

**Şəhla Nihan qızı Əliyeva**  
V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat  
Tibbi Profilaktika İnstitutu  
biologiya üzrə fəlsəfə doktoru  
[shahlaaliyeva1969@gmail.com](mailto:shahlaaliyeva1969@gmail.com)

## ÜÇGÜNLÜK MALARİYA TÖRƏDİCİSİNİN *IN VITRO* KULTİVASİYASINDA RETİKULOSİTLƏRİN VƏ PRİMAT ERİTROSİTLƏRİNİN TƏTBİQİ

### Xülasə

Məlum olduğu kimi, üçgünlük malyariya törədici olan *P.vivax*-ın merozoitləri, əsasən, cavan retikulositlərə üstünlük verir. Bu, onların səthində çoxlu reseptorların olması ilə əlaqədardır (DARC, CD71 və s.). Retikulositlər normositlərə çevrilərkən bir çox reseptorlarını itirir, bu da *P.vivax* merozoitlərinin yetkin eritrositlərə daxil olmasına əngəl törədir.

*P.vivax*-ın kultivasiyası sahəsində gələcək işlər parazitin *in vitro* inkişafında cavan retikulositlərin səthindəki çoxsaylı reseptorlarının rolunu müəyyənləşdirməyə yönəlməlidir. Həmçinin *P.vivax*-ın retikulositlərə tropizminin əsasında duran reseptor-liqand əlaqələrinin araşdırılması da çox önəmlidir.

Bəzi primat növləri (*S.boliviensis*) *Plasmodium vivax* üçün *in vivo* sahib orqanizm hesab olunur. Bu səbəbdən törədici bu meymun eritrositlərində *in vitro* şəraitdə uzun müddət saxlanıla bilər. Göstərilən istiqamətdə tədqiqatların davam etdirilməsi üçgünlük malyariya törədicisinin molekulyar biologiyasının öyrənilməsi üçün çox əhəmiyyətlidir.

**Açar sözlər:** malyariya, *P.vivax*, fasiləsiz kultura, merozoitlər, invaziya, retikulositlər, meymun eritrositləri

**Shahla Nihan Aliyeva**

### Application of reticulocytes and erythrocytes of primats in cultivation of the three-day malaria *in vitro*

#### Abstract

As is known, the merozoites of the three-day malaria pathogen *P.vivax* prefer young reticulocytes. This is due to the presence of many receptors on their surface (DARC, CD71, etc.). When reticulocytes become normocytes, they lose many of their receptors, which prevents *P.vivax* merozoites from entering mature erythrocytes.

Further work on the cultivation of *P.vivax* should be aimed at determining the role of multiple receptors on the surface of young reticulocytes in the development of the parasite *in vitro*. It is also very important to investigate the receptor-ligand relationships underlying *P.vivax* tropism for reticulocytes.

Some primate species (*S.boliviensis*) are considered *in vivo* hosts for *Plasmodium vivax*. For this reason, *in vitro*, the pathogen can persist for a long time in the erythrocytes of this monkey. Continued research in this direction is very important for studying the molecular biology of the causative agent of three-day malaria.

**Keywords:** malaria, *P.vivax*, continuous culture, merozoites, invasion, reticulocytes, monkey erythrocytes

#### Giriş

Üçgünlük malyariya törədici olan *Plasmodium vivax* geniş yayılmış insan malyariyası parazitlərindən olub, dünyanın 95 ölkəsində (Gething, Elyazar, Moyes, 2012:1814), (Howes, Battle, Mendis, 2016:15-34) milyonlarla insanın həyatını təhlükə altına qoymuşdur. Dünya əhalisinin təxminən 40%-i üçgünlük malyariyaya yoluxma riski ilə üz-üzədir. Parazitin özəl biologiyası, qaraciyərdə gipnozoid mərhələsinin mövcudluğu (Markus, 2017: 492-5), (Markus, 2018:1765-71) sümük iliylindəki gizli infeksiya rezervuarı (Obaldia, Meibalan, Sa, 2018:00625) xəstəliyin şiddətini daha da artırır. Sonda sadalananlar malyariya residivlərinin başlıca səbəbidir.

