

## The Study of the Cytopathic Effects of *Blastocystis* sp., ST1-3 and 6 Isolated from Subjects Referred to Medical Laboratories in HT29 Cell Line

Seyed Ahmad Karamati<sup>1,2</sup>, Sara Soleimani Jevinani<sup>3</sup>, Maryam Niyiyati<sup>2\*</sup>, Hamed Mirjalali<sup>3\*</sup>

1. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: July 28, 2022; Accepted: October 9, 2022

### Abstract

**Background and Aim:** *Blastocystis* sp., is one of the most common intestinal protozoan parasites found in both human and animal fecal samples. The pathogenicity and cytopathic effects of subtypes ST1-3 and 6 of *Blastocystis* sp., on gastrointestinal cell line are unclear. This study aimed to investigate the impacts of intra- subtype variations on the apoptosis and cytopathic effects on the HT-29 cell line in 2019 at the Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Methods:** This study was an experimental investigation of *Blastocystis* sp., subtypes 1-3 and 6, which were isolated from stool samples of 30 symptomatic and subtypes 1-3 from 25 asymptomatic subjects. After purifying and counting the microorganisms, lysate of *Blastocystis* sp., was prepared from  $1 \times 10^5$  of the microorganism by three freeze- thaw cycles in liquid nitrogen and a 37°C water bath. Then, the lysates of subtypes of *Blastocystis* were co-incubated with the HT-29 cell line for 48h. Finally, the cell proliferation rate was measured using an MTT dye assay. For measuring the statistical differences in the cell proliferation based on subtypes as well as symptoms, One- way ANOVA test incorporated with GraphPad Prism was applied.

**Results:** The results clearly indicated that all *Blastocystis* sp., subtypes, compared to non-treated control (NTC), had a cytopathic/inhibitory effect on HT-29 cells growth. The lowest cytopathic effect was seen in ST1 isolated from symptomatic patients (17.11%), while the highest was seen in ST1 isolated from asymptomatic patients (25%). Indeed, ST2 showed milder cytopathic effects in the HT-29 cell line compared to ST1, 3, and 6. However, there was no statistical correlation between subtypes as well as symptoms and cytopathic effect.

**Conclusion:** Although there was no statistically significant correlation between subtypes and the cytopathic effect, immunologic responses of hosts seem to play a critical role against *Blastocystis* sp. Our findings showed milder effects of *Blastocystis* sp., ST2 compared to the other subtypes; however, intra-subtype variations in the pathogenicity of the protist remain unclear, and further investigations are needed.

**Keywords:** *Blastocystis*; Subtypes; Symptoms; HT-29 cell line; Cytopathic effects

**Please cite this article as:** Karamati SA, Soleimani Jevinani S, Niyiyati M, Mirjalali H. The Study of the Cytopathic Effects of *Blastocystis* sp., ST1-3 and 6 Isolated from Subjects Referred to Medical Laboratories in HT29 Cell Line. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(1):43-52.

\* Corresponding Author:

**Name:** Maryam Niyiyati; **Email:** maryamniyati@yahoo.com

**Name:** Hamed Mirjalali; **Email:** hamedmirjalali@sbmu.ac.ir

## مطالعه مقدماتی آثار سیتوپاتیک ساب تایپ‌های ۱-۳ و ۶ بلاستوسیستیس در رده سلولی HT-29

سید احمد کرامتی<sup>۱</sup>، سارا سلیمانی جوینانی<sup>۲</sup>، مریم نیتی<sup>۳\*</sup>، حامد میرجلالی<sup>۳</sup>

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۷

## خلاصه

**سابقه و هدف:** بلاستوسیستیس در حال حاضر یکی از شایع‌ترین انگل‌های تک یاخته‌ای روده‌ای است که در مدفوع انسان و حیوان یافت می‌شود. بیماری‌زایی بلاستوسیستیس و ساب تایپ‌های آن روی سلول رده گوارشی مشخص نیست. این مطالعه با هدف بررسی تفاوت بین ساب تایپی در القای آپوپتوز سلولی در رده سلولی HT-29 در سال ۱۳۹۹ و در پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

