Pejouhesh dar Pezeshki *(i.e., Research in Medicine)* *Original Article*

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 1

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[1,2], Sara Soleimani Jevinani[3], Maryam Niyyati[2*], Hamed Mirjalali[3*]

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 1×10^5 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, 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.

[*] **Corresponding Author:**
Name: Maryam Niyyati; **Email:** maryamniyati@yahoo.com
Name: Hamed Mirjalali; **Email:** hamedmirjalali@sbmu.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۱، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۴۳ تا ۵۲

مطالعه مقدماتی آثار سیتوپاتیک ساب‌تایپ‌های ۳-۱ و ۶ بلاستوسیستیس در رده سلولی HT-29

سید احمد کرامتی[۱،۲]، سارا سلیمانی جوینانی[۳]، مریم نیتی[۲*]، حامد میرجلالی[۳*]

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 ساب‌تایپی 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 تایپ های ۱ تا ۳ و ۶ از ۳۰ ایزوله بلاستوسیستیس جدا شده از افراد دارای علایم بالینی و ساب تایپ‌های ۱ تا ۳ از ۲۵ ایزوله بلاستوسیستیس جدا شده از حاملان بدون علامت بود. پس از خالص‌سازی و شمارش میکروارگانیسم‌ها، آنتی‌ژن محلول بلاستوسیستیس از ۱×۱۰^{۵} میکروارگانیسم 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 علایم، 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 ستوپاتیک در ساب تایپ ۱جدا شده از افراد بدون علامت (۲۵درصد) و کمترین آثار سایتوپاتیک در ساب تایپ ۱ جدا شده از افراد با علامت بالینی (۱۷/۱۱درصد) دیده شد. با این حال، هیچ ارتباط آماری بین ساب تایپ‌ها و همچنین علایم بالینی با اثر سیتوپاتیک وجود نداشت (P-value =۰/۱۱).

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 ویژگی های 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؛ علایم 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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

مقدمه

در سال‌های اخیر بررسی اثر انگل بلاستوسیستیس روی سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های رده گوارشی مانند HT-29 توجه زیادی را جلب کرده است. بلاستوسیستیس انگل تک یاخته‌ای رایج در روده انسان با اشکال مورفولوژیکی و فرآیندهای تولیدمثلی مختلف است (۱، ۲). تک یاخته بلاستوسیستیس 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 بلاستوسیستیس به طور گسترده بررسی شده است (۱۰-۵)، آثار بالقوه بیماری‌زای بلاستوسیستیس برای سال‌ها یک مسئله حل‌نشده باقی‌مانده است (۱۴-۱۱). بحث جدی در مورد بیماری‌زایی ارگانیسم بلاستوسیستیس 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 علایم گوارشی و عفونت بلاستوسیستیس را گزارش کرده‌اند (۱۹-۱۵). اخیراً افزایش آسیب اکسیداتیو در اثر تلقیح بلاستوسیستیس انسانی نشان داده شده است (۲۰). همچنین برخی از مطالعات آثار سیتوپاتیک بالقوه بلاستوسیستیس 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 بلاستوسیستیس مشاهده شده است (۲۳). از سوی دیگر، وجود انگل در بافت‌های مختلف روده و لایه عضلانی سکوم نشان‌دهنده ویژگی‌های تهاجمی بلاستوسیستیس از طریق شروع پاسخ التهابی است (۲۴).

با این حال، با استناد بر مطالعات گذشته، برخی از ساب تایپ‌های اتگل بلاستوسیستیس دارای آثار بیماری‌زایی بیشتری هستند (۱۵، ۲۵، ۲۶). با این وجود، بیماری‌زایی بلاستوسیستیس و ساب تایپ‌های آن و نیز اثر پروتئین محلول جدا شده از این انگل روی سلول رده گوارشی مشخص نیست و پتانسیل بیماری‌زایی ساب تایپ‌های بلاستوسیستیس برای سال‌ها بحث برانگیز باقی مانده است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تفاوت بین ساب تایپی در بلاستوسیستیس 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 بلاستوسیستیس:

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 ساب تایپ‌های ۱ تا ۳ و ۶ از ۳۰ ایزوله بلاستوسیستیس جدا شده از افراد دارای علائم بالینی و ساب تایپ ۱ تا ۳ بدون علامت از ۲۵ ایزوله بلاستوسیستیس جدا شده از حاملین بدون علامت بررسی شدند. این ایزوله ها از مجموعاً ۵۵ ایزوله مثبت که به مدت یک سال با استفاده از کشت خالص‌سازی می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. متاسفانه 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 بلاستوسیستیس 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)،

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

(۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین) همراه با سرم ۱۰درصد 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 ۴-۳ روز دوباره کشت داده شدند (۲۸).