Üçgünlük malyariya ilə effektiv mübarizə üçün əvvəlcə törədicinin uzunmüddətli kulturası əldə edilməlidir. *P.vivax*-in fasiləsiz kulturanın alınması parazitin biologiyasının öyrənilməsi, mövcud dərmanlara həssaslığın araşdırılması, vaksin və yeni dərman preparatları hazırlanması baxımından çox əhəmiyyətlidir.

Hal-hazırda qarşıda duran əsas məsələlərdən biri *P.vivax*-in fasiləsiz kulturasını təmin edəcək metodologiyanın işlənilib hazırlanmasıdır (Golenda, Li, Rosenberg, 1997:6786-91).

Məlum olduğu kimi, digər plazmodium növləri (*P.falciparum*, *P.knowlesi* və *P.malariae*) yetkin eritrositlərə – normositlərə, *P.vivax* və *P.ovale* isə retikulositlərə üstünlük verir. *P.falciparum*-un uzunmüddətli kulturasının alınması invaziyanın qarşısını ala biləcək metodların işlənilib hazırlanmasına imkan verirkən (Cowman, Tonkin, Tham, 2017:232-245), (Draper, Sack, King, 2018:43-56) *P.vivax*-in uzunmüddətli kulturasının olmaması bu şansdan məhrum edir (Kanjee, Rangel, Clark, 2018:109-115).

Tropik malyariyanın törədicisi olan *P.falciparum*-un *in vitro* uzunmüddətli kulturasının alınması parazitin həyat tsiklinin müəyyənləşdirilməsi, vaksin komponenti kimi tədqiq olunmuş bir çox zülalın aşkar olunmasına güclü təkan vermişdir. Əfsus ki, *P.falciparum*-un fasiləsiz kulturası üçün effektiv olan metod *P.vivax*-in uzunmüddətli kulturasının alınmasında özünü doğrultmadı.

XIX əsrdən başlayaraq üçgünlük malyariya törədicisinin fasiləsiz kulturasının alınması üçün müxtəlif cəhdlər edilsə də, onların hamısı uğursuzluqla nəticələnmişdir. Yalnız 1980-ci ildə *P.vivax* kulturasını mühitə retikulosit əlavə edərək, bir ay müddətində saxlamaq mümkün olmuşdur. Bu zaman retikulositlər sağlam insanın və hemoxromatozlu xəstənin qanından alınmışdır. Həmçinin müəyyən edilmişdir ki, gələcəkdə *P.vivax*-in *in vitro* kulturasının eritroblastların köməyi ilə stabil aparılması mümkündür.

Qeyd edildiyi kimi, *P.vivax*, əsasən, cavan eritrositləri (retikulositlər) zədələyir. Retikulositlər yetkin insanın periferik qanındakı eritrositlərin təxminən 1-2%-ni təşkil edir. Plazmodium merozoitləri yumurta formalı olub, ucları azca sivridir. Adhezinlər merozoitin apikal ucunda, rottir və mikronemlər kimi sekretor orqanellalar olan hissədə yerləşib, eritrositlərin spesifik reseptorları ilə birləşməni təmin edir və beləliklə parazit eritrositə daxil olur. *P.vivax*-in fasiləsiz kulturasının alınmaması səbəblərindən biri merozoitlərin sahib hüceyrəyə daxil ola bilməməsidir. *P.vivax*-in retikulositlərə meyilliliyi 1930-cu illərdə aşkarlansa da, bu spesifikliyi şərtləndirən eritrosit komponentləri hələ də naməlum qalır və bu istiqamətdə tədqiqatlar davam etdirilir.