**روش کار:** این بررسی یک مطالعه تجربی روی هفت ایزوله شامل شش ایزوله از ساب تایپ‌های ۱ تا ۳ و ۶ از ۳۰ ایزوله بلاستوسیستیس جدا شده از افراد دارای علائم بالینی و ساب تایپ‌های ۱ تا ۳ از ۲۵ ایزوله بلاستوسیستیس جدا شده از حاملان بدون علامت بود. پس از خالص‌سازی و شمارش میکروارگانیزم‌ها، آنتی‌ژن محلول بلاستوسیستیس از  $1 \times 10^5$  میکروارگانیزم با استفاده از سه چرخه انجماد و ذوب در نیتروژن مایع و حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. سپس آنتی‌ژن محلول ساب تایپ‌های بلاستوسیستیس با رده سلولی HT-29 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. در نهایت، سرعت تکثیر سلولی با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. برای بررسی تفاوت‌های آماری در تکثیر سلولی بر اساس زیرگروه‌ها و همچنین علائم، از آزمون ANOVA یک طرفه همراه با GraphPad Prism استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج به وضوح نشان داد که تمامی ساب تایپ‌های بلاستوسیستیس در مقایسه با گروه شاهد تیمار نشده (NTC) دارای اثر سیتوپاتیک/بازدارنده بر رشد سلول‌های HT-29 بودند. بیشترین میزان اثر سیتوپاتیک در ساب تایپ ۱ جدا شده از افراد بدون علامت (۲۵ درصد) و کمترین آثار سیتوپاتیک در ساب تایپ ۱ جدا شده از افراد با علامت بالینی (۱۷/۱۱ درصد) دیده شد. با این حال، هیچ ارتباط آماری بین ساب تایپ‌ها و همچنین علائم بالینی با اثر سیتوپاتیک وجود نداشت ( $P\text{-value} = 0/11$ ).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که اگرچه از نظر آماری ارتباط معناداری بین ساب تایپ‌ها و اثر سیتوپاتیک وجود نداشت، اما به نظر می‌رسد که ویژگی‌های ایمونولوژیک میزبان نقش اساسی در پاسخ به بلاستوسیستیس دارد. در واقع، مقایسه بین ساب تایپ‌ها نشان داد که ساب تایپ ۲ آثار خفیف‌تری را القا می‌کند. با این حال، بیماری‌زایی بلاستوسیستیس و تفاوت بین ساب تایپ‌ها بحث برانگیز باقی مانده است و نیاز به بررسی‌های مقایسه‌ای بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: بلاستوسیستیس؛ ساب تایپ؛ علائم بالینی؛ رده سلولی HT-29؛ اثرات سیتوپاتیک

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Karamati SA, Soleimani Jevinani S, Niyyati M, Mirjalali H. The Study of the Cytopathic Effects of *Blastocystis* Sp., ST1-3 and 6 Isolated from Subjects Referred to Medical Laboratories in HT29 Cell Line. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(1):43-52.

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

نام: مریم نیتی؛ آدرس پست الکترونیکی: maryamniyati@yahoo.com

نام: حامد میرجلالی؛ آدرس پست الکترونیکی: hamedmirjalali@sbmu.ac.ir

## مقدمه

در سال‌های اخیر بررسی اثر انگل بلاستوسیتیس روی سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های رده گوارشی مانند HT-29 توجه زیادی را جلب کرده است. بلاستوسیتیس انگل تک یاخته‌ای رایج در روده انسان با اشکال مورفولوژیکی و فرآیندهای تولیدمثلی مختلف است (۱، ۲). تک یاخته بلاستوسیتیس در سراسر جهان شایع است و در کشورهای در حال توسعه، شیوع آن به بیش از ۵۰ درصد می‌رسد (۳، ۴). اگرچه ویژگی‌های اپیدمیولوژیک و توزیع بلاستوسیتیس به طور گسترده بررسی شده است (۱۰-۵)، آثار بالقوه بیماری‌زای بلاستوسیتیس برای سال‌ها یک مسئله حل‌نشده باقی‌مانده است (۱۴-۱۱). بحث جدی در مورد بیماری‌زایی ارگانسیم بلاستوسیتیس منجر به یافته‌هایی در مورد ویژگی‌های ژنوتیپی و فنوتیپی این انگل در افراد با علامت و بدون علامت شده است (۲).

بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک، ارتباط بین علائم گوارشی و عفونت بلاستوسیتیس را گزارش کرده‌اند (۱۹-۱۵). اخیراً افزایش آسیب اکسیداتیو در اثر تلقیح بلاستوسیتیس انسانی نشان داده شده است (۲۰). همچنین برخی از مطالعات آثار سیتوپاتیک بالقوه بلاستوسیتیس را با استفاده از تحقیقات آزمایشگاهی نشان دادند (۱۲، ۲۱، ۲۲). علاوه بر این، تظاهرات هیستوپاتولوژیک شامل التهاب لامینا پروپریا در لومن روده یا در کناره اپیتلیال کولون و سکوم موش‌های آلوده به بلاستوسیتیس مشاهده شده است (۲۳). از سوی دیگر، وجود انگل در بافت‌های مختلف روده و لایه عضلانی سکوم نشان‌دهنده ویژگی‌های تهاجمی بلاستوسیتیس از طریق شروع پاسخ التهابی است (۲۴).