استخراج DNA و تعیین ساب تایپ:

DNA ژنومی کشت‌های مثبت بلاستوسیستیس (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′-GAGCTTTTTAACTGCAACAACG-3′) برای تعیین ساب تایپ انگل بلاستوسیستیس استفاده شد (۲۹). پرایمرها قطعات تقریباً ۶۲۰-bp از ژن زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی (ssu rRNA) بلاستوسیستیس 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 سانتی گراد 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 ۱/۵درصد بارگذاری شده و سپس با استفاده از دستگاه توالی یاب ABI 3130 تعیین توالی شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار Chromas ویرایش شدند. در نهایت ساب تایپهای انگل بلاستوسیستیس با استفاده از ابزار جست‌وجوی BLAST در بانک ژنتیکی تعیین شدند.

خالص‌سازی ساب تایپ‌های بلاستوسیستیس:

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 آنتی بیوتیک (۴۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی سیلین، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰۰ واحد پنی سیلین) 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 ساب تایپ های یک تا سه بلاستوسیستیس جدا شده از نمونه‌های مدفوع افراد دارای علامت و بدون علامت و یک ساب تایپ ۶ جدا شده از فرد دارای علامت وارد بخش نهایی مطالعه شدند (۳۱).

تهیه آنتی‌ژن محلول انگل بلاستوسیستیس:

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 نئوبار شمارش شدند و تعداد ۱×۱۰^{۵} 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 باکتری های باقی مانده، آنتی ژن 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 cm^2 ۲۵ 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 میلی مولار ال- گلوتامین، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین (سیگما آلدریچ، ایالات متحده آمریکا) تکمیل شد. رده سلولی HT-29 سپس در یک انکوباتور با ۵درصد CO_2 و در رطوبت ۱۰۰درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به ۷۵ تا۸۰درصد رشد، انکوبه شد. متعاقباً، پس از پر شدن یک لایه سلولی HT-29، فلاسک کشت

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

شده سه بار با PBS (pH = 7) شسته شد و با استفاده از trypsin- EDTA ۰/۲۵درصد تریپسینه شد (Gibco, Canada). سوسپانسیون سلولی تریپسین شده در نسبت ۱:۱ با محلول تریپان بلو ۰/۰۲۵ درصد (w/v) رقیق شد (Gibco, USA) و تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون با لام نئوبار شمارش شد (۳۳). سلول‌های HT-29 برداشت شده (۱×۱۰^{۵} 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 ۵درصد 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- تیازولیل) -۲، 5- دی فنیل- تترازولیوم بromید ارزیابی شد. به طور خلاصه، حجم ۳۰ میکرولیتر از آنتی ژن محلول (در غلظت نهایی ۱×۱۰^{۵} 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 مایع‌رویی 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 با کد IR.SBMU.IRGLD.REC.1395.83 تایید شده توسط کمیته اخلاق پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، است.