### **Üçgünlük malyariya törədicisi kulturasında retikulositlər. *P.vivax*-in retikulositlərə daxil olma yolları**

*P.vivax*-in cavan retikulositlərə tropizmi daha dəqiq müəyyənləşdirilmiş retikulosit subpopulyasiyalarının istifadəsi ilə invaziyanın analizinə sövq etmişdir. Bunlar müxtəlif ekspressiya səviyyəli 4 populyasiyadır: CD71<sup>-</sup>, CD71<sup>low</sup>, CD71<sup>medium</sup>, CD71<sup>high</sup>. Bu retikulosit subpopulyasiyaları arasında kimyəvi və mexaniki fərqlər Malleret və b. (Malleret, Xu, Mohandas, 2013:76062) tərəfindən qeydə alınmışdır. Tədqiqat nəticəsində *P.vivax* invaziyası üçün CD71-in yeganə reseptor kimi qəbul edilməsinin yanlış olduğu nəticəsinə gəlinib. Çünki CD71-ə monoklonal antitellərin təsiri ilə və ya tripsinlə edilmiş retikulositlərlə (CD71 tripsinə həssasdır) aparılan araşdırmalarda invaziya faizi dəyişməmişdir (Russell, Suwanarusk, Borlon, 2011:e74-e81).

Retikulositlərin CD71<sup>+</sup> fraksiyasına əsaslanan araşdırmalar çox vacib postinvazion modifikasiyanı aşkara çıxarmışlar. *P.vivax*-la invaziya yoluxmuş retikulositlərdən bir çox maddələrin (həmçinin CD71) xaric olunmasına gətirir. İnvaziyadan dərhal sonra yoluxmuş retikulositlərin böyük faizi CD71<sup>+</sup>, yoluxmamış retikulositlərininki isə CD71<sup>-</sup> idi. İnvaziyadan sonra 3-6 saat ərzində *P.vivax*-la yoluxmuş CD71<sup>+</sup> retikulositlər güclü deformasiyaya uğramış CD71<sup>-</sup> qırmızı qan hüceyrələrinə çevrilmiş və retikulyar maddəni tamamilən itirmişlər. Yoluxmamış retikulositlər üçün bu proses adətən 24 saat ərzində başa çatır. Üçgünlük malyariya törədicisi ilə yoluxmuş cavan retikulositlərin sürətli remodelləşməsi – yoluxma anından keçən 6 saat ərzində CD71<sup>+</sup> cavan retikulositlərin deformasiya olunmuş CD71<sup>-</sup> retikulositlərə çevrilməsi təəccüb doğurur.

Standart şərtlər daxilində yetişən retikulositlərdən CD71-in itməsi ekzositoz nəticəsində (ekzosomların iştirakı ilə) gedir. Yoluxmuş eritrositlərdə müşahidə olunan çıxıntılarsa ekzosomu yox, mikrovezikulu xatırladırdı (Raposo, Stoorvogel, 2013:373-383).

Tədqiqat nəticəsində *P.vivax*-la yoluxmuş retikulositlərin membran nanostrukturunda da dəyişiklik müşahidə edilmişdir. Belə ki, yenidən yoluxmuş CD71<sup>+</sup> retikulositlərin səthində mikrovezikulyar

strukturlardan başqa 100 nm diametrli dəliklər də aşkar olunmuşdu. Lakin onların klatrin zülalları üçün və ya CVC (Caveolae vesicle complexes) üçün olduğu məlum olmamışdı.

*P.vivax* merozoitləri yalnız transferrin reseptorunun (CD71) ekspressiya səviyyəsinə görə müəyyənləşən retikulositlərin heterogen populyasiyasını invaziya edə bilirlər. Retikulositləri inkişaf mərhələlərinə görə çeşidləməyə imkan verən protokolun işlənilib hazırlanması ilk dəfə *P.vivax* merozoitlərinin invaziyasını öyrənməyə imkan vermişdir. Məhz cavan retikulositlər (CD71<sup>+</sup>) parazit tərəfindən invaziya olunur, əsasən periferik qanda təsadüf edilən yetkin retikulositlər (CD71<sup>-</sup>) isə nadir hallarda invaziyaya məruz qalır. Bu faktlar – parazitin cavan retikulositlərə seçiciliyi və sahib hüceyrələrin sürətli remodelizasiyası – *P.vivax*-ın patobiologiyasına aid olan vacib informasiyadır.