با این حال، با استناد بر مطالعات گذشته، برخی از ساب‌تایپ‌های انگل بلاستوسیتیس دارای آثار بیماری‌زایی بیشتری هستند (۱۵، ۲۵، ۲۶). با این وجود، بیماری‌زایی بلاستوسیتیس و ساب‌تایپ‌های آن و نیز اثر پروتئین محلول جدا شده از این انگل روی سلول رده گوارشی مشخص نیست و

پتانسیل بیماری‌زایی ساب‌تایپ‌های بلاستوسیتیس برای سال‌ها بحث برانگیز باقی مانده است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تفاوت بین ساب‌تایپی در بلاستوسیتیس جدا شده از افراد علامت‌دار و بدون علامت روی القای آپوپتوز سلولی در رده سلولی HT-29 در سال ۱۳۹۹ و در پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

## روش کار

## جداسازی و کشت بلاستوسیتیس:

این بررسی یک مطالعه تجربی است. نمونه‌های مدفوع از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه انگل‌شناسی واقع در مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از راه غذا و آب، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، بین سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. افراد با و بدون علامت از مطالعه پیشین مورد استفاده قرار گرفتند (۲۷). افراد دارای علامت کسانی بودند که از اسهال، درد شکمی، نفخ، حالت تهوع و یبوست بدون شناسایی عامل مشخص رنج می‌بردند. نمونه افراد بدون علامت نیز از افراد سالم و بدون هیچ‌گونه شکایت از ناراحتی گوارشی گرفته شد. بر این اساس ساب‌تایپ‌های ۱ تا ۳ و ۶ از ۳۰ ایزوله بلاستوسیتیس جدا شده از افراد دارای علائم بالینی و ساب‌تایپ ۱ تا ۳ بدون علامت از ۲۵ ایزوله بلاستوسیتیس جدا شده از حاملین بدون علامت بررسی شدند. این ایزوله‌ها از مجموعاً ۵۵ ایزوله مثبت که به مدت یک سال با استفاده از کشت خالص‌سازی می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. متأسفانه با توجه به ویژگی‌های انگل بلاستوسیتیس که توانایی زنده ماندن در محیط خالص را ندارند، سایر ایزوله‌های جدا شده از بین رفتند (۲۷). تمام نمونه‌های مدفوع از نظر وجود بلاستوسیتیس بررسی میکروسکوپی شدند. کشت نمونه‌های مدفوع در محیط *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) حاوی پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Sigma, SA)

میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین) حذف شدند. همچنین آمفوتریسین B (50 mg/mL) نیز برای از بین بردن مخمرها یا قارچ‌های رشته‌ای استفاده شد. فرآیند خالص‌سازی برای از بین بردن فلور باکتریایی به تدریج طی بیش از شش ماه و پس از ۱۰ تا ۱۲ پاساژهای متوالی انجام شد. انگل‌های خالص شده در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS غیرفعال شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. در نهایت هفت ایزوله شامل شش ایزوله از ساب‌تایپ‌های یک تا سه بلاستوسیسیتیس جدا شده از نمونه‌های مدفوع افراد دارای علامت و بدون علامت و یک ساب‌تایپ ۶ جدا شده از فرد دارای علامت وارد بخش نهایی مطالعه شدند (۳۱).

#### تهیه آنتی‌ژن محلول انگل بلاستوسیسیتیس:

انگل‌های دو تا سه روزه و در فاز لگاریتمی، سه بار در PBS استریل به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد شست‌وشو داده شدند. انگل‌ها با لام نئو بار شمارش شدند و تعداد  $1 \times 10^5$  انگل در میلی‌لیتر تهیه شد. در نهایت آنتی‌ژن محلول انگل‌های لیز شده به ترتیب با استفاده از سه چرخه انجماد-ذوب در نیتروژن مایع و حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه شدند. به منظور حذف باکتری‌های باقی مانده، آنتی‌ژن محلول با استفاده از فیلتر پلی اتیلن سولفون (PES) (Jet Biofil, Guangzhou, China) فیلتر شد (۳۱، ۳۲).

#### کشت رده سلولی HT-29:

رده سلولی HT-29 در یک فلاسک کشت  $25 \text{ cm}^2$  حاوی پنج میلی‌لیتر محیط رشد DMEM با گلوکز بالا کشت داده شد. این محیط کشت همچنین با ۵ درصد FBS (v/v) غیرفعال شده با حرارت، دو میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین (سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا) تکمیل شد. رده سلولی HT-29 سپس در یک انکوباتور با ۵ درصد  $\text{CO}_2$  و در رطوبت ۱۰۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به ۷۵ تا ۸۰ درصد رشد، انکوبه شد. متعاقباً، پس از پر شدن یک لایه سلولی HT-29، فلاسک کشت

۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین) همراه با سرم ۱۰ درصد جنین گاوی غیرفعال شده با حرارت (FBS, Sigma- Aldrich, USA) کشت داده شدند. نمونه‌ها در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و موارد مثبت هر ۳-۴ روز دوباره کشت داده شدند (۲۸).