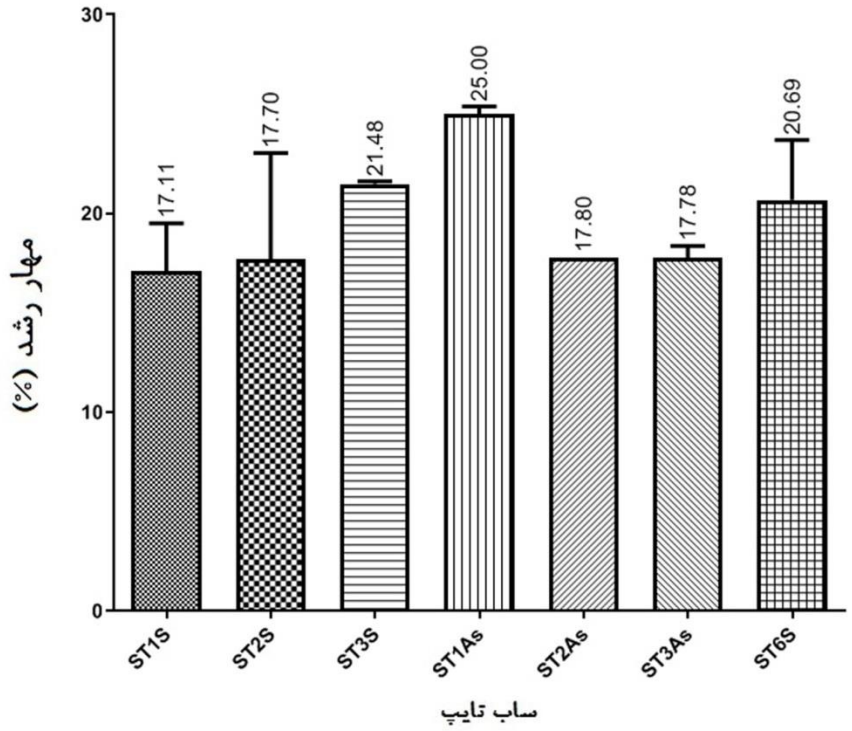
تحلیل آماری:

برای بررسی آثار آنتی ژن بلاستوسیستیس 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 $P < ۰/۰۵$ به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ساب تایپ بلاستوسیستیس از افراد علامت‌دار (S) و بدون علامت (As) که منحصراً به انگل بلاستوسیستیس 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 بلاستوسیستیس (سه ایزوله از ساب تایپ های ۳-۱ 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 بلاستوسیستیس 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 ۲۵درصد، ۲۱/۴۸ درصد و ۲۰/۶۹درصد دیده شد. با این حال، ارتباط آماری بین زیرگروه‌ها و همچنین علایم و اثر سیتوپاتیک مشاهده نشد (P-value =۰/۱۱) (شکل ۱).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]



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

بحث

در مطالعه حاضر، نشان داده شد که ایزوله‌های بالینی بلاستوسیستیس، زیرگروه‌های ۳-۱ و ۶، قادر به القای اثر سیتوپاتیک بیشتری روی سلول‌های HT-29 بودند. تاکنون تفاوت بین ساب تایپی در القای پاسخ ایمنی میزبان و همچنین آپوپتوز سلولی بررسی قرار نشده بود. در سال‌های اخیر، مطالعات روی بیماری‌زایی بلاستوسیستیس و ساب تایپ‌های آن افزایش یافته است (۱۲، ۳۴). اگرچه برخی از مطالعات نشان داده‌اند که برخی از ساب تایپ‌ها احتمالاً بیماری‌زایی بیشتری از سایرین دارند، ارتباط واضحی بین ساب تایپ و پاتوژنز مشخص نشده است. در مطالعه‌ای که توسط Walderich و همکاران روی اثر سیتوپاتیک بلاستوسیستیس در دو رده سلولی CHO و HT-29 انجام شد، نشان داده شد که انگل بلاستوسیستیس قادر به القای اثر سیتوپاتیک از طریق برخی مولکول‌های ترشحی یا غیر ترشحی است (۱۲). محصولات ترشحی بلاستوسیستیس حاوی آنزیم‌های پروتئاز است که می‌توانند دفاع ایمونوگلوبولین رایج در سطوح مخاطی به نام ایمونوگلوبولین ترشحی انسانی A (sIgA) را بشکنند (۳۵). پروتئازهای سیستئین 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 سلول های اپیتلیوم افزایش می‌دهند (۳۶). وجود فاکتورهای بیماری‌زای ترشحی نیز با مطالعه گسترده ژنوم ثابت شد. Denoeud و همکارانش نشان دادند که ساب تایپ ۷ بلاستوسیستیس می‌تواند سبب پاسخ ایمنی از طریق آنزیم‌های ترشحی و همچنین متابولیت‌ها و سموم باشد (۳۷). با این حال، به نظر می‌رسد پروتئازهای ترشح شده از انگل‌های بلاستوسیستیس 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 کاندیداهای

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

مولکولی ترشح شده از انگل‌های بلاستوسیستیس هستند که ممکن است در