*P.vivax* merozoitlərinin CD71<sup>+</sup> retikulositlərinə tropizmi, CD71<sup>-</sup> retikulositlərinin isə invaziyaya müəyyən qədər davamlı olduğunun müəyyənləşməsi gözlənilməz idi. CD71<sup>-</sup> retikulositləri əsasən periferik qanda, CD71<sup>+</sup> cavan retikulositləri isə sümük iliyində lokallaşır (Malleret, Xu, Mohandas, 2013:76062). Bu fakt *P.vivax* invaziyasının əsasən qanda deyil, sümük iliyində getdiyi haqda fikir söyləməyə imkan verir.

*P.vivax* üçün retikulositlərin əsas reseptorunu identifikasiya etmək cəhdlərinə mane olan faktorlardan biri də retikulosit populyasiyasının heterogenliyidir. Bu heterogenlik ilk dəfə 1930-cu illərdə Heilmeyer tərəfindən təsniflənmişdi. Retikulositlər 72 saat ərzində nüvəsini itirib bir sıra biokimyəvi, biofiziki və metabolik dəyişikliklərə məruz qalaraq normositlərə çevrilir. Kürəvi cavan retikulosit məhv olmuş orqanellərini (retikulyar maddə) ataraq öz membran səthinin böyük hissəsini itirir. Çevrilmə prosesində retikulosit bir çox reseptorlarını da itirir (Blanc, Vidal, 2010:177-183). Normosit formalaşan zaman onda artıq transferrin reseptoru (CD71) olmur. Bu reseptor retikulositin yaşının dəqiq müəyyənləşdirilməsi üçün vacib biomarkerdir (Malleret, Xu, Mohandas, 2013:76062).

İlk dəfə Marchiafava və onun həmkarları 1880-ci illərdə malyariya parazitlərini sümük iliyində müşahidə etmişlər. Bu müşahidələr 1920-ci illərin əvvəllərində patogenlərin diaqnostikası üçün sternal punksiyanı (sümük iliynin aspirasion biopsiyası) təklif edən Seyfarth tərəfindən təsdiqlənmişdi. Müəlliflər belə qərara gəlmişlər ki, malyariya parazitləri əgər qanda aşkar edilərsə, onlar sümük iliyində mütləq tapılacaq. Lakin bəzən onlar qanda müşahidə edilmədikdə də sümük iliyində lokallaşa bilirlər. Həqiqətən sümük iliyində parazitəmiya periferik qandakından 2 dəfə çox olmuşdur. Qan yaxmaları neqativ göstərən bir çox pasientdə yalnız sternal punksiyadan sonra *P.vivax* ilə yoluxma aşkar edilmişdi. Bu müşahidələr sümük iliynin *P.vivax*-ın toplandığı yer və iliynin parazitin patobiologiyasında mühüm rol oynadığı haqda mülahizə yürütməyə imkan verir.

*P.vivax*-ın CD71 daşıyan klatrin zülallarının itirilməsində rolu hələ məlum deyil. Parazitlə yoluxma çıxıntılı cavan retikulositlərin deformasiyasına səbəb olur. Belə güman olunur ki, yoluxmuş eritrositləri dalağın klirensindən qorumaq üçün adaptasiya prosesidir.

Retikulositlərin sümük iliyində və periferik qanda mövcud olan 2 müxtəlif sinfi vardır (Griffiths, Kupzig, Cogan, 2012:1150-1151). Sümük iliyni kompartmentində olan R1 retikulositləri nüvəsini itirmiş və hərəkətli formalıdır. R2 retikulositləri sümük iliyindən periferik qana keçiblər, stabil və hərəkətsizdirlər. Sümük iliyində və periferik qanda retikulositlər yetişən zaman onlar öz orqanellərini hamısını və plazmatik membran səthinin 20%-ni itirir (Moras, Lefevre, Ostuni, 2017:1076). Retikulositlər bəzi səth zülalları ekspressə edir ki, bunlar da normositlərə dönüşürkən itir. CD71 (transferrin reseptoru 1, TfR1), CD49d, CD151, CD81, CD82 yetkin eritrositlərlə müqayisədə yalnız cavan retikulositlərdə olur (Thomson-Luque, Wang, Ntumngia, 2018: 22-33).