#### استخراج DNA و تعیین ساب‌تایپ:

DNA ژنومی کشت‌های مثبت بلاستوسیسیتیس (۲۷) با استفاده از کیت استخراج DNA YTA (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) استخراج و تا زمان تکثیر PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

پرایمرهای RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') و BhrDr (5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3') برای تعیین ساب‌تایپ انگل بلاستوسیسیتیس استفاده شد (۲۹). پرایمرها قطعات تقریباً ۶۲۰-bp از ژن زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی (ssu rRNA) بلاستوسیسیتیس را تکثیر کردند. شرایط چرخه PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه در ۳۵ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنیلینگ ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شده و سپس با استفاده از دستگاه توالی‌یاب ABI 3130 تعیین توالی شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار Chromas ویرایش شدند. در نهایت ساب‌تایپ‌های انگل بلاستوسیسیتیس با استفاده از ابزار جست‌وجوی BLAST در بانک ژنتیکی تعیین شدند.

#### خالص‌سازی ساب‌تایپ‌های بلاستوسیسیتیس:

فرآیند خالص‌سازی طبق روشی که پیش از این طراحی شده است (۳۰) همراه با تغییراتی انجام شد (۳۱). در این راستا باکتری‌های همراه با حضور مخلوط آنتی‌بیوتیک (۴۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در

### تحلیل آماری:

برای بررسی آثار آنتی ژن بلاستوسیتیس مشتق شده از زیرگروه‌های ۱-۳ و ۶، آزمون ANOVA یک طرفه در GraphPad Prism گنجانده شد و پس از آن Tukey's post-test انجام شد. مقدار  $P < 0.05$  به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

ساب تایپ بلاستوسیتیس از افراد علامت‌دار (S) و بدون علامت (As) که منحصراً به انگل بلاستوسیتیس آلوده بودند، جدا شد. افراد علامت‌دار از ناراحتی شکمی و افراد بدون علامت، افراد سالم و بدون هیچ گونه ناراحتی شکمی بودند. در این مطالعه، هفت ایزوله بلاستوسیتیس (سه ایزوله از ساب تایپ های ۱-۳ از هر کدام از افراد با و بدون علامت و یک ایزوله از ساب تایپ ۶ جدا شده از فر دارای علامت) آزمایش شد. نتایج به وضوح نشان داد که همه زیرگروه‌های بلاستوسیتیس در مقایسه با non-treated control (NTC) دارای اثر سیتوپاتیک/بازدارنده بر رشد سلول‌های HT-29 داشتند. نتایج ما نشان داد که ساب تایپ های ۳ و ۶ جدا شده از افراد با علامت بالینی و ساب تایپ ۱ جدا شده از فرد بدون علامت در مقایسه با سایر زیرگروه‌ها اثر سیتوپاتیک بیشتری روی رده سلولی HT-29 داشتند. بر این اساس بیشترین مقدار مهار در ساب تایپ‌های ۱ از افراد بدون علامت و ۳ و ۶ جدا شده از افراد دارای علامت بالینی به ترتیب ۲۵ درصد، ۲۱/۴۸ درصد و ۲۰/۶۹ درصد دیده شد. با این حال، ارتباط آماری بین زیرگروه‌ها و همچنین علایم و اثر سیتوپاتیک مشاهده نشد ( $P\text{-value} = 0.11$ ) (شکل ۱).

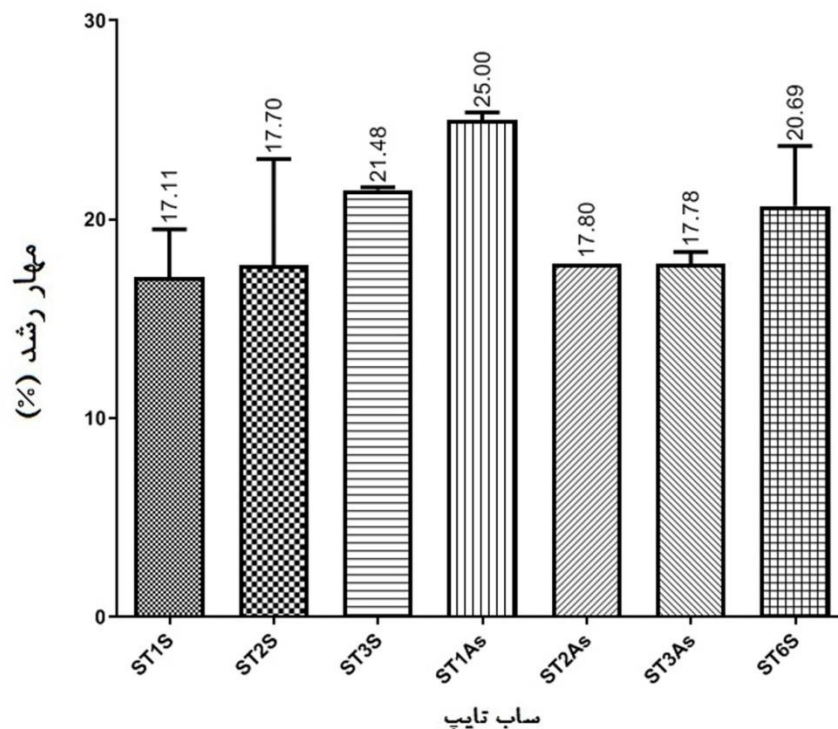
شده سه بار با  $\text{pH} = 7$  PBS شسته شد و با استفاده از trypsin- EDTA ۰/۲۵ درصد تریپسینه شد (Gibco, Canada). سوسپانسیون سلولی تریپسین شده در نسبت ۱:۱ با محلول تریپان بلو ۰/۲۵ درصد (w/v) رقیق شد (Gibco, USA) و تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون با لام نئوبار شمارش شد (۳۳). سلول‌های HT-29 برداشت شده ( $1 \times 10^5$  سلول در هر چاه) در حجم ۲۰۰ میکرولیتر محیط رشد DMEM با ۱۰ درصد FBS در پلیت ۹۶ چاهکی کشت شدند. کشت‌های سلولی در یک انکوباتور حاوی ۵ درصد  $\text{CO}_2$  در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شدند.

