JK, Jones TA. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 1990; 249(4967): 380-386.
  29. Tomme P, Warren RA, Gillces NR. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microbial Physiol* 1995; 37: 1-81.
  30. Wilson DB. Cellulases and biofuels. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(3): 295-299.
  31. Xie G, Bruce DC, Challacombe JF, Chertkov O, Detter JC, Gilna P, et al. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(11): 3536-3546.
  32. Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichodermaviride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol* 1957; 73(2): 269-278.
  33. Nogawa M, Goto M, Okada H, Morikawa Y. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Genet* 2001; 38(6): 329-334.
  34. Derda M, Winiecka-Krusnell J, Linder MB, Linder E. Labeled *Trichodermareesei* cellulase as a marker for *Acanthamoeba* cyst wall cellulose in infected tissues. *Appl Environ Microb* 2009; 75(21): 6827-6830.
  35. Webster D, Umar I, Kolyvas G, Bilbao J, Guiot MC, Duplisea K, et al. Treatment of granulomatous amoebicencephalitis with voriconazole and miltefosine in an immunocompetent soldier. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87(4): 715-718.
  36. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34(9): 1001-1027.
  37. Ficker L, Seal D, Warhurst D, Wright P. *Acanthamoeba* keratitis resistance to medical therapy. *Eye (lond)* 1990; 4(pt6): 835-838.
  38. Reinhard T, Sundmacher R. Clinical aspects and therapy of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmologe* 2000; 97(6): 446-459.
  39. Saunders PP, Proctor EM, Rollins DF, Richards JS. Enhanced killing of *Acanthamoeba* cysts in vitro using dimethylsulfoxide. *Ophthalmology* 1992; 99(8): 1197-1200.
  40. Moon EK, Hong Y, Chung DI, Goo YK, Kong HH. Potential Value of Cellulose Synthesis Inhibitors Combined With PHMB in the Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis.

- Cornea 2015; 34(12): 1593-1598.
41. Dudley R, Alsam S, Khan NA. Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba keratitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75(1): 133-140.
  42. Moon E K, Hong Y, Chung DI, Goo YK, Kong HH. Down-Regulation of Cellulose Synthase Inhibits the Formation of Endocysts in *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 2014; 52(2): 131-135.
  43. Anderson IJ, Watkins RF, Samuelson J, Spencer DF, Majoros WH, Gray MW, et al. Gene discovery in the *Acanthamoebacastellanii* genome. *Protist* 2005; 156(2): 203-214.
  44. Clarke M, Lohan AJ, Liu B, Lagkouvardos I, Roy S, Zafar N, et al. Genome of *Acanthamoebacastellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* 2013; 14(2): R11.
  45. Austin PR, Brine CJ, Castel JE, Zikakies JP. Chitin: New facets of research. *Science (AAAS)* 1981; 212(4496): 749-753.
  46. Hirano S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International* 1999; 48(8):732-734.
  47. Jings SB, Li L, Ji D, Takiguchi Y, Yamaguchi T. Effect of chitosan in renal function in patient with chronic renal failure. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49(7): 721-723.
  48. KongM, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010; 144(1): 51-63.
  49. Fakhar M, Rahimi-Esboei B, Rezaei F. In vitro protoscolicidal effects of fungal chitosan isolated from *Penicilliumwaksmanii* and *Penicilliumcitrinum*. *J Parasit Dis* 2015; 39(2): 162-167.
  50. Yarahmadi M, Fakhar M, Ebrahimzadeh MA, Chabra A, Rahimi-Esboei B. The anti-giardial effectiveness of fungal and commercial chitosan against *Giardaintestinalis* cysts in vitro. *J Parasit Dis* 2016; 40(1): 75-80.
  51. Rahimi-Esboei B, Fakhar M, Chabra A, Hosseini M. In vitrotreatments of *Echinococcusgranulosus* with fungal chitosan, asa novel biomolecule. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(10): 930-934.
  52. Hoseini MH, Moradi M, Alimohammadian MH, Shahgoli VK, Darabi H, Rostami A. Immunotherapeutic effects of chitin in comparison with chitosan against *Leishmania major* infection. *Parasitol Int* 2016; 65(2): 99-104.
  53. Rassu G, Gavini E, Mattana A, Giunchedi P. Improvement of Antiamoebic Activity of Rokitamycin Loaded in Chitosan Microspheres. *Open Drug Deliver J* 2008; 5(2): 38-43.