Üçgünlük malyariya törədicilərinin retikulositlərə invaziyası retikulosit bağlayıcı zülallar (PvRBP) vasitəsilə həyata keçirilir. Bir neçə *P.vivax* izolyatlarının genom sıralaması (sequencing) PvRBP ailəsindən 11 zülal təyin etmişdir. *P.vivax* merozoitlərinin apikal qütündə yerləşən 2 zülal (PvRBP-1a və PvRBP-2c) retikulositlərlə birləşib yüksək molekulyar kompleks yaradır.

Retikulositlərə daxil olmanın digər yolları da mövcuddur. 1970-ci illərdən məlumdur ki, *P.vivax*-ın eritrositlərə invaziyası Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) adlanan reseptordan asılıdır. Duffy zülalı xemokin reseptorudur, rəsmi olaraq atypical chemokine receptor 1 (ACKR 1) adlanır. *P.vivax*-da DARC-la əlaqə quran Duffy Binding Protein (PvDBP) mövcud olmalıdır. Zülal parazitin retikulositlərə keçməsinə təmin edir. Lakin DARC həm normositlərdə, həm də retikulositlərdə mövcuddur. Bu səbəbdən də parazit tərəfindən retikulositlərin spesifik tanınmasını təmin edə bilməz. Buna baxmayaraq PvDBP və cavan retikulositlərdə DARC tanınmasına xidmət edən xüsusi mexanizmin olduğu və bu mexanizmin köməyiylə parazitin əsasən cavan retikulositləri seçməsi haqda mülahizələr yürüdülmür (Ovchinnikova, Aglialoro, Bentlage, 2017:1441-1444).

Uzun illər belə güman olunurdu ki, eritrosit səthində Duffy zülalının olmaması *P.vivax*-a qarşı təbii müdafiəni təşkil edir. Belə ki, Duffy qan qrupu əsas parazit liqandı olan *P.vivax* Duffy binding protein (PvDBP) üçün reseptor rolunu oynayır. 10 illər boyu gəlinən nəticəyə görə Afrika ölkələrində üçgünlük malyariya demək olar ki, yayılmayıb, çünki bu regionun əhalisində parazitə daxil olmasında əsas rol oynayan qırmızı qan hüceyrələri reseptoru – Duffy zülalı yoxdur. Son 20 ildə bu doqma şübhə altına alınıb, belə ki, Afrikanın özündə də, əhalinin böyük faizini Afrika mənşəlilər təşkil edən Cənubi Amerikada da Duffy reseptoru olmayan şəxslər arasında üçgünlük malyariyaya yoluxma halları qeyd olunmuşdu. İndi artıq məlumdur ki, parazit bu müdafiəni yarıb Duffy neqativ şəxslərdə də klinik malyariya törədə bilər. Bu prosesin mexanizmləri hələlik məlum deyil.

#### **P.vivax-ın kulturası üçün *ex vivo* primat eritrositlərinin tətbiqi**

*P.vivax*-ın fasiləsiz kultivasiyası üçün optimal şəraitin tapılması tədqiqatçıların diqqət mərkəzindədir (Noulin, Borlon, Van Den Abbeele, 2013:286-94), (Tham, Beeson, Rayner, 2017:111-118). Bu məqsədlə bir sıra araşdırmalarda *P.vivax* kulturası üçün primatların qanından istifadə edilmişdir.

Qolenda və Rozenberqin (Golenda, Li, Rosenberg, 1997:678691) işlərində kultura şəraitində həm retikulosit invaziyası, həm hüceyrələrdə parazitlərin yetkin şizonta qədər qorunması, həm də sahib hüceyrənin qorunması nəzərdə tutulurdu. Tədqiqatda *Aotus* cinsi meymunlarına adaptasiya olunmuş üçgünlük malyariya törədiciyi daha yetkin mərhələlərə qədər inkişaf edib yenidən merozoit mərhələsində hemoxromatozlu xəstənin retikulositlərinə daxil ola bilmişdir. Onlar üçgünlük malyariya törədicisinin *Chesson* ştammini meymun eritrositlərindən insan retikulositlərinə keçirmiş, L-glutamin, HEPES buferi, 20% AB+ insan qan zərdabı ilə modifikasiya edilmiş McCoy's 5A qidalı mühitində kultivasiya etmişlər. Retikulositlər differensial sentrifugə yolu ilə hemoxromatozlu xəstənin periferik qanından alınmışdı. Parazitlər hər 48 saatlıq tsikl boyu içində şam olan qabda statik mühitdə şizoqoniya mərhələsi başlayana qədər saxlanılmış, təxminən 36-40 saatdan sonra retikulosit əlavə olunaraq 10-12 saatlıq şeykərə keçirilib dinamik hala gətirilmişdi. Bu, parazit və sahib hüceyrə arasında maksimal kontaktı mümkün edirdi. Eritrositlərin invaziyası baş tutan kimi parazit üzük və cavan trofozoit mərhələsində böyümə və differensiasiya üçün yenidən statik kultura mühitinə keçirilmişdi. Aşkar olunmuşdu ki, Mons et al (Mons, Collins, Skinner, 1988:183-188) qeyd etdikləri kimi qarışdırılan kultura invaziya sürətlənir. 10% retikulosit əlavəsi isə parazit sıxlığını 3 tsikldən sonra təxminən 2 dəfə artırmışdı.