### سنجش MTT:

تکثیر/زنده ماندن سلولی با استفاده از روش MTT با استفاده از ترکیب ۳- (۴، ۵- دی متیل-۲- تiazولیل) -۲، ۵- دی فنیل-تترازولیوم برومید ارزیابی شد. به طور خلاصه، حجم ۳۰ میکرولیتر از آنتی ژن محلول (در غلظت نهایی  $1 \times 10^5$  انگل در میلی‌لیتر) به هر چاهک حاوی سلول‌های HT-29 اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار ساعت انکوبه شد. سپس مایع‌روبی به دقت از هر چاه خارج شد. به منظور حل کردن بلورهای فورمازان، ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (MP Biomedicals) اضافه شد. در نهایت، چگالی نوری (OD) هر چاهک با استفاده از ELISA reader (ELX808, Biotek) در طول موج ۵۷۰ نانومتر در مقایسه با طول موج مرجع ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### الزامات اخلاقی:

تمام روش‌های به کار برده شده در این مطالعه براساس استانداردهای اخلاقی تایید شده توسط کمیته اخلاق پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، است.



شکل ۱- میزان اثر سیتوپاتیک زیرگروه‌های بلاستوسیسیتیس (6 و 3-ST1) روی رده سلولی HT-29 با توجه به وجود علائم. S: علامت‌دار؛ As: بدون علامت

## بحث

ترش‌چی است (۱۲). محصولات ترش‌چی بلاستوسیسیتیس حاوی آنزیم‌های پروتئاز است که می‌توانند دفاع ایمنوگلوبولین رایج در سطوح مخاطی به نام ایمنوگلوبولین ترش‌چی انسانی A (sIgA) را بشکنند (۳۵). پروتئازهای سیستمین به عنوان رایج‌ترین پروتئازها، نفوذپذیری اپیتلیوم انسان را از طریق تعدیل کیناز/ فسفوریلاسیون مرتبط با rho در مسیر زنجیره سبک میوزین و بازآرایی مجموعه اتصال محکم سلول‌های اپیتلیوم افزایش می‌دهند (۳۶). وجود فاکتورهای بیماری‌زای ترش‌چی نیز با مطالعه گسترده ژنوم ثابت شد. Denoed و همکارانش نشان دادند که ساب‌تایپ ۷ بلاستوسیسیتیس می‌تواند سبب پاسخ ایمنی از طریق آنزیم‌های ترش‌چی و همچنین متابولیت‌ها و سموم باشد (۳۷). با این حال، به نظر می‌رسد پروتئازهای ترش‌چی شده از انگل‌های بلاستوسیسیتیس نقش مهمی در تعامل میزبان-انگل و اختلال در عملکرد روده را دارند (۱۴). به غیر از پروتئازها، سایر آنزیم‌ها و سموم ایجادکننده اسهال از کاندیداها

در مطالعه حاضر، نشان داده شد که ایزوله‌های بالینی بلاستوسیسیتیس، زیرگروه‌های ۱-۳ و ۶، قادر به القای اثر سیتوپاتیک بیشتری روی سلول‌های HT-29 بودند. تاکنون تفاوت بین ساب‌تایپ‌ها در القای پاسخ ایمنی میزبان و همچنین آپوپتوز سلولی بررسی قرار نشده بود. در سال‌های اخیر، مطالعات روی بیماری‌زایی بلاستوسیسیتیس و ساب‌تایپ‌های آن افزایش یافته است (۱۲، ۳۴). اگرچه برخی از مطالعات نشان داده‌اند که برخی از ساب‌تایپ‌ها احتمالاً بیماری‌زایی بیشتری از سایرین دارند، ارتباط واضحی بین ساب‌تایپ و پاتوژنز مشخص نشده است. در مطالعه‌ای که توسط Walderich و همکاران روی اثر سیتوپاتیک بلاستوسیسیتیس در دو رده سلولی CHO و HT-29 انجام شد، نشان داده شد که انگل بلاستوسیسیتیس قادر به القای اثر سیتوپاتیک از طریق برخی مولکول‌های ترش‌چی یا غیر



مورد نیاز است، مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت‌های ساب‌تایپی می‌تواند در شدت عوارض نقش داشته باشد.

هم‌راستا با مطالعه انجام شده توسط Walderich و همکاران، یافته‌های ما نشان داد که تمام ایزوله‌های بلاستوسیسیتیس از افراد علامت‌دار و بدون علامت، اثر سیتوپاتیک را با درجات مختلف ایجاد می‌کنند (۱۲). به هر حال نقطه قوت مطالعه ما در مقایسه با این مطالعه در مقایسه ۴ ساب‌تایپ با یکدیگر بود در حالی که در مطالعه Waderich و همکاران مقایسه در سطح ساب‌تایپ انجام نگرفته بود و تنها تأثیر انگل بلاستوسیسیتیس بررسی شده بود (۱۲). در مطالعه ما، اگرچه از نظر آماری تفاوت معناداری بین ایزوله‌های دریافت‌شده از افراد علامت‌دار و بدون علامت وجود نداشت، اما در مورد ساب‌تایپ‌های ۲ و ۳، ایزوله‌های به‌دست‌آمده از بیماران علامت‌دار اثر سیتوپاتیک بیشتری را نشان دادند. با این وجود، در مورد ساب‌تایپ ۱، ایزوله‌ای که از حامل‌های بدون علامت به دست آمد، در مقایسه با ایزوله علامت‌دار، اثرات سیتوپاتیک بیشتری نشان داد. با این حال، به نظر می‌رسد که اثرات بیماری‌زایی بلاستوسیسیتیس می‌تواند علاوه بر تفاوت‌های ژنتیکی انگل، با ویژگی‌های ایمونولوژیک میزبان نیز مرتبط باشد. به نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین دلایل نبود معناداری در تفاوت بین ساب‌تایپ‌ها می‌تواند مربوط به تعداد کم نمونه‌ها باشد و برای پوشش این مسئله بررسی تعداد بیشتر نمونه توصیه می‌شود. همچنین در مطالعه حاضر نمونه‌های کلینیکی بررسی شدند و برای بررسی بیشتر تفاوت‌های بین ساب‌تایپ‌ها روی بیماری‌زایی باید حتماً مطالعات روی مدل‌های حیوانی نیز انجام شود.

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر همراه با داده‌های پیشین نشان داد که حداقل برخی از ایزوله‌ها/سویه‌های بلاستوسیسیتیس ممکن است نقش بیماری‌زایی، به‌ویژه در میزبان‌هایی که پاسخ ایمنی کافی از طریق مسیرهای وابسته به ترشح یا مستقل ندارند را داشته باشند. در همین راستا مطالعه اخیر توسط Mohammad Rahimi و همکاران نشان داد که پروتئین محلول به دست آمده از ساب‌تایپ ۳ انگل بلاستوسیسیتیس جدا شده از افراد دارای علائم بالینی می‌تواند سبب تغییر در بیان

مولکولی ترشح شده از انگل‌های بلاستوسیسیتیس هستند که ممکن است در فیزیوپاتولوژی بلاستوسیسیتوز شرکت کنند (۱۲، ۳۷). اگرچه در مطالعه حاضر، اثر سیتوپاتیک بلاستوسیسیتیس از طریق مولکول‌ها و آنزیم‌هایی که در آنتی‌ژن‌های محلول انگل آزاد می‌شوند، بررسی شد، احتمالاً همان‌طور که برای ژیلاردیا لامبلیا و همچنین انتامبا هیستولیتیکا نیز نشان داده شده است، بلاستوسیسیتیس از طریق مولکول‌های لکتین مانند به سلول‌های هدف چسبیده و سبب ایجاد مکانیسم تخریبی می‌شود (۳۸، ۳۹). با این حال پیشنهاد می‌شود که بلاستوسیسیتیس بتواند هموستاز روده میزبان را با افزایش نفوذپذیری اپیتلیال و کاهش مقاومت ترانس-اپیتلیال از طریق بازآرایی رشته‌های اکتین قطع کند (۱۱، ۳۶، ۴۰). Long و همکاران در یک مطالعه آزمایشگاهی، سیتوکین‌های پیش‌التهابی تولید شده توسط سلول‌های اپیتلیال کولون تحت درمان با بلاستوسیسیتیس را ارزیابی کردند و افزایش فاکتور تحریک‌کننده کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ (GM-CSF) و اینترلوکین ۸ (IL8) را نشان دادند (۴۱). به نظر می‌رسد سیستمین پروتئین‌های ترشح شده از بلاستوسیسیتیس یاب‌تایپ ۴ می‌تواند تولید IL-8 را از سلول‌های اپیتلیال کولون انسانی (HT84) از طریق فاکتور هسته‌ای (NF- $\kappa$ B) القا کند (۴۲). علاوه بر این، نشان داده شده است که بلاستوسیسیتیس ساب‌تایپ ۴ آپوپتوز سلول‌های میزبان را در سلول‌های اپیتلیال روده موش صحرایی (IEC6) از طریق روشی مستقل از تماس تحریک می‌کند (۴۳). به عنوان یک نقطه ضعف، بررسی متون نشان می‌دهد که هیچ مطالعه جامعی برای بررسی اثر بیماری‌زایی ساب‌تایپ‌های مختلف بلاستوسیسیتیس وجود ندارد. وجود فعالیت سیتوپاتیک بیشتر در ساب‌تایپ‌های ۱، ۳ و ۶ در این مطالعه تأییدکننده یافته‌های مطالعه پیشین توسط Karamati و همکاران است که نشان می‌داد ساب‌تایپ‌های ۱، ۳ و ۶ جدا شده از افراد با علائم بالینی دارای فعالیت پروتئازی بیشتری هستند و در نتیجه احتمالاً فعالیت سیتوپاتیک بیشتری دارند (۳۱). اگرچه هنوز مطالعات زیادی برای یافتن تأثیر تفاوت‌های ژنتیکی در انگل بلاستوسیسیتیس روی سیر بیماری و نیز علائم بالینی ایجاد شده