Mons et al (Mons, Collins, Skinner, 1988:183-188) *P.vivax*-ın şeykərə vasitəsilə həyata keçirilən dinamik kulturası üçün meymunlardan alınmış və retikulositlərlə zənginləşdirilmiş qandan istifadə etmişlər. *P.vivax*-la yoluxdurulmuş *Aotus nancymai* meymunları donor rolunu oynamış, izolə edilmiş parazitlər fasiləsiz çalxalanmaqla 20% AB+ qan zərdablı standart RPMİ-1640 qidalı mühitində saxlanmışlar. Yetkin şizontlar aşkar olunduqda kultura süni induksiya edilmiş meymun eritrositləri əlavə etmişlər. Fasiləsiz çalxalama və retikulosit əlavəsi *in vitro* şəraitdə güclü reinvaziya üçün lazım idi. Tədqiqat nəticəsində retikulosit faizi və *in vitro* invaziya arasında müsbət korrelyasiya müşahidə edilmişdir.

Bəzi araşdırmaçılar *Saimiri boliviensis* meymunlarının qanından istifadə etmiş (Anderson, Lapp, Barnwell, 2017:0182561) və aşkara çıxarmışlar ki, *P.vivax*-ın müəyyən qədər uzunmüddətli kulturası *S.boliviensis* eritrositlərində mümkündür (Mehlotra, Blankenship, Howes, 2017:442). Bu meymun *in vivo* *P.vivax* üçün sahib orqanizm hesab edilir. *In vitro* parazitə bu meymunun eritrositlərində fasiləsiz saxlanma bilməsi *P.vivax*-ın molekulyar biologiyasının öyrənilməsi üçün çox əhəmiyyətlidir.

#### **Nəticə**

Üçgünlük malyariya törədicisinin fasiləsiz kulturasının əldə edilməməsi dünyanın 95 ölkəsində yayılmış bu malyariya növünə qarşı mübarizəni çətinləşdirir, xəstəliyə qarşı effektiv dərman vasitələrinin və vaksinin hazırlanmasını mümkünsüz edir. *P.vivax*, əsasən, cavan eritrositləri (retikulositlər) zədələyir. Retikulositlər yetkin insanın periferik qandakı eritrositlərin təxminən 1-2%-ni təşkil edir. Lakin retikulositlərdən, bahalı qidalı mühitlərdən, insan qan zərdabından, bir sıra bahalı bioloji aktiv əlavələrdən və dinamik kultura sistemindən istifadə etməklə də *P.vivax*-ın fasiləsiz kulturasını almaq mümkün olmayıb. Fasiləsiz kulturanın alınmamasında digər səbəb malyariya ilə yoluxmuş insandan izolə edilən nümunədə parazitəməyanın çox aşağı faizdə olmasıdır. Buna görə bəzi tədqiqatçılar *P.vivax*-ın *in vitro* kulturası üçün üçgünlük malyariya ilə yoluxdurulmuş primat eritrositlərindən istifadə etmişlər. Lakin retikulositlər çətin əldə edildiyinə, meymun eritrositlərinin isə

tətbiqi maliyyə cəhətdən bahalı olduğuna görə *P.vivax*-ın *in vitro* fasiləsiz kultivasiyası metodunun optimallaşdırılması məqsədilə tədqiqat işləri davam etdirilir.