مالی شده است. نویسندگان از همکاری تمامی کارکنان مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب کمال تشکر و قدردانی را دارند.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در کمیته اخلاق پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بررسی و با کد اخلاق IR.SBMU.IRGLD.REC.1395.83 ثبت شده است.

## تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

پروتئین‌های مهم در اتصالات سلولی و نیز میکرو آرنا (micro RNA) دخیل در پیوستگی بافت روده شده و در شکل‌گیری علائم بالینی نقش داشته باشد (۴۴).

## نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بلاستوسیسیتیس ساب‌تایپ‌های ۱ تا ۳ و ۶ قادر به القای اثر سیتوپاتیک در رده سلولی HT29 بودند. اگرچه بین ایزوله‌های علامت‌دار و بدون علامت تفاوت وجود داشت، اما به نظر می‌رسد که ویژگی‌های ایمنولوژیک میزبان نقش اساسی در پاسخ به بلاستوسیسیتیس دارد. در واقع، مقایسه بین ساب‌تایپ‌ها نشان داد که ساب‌تایپ ۲ اثر خفیف‌تری را القا می‌کند. با این حال، بیماری‌زایی بلاستوسیسیتیس و تفاوت بین ساب‌تایپ‌ها بحث برانگیز باقی مانده است و نیاز به بررسی‌های مقایسه‌ای بیشتری دارد. برای پوشش این مسئله حتماً مطالعات روی مدل‌های حیوانی نیز باید انجام شود.

مهم‌ترین نقطه قوت مطالعه حاضر در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده در دنیا در مقایسه ساب‌تایپ‌های شایع انگل بلاستوسیسیتیس با یکدیگر در اثر سیتوپاتیک روی سلول رده گوارشی است. همچنین در مطالعه ما ایزوله‌های کلینیکی جدا شده از افراد دارا و بدون علامت بالینی بررسی شدند، در حالی که در سایر مطالعات تنها یک یا چند ایزوله محدود بررسی شدند. از مهم‌ترین محدودیت‌های مطالعه ما عدم به دست آمدن و مقایسه ایزوله بلاستوسیسیتیس ساب‌تایپ ۶ از افراد بدون علامت بالینی بود. همچنین به دلیل محدودیت‌های مالی و آزمایشگاهی تنها دو ایزوله از هر ساب‌تایپ بررسی شد، در حالی که بهتر بود برای هر ساب‌تایپ بیش از دو ایزوله بررسی می‌شد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه آقای سید احمد کرامتی در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (شماره ثبت: M341) و توسط پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (grant no. 887) حمایت



## References

- Duda A, Kosik-Bogacka D, Lanocha-Arendarczyk N, Kołodziejczyk L, Lanocha A. The prevalence of *Blastocystis hominis* and other protozoan parasites in soldiers returning from peacekeeping missions. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(4):805-6.
- Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):639-65.
- Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 2016;65(6 Pt B):763-71.
- Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of the box. *Trends Parasitol.* 2012;28(8):305.
- Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol.* 2015;31:296-9.
- Alinaghizade A, Mirjalali H, Mohebbali M, Stensvold CR, Rezaeian M. Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infect Genet Evol.* 2017;50:77-82.
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 2013;126(1):11-8.
- AbuOdeh R, Ezzedine S, Samie A, Stensvold CR, ElBakri A. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infect Genet Evol.* 2016;37:158-62.
- Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, Paoletti M, Cancrini G. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiol Infect.* 2016;144(3):635-46.
- D'Alfonso R, Santoro M, Essi D, Monsia A, Kaboré Y, Glé C, et al. *Blastocystis* in Côte d'Ivoire: molecular identification and epidemiological data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(11):2243-50.
- Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.* 2013;1(5):167-78.
- Walderich B, Bernauer S, Renner M, Knobloch J, Burchard GD. Cytopathic effects of *Blastocystis hominis* on Chinese hamster ovary (CHO) and adeno carcinoma HT29 cell cultures. *Trop Med Int Health : TM & IH.* 1998;3(5):385-90.
- Rajamanikam A, Govind SK. Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):295.
- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002545.
- El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(6):1203-6.
- Surangsrirat S, Thamrongwittawatpong L, Piyaniran W, Naaglor T, Khoprasert C, Taamasri P, et al. Assessment of the association between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome. *J Med Assoc Thai.* 2010;93 Suppl 6:S119-24.
- Ragavan ND, Kumar S, Chye TT, Mahadeva S, Shiaw-Hooi H. *Blastocystis* sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS)--Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy. *PLoS One.* 2015;10(9):e0121173.
- Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, et al. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res.* 2012;110(3):1269-75.
- Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, et al. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(5):724-7.
- Chandramathi S, Suresh K, Shuba S, Mahmood A, Kuppusamy UR. High levels of oxidative stress in rats infected with *Blastocystis hominis*. *Parasitology.* 2010;137(4):605-11.
- Balakrishnan DD, Kumar SG. Higher Caspase-like activity in symptomatic isolates of *Blastocystis* spp. *Parasite Vectors.* 2014;7(1):219.
- Ajjampur SS, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KS. Ex vivo and in vivo mice models to study *Blastocystis* spp. adhesion, colonization and pathology: closer to proving Koch's postulates. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160458.
- Wang W, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ, Cuttall L, Owen H. Location and pathogenic potential of

- Blastocystis* in the porcine intestine. PLoS One. 2014;9(8):e103962.
24. Pavanelli MF, Kaneshima EN, Uda CF, Colli CM, Falavigna-Guilherm AL, Gomes ML. Pathogenicity of *Blastocystis* sp. to the gastrointestinal tract of mice: relationship between inoculum size and period of infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57(6):467-72.
25. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Gräfe U, et al. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. Parasitol Int. 2010;59(3):469-71.
26. Vassalos CM, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N. Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp Subtype 3. Am J Clin Pathol. 2010;133(2):251-8.
27. Rezaei Riabi T, Mirjalali H, Haghghi A, Rostami Nejad M, Pourhoseingholi MA, Poirier P, et al. Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. Infect Genet Evol. 2018;61:119-26.
28. Rezaei Riabi T, Haghghi A, Mirjalali H, Mohammad Ali Gol S, Karamati SA, Ghasemian M, et al. Study of prevalence, distribution and clinical significance of *Blastocystis* isolated from two medical centers in Iran. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2017;10(Suppl1):S102-s7.
29. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. Protist. 2006;157(1):77-85.
30. Zierdt CH, Williams RL. *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. Exp Parasitol. 1974;36(2):233-43.
31. Karamati SA, Mirjalali H, Niyyati M, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, Haghghi A, et al. Association of *Blastocystis* ST6 with higher protease activity among symptomatic subjects. BMC Microbiol. 2021;21(1):285.
32. Karamati SA, Mirjalali H, Niyyati M, Rezaei Riabi T, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, et al. Comprehensive study of phenotypic and growth rate features of *Blastocystis* subtypes 1-3 and 6 in symptomatic and asymptomatic subjects. Iran J Parasitology. 2019;14(2):204-13.
33. Azimirad M, Alebouyeh M, Naji T. Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin 8 in human adenocarcinoma cell line HT-29 by spore probiotics: *B. coagulans* and *B. subtilis* (natto). Probiotics Antimicrob Proteins. 2017;9(1):56-63.
34. Chandramathi S, Suresh K, Kuppusamy UR. Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. Parasitol Res. 2010;106(4):941-5.
35. Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. Parasitol Res. 2005;97(5):386-9.
36. Mirza H, Wu Z, Teo JD, Tan KS. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. Cell Microbiol. 2012;14(9):1474-84.
37. Denoëud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. Genome Biol. 2011;12(3):R29.
38. Thompson R, Reynoldson J, Mendis A. *Giardia* and giardiasis. Adv Parasitol. 1993;32:71-160.
39. Kain KC, Ravdin JI. Galactose-specific adhesion mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Model for study of enteric pathogens. Method Enzymol. 253: Academic Press; 1995. p. 424-39.
40. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. Curr Infect Dis Rep. 2010;12(1):28-35.
41. Long HY, Handschack A, König W, Ambrosch A. *Blastocystis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. Parasitol Res. 2001;87(12):1029-30.
42. Puthia MK, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. Eukaryot Cell. 2008;7(3):435-43.
43. Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. Infect Immun. 2006;74(7):4114-23.
44. Mohammad Rahimi H, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, Mirjalali H, Zali MR. Modulation of microRNAs and claudin-7 in Caco-2 cell line treated with *Blastocystis* sp., subtype 3 soluble total antigen. BMC Microbiol. 2022;22(1):111.