## Ədəbiyyat

1. Gething, P.W., Elyazar, I.R., Moyes, C.L. et al. (2012). A long neglected world malaria map: *P.vivax* endemicity in 2010. PLoS Negl Trop Dis., Vol.6, p.e1814.
2. Howes, R.E., Battle, K.E., Mendis, K.N. et al. (2016). Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg., Vol.95, p.15-34.
3. Markus, M.B. (2017). Malaria eradication and the hidden parasite reservoir. Trends Parasitol., 33:p.492-5.
4. Markus, M.B. (2018). Biological concepts in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. Parasitology, 145:p.1765-71.
5. Obaldia, N., Meibalan, E., Sa, J.M. et al. (2018). Bone marrow is a major parasite reservoir in *Plasmodium vivax* infection. MBio., 9:p.00625.
6. Golenda, C.F., Li, J., Rosenberg, R. (1997). Continuous *in vitro* propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. Proc Natl Acad Sci USA, 94:p.6786-91.
7. Cowman, A.F., Tonkin, C.J., Tham, W.H. et al. (2017). The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. Cell Host & Microbe, 22:p.232-245.
8. Draper, S.J., Sack, B.K., King, C.R. et al. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. Cell HostMicrobe, 24:p.43-56.
9. Kanjee, U, Rangel, G.W., Clark, M.A. (2018). Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. Current Opinion in Microbiology, 46:p.109-115.
10. Malleret, B., Xu, F., Mohandas, N. et al. (2013). Significant biochemical, biophysical and metabolic diversity in circulating human cord blood reticulocytes. PLoS ONE, 8:p.76062.
11. Russell, B., Suwanarusk, R., Borlon, C. et al. (2011). A reliable *ex vivo* invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. Blood., 118 13:p.e74-e81.
12. Raposo, G., Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol., 200 4:p.373-383.
13. Blanc, L., Vidal, M. (2010). Reticulocyte membrane remodeling: contribution of the exosome pathway. Curr Opin Hematol, 17, 3:p.177-183.
14. Griffiths, R.E., Kupzig, S., Cogan, N. et al. (2012). The ins and outs of human reticulocyte maturation: Autophagy and the endosome/exosome pathway. Autophagy, 8:p.1150–1151.
15. Moras, M., Lefevre, S.D., Ostuni, M.A. (2017). From erythroblasts to mature red blood cells: Organelle clearance in mammals. Frontiers in Physiology., 8:p.1076.
16. Thomson-Luque, R., Wang, C., Ntumngia, F.B. et al. (2018). In-depth phenotypic characterization of reticulocyte maturation using mass cytometry. Blood Cells, Molecules & Diseases., 72:p.22-33.
17. Ovchinnikova, E., Agliandolo, F., Bentlage, A.E.H., et al. (2017). DARC extracellular domain remodeling in maturing reticulocytes explains *Plasmodium vivax* tropism. Blood., 130:p.1441.
18. Noulin, F., Borlon, C., Van Den Abbeele, J. et al. (2013). 1912–2012: a century of research on *Plasmodium vivax in vitro* culture. Trends Parasitol., 29:p.286-94.
19. Tham, W.H., Beeson, J.G., Rayner, J.C. (2017). *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. Int J Parasitol., 47:p.111-118.
20. Mons, B., Collins, W.E., Skinner, J.C. (1988). *Plasmodium vivax: in vitro* growth and reinvasion in red blood cells of *Aotus nancymai*. Exp Parasitol., 66(2), p.183-188.
21. Anderson, D.C., Lapp, S.A., Barnwell, J.W. et al. (2017). A large scale *Plasmodium vivax – Saimiri boliviensis* trophozoite – schizont transition proteome. PLoS ONE, 12:p.0182561.
22. Mehlotra, R.K., Blankenship, D., Howes, R.E. et al. (2017). Long-term *in vitro* culture of *Plasmodium vivax* isolates from Madagascar maintained in *Saimiri boliviensis* blood. Malar J.,16:p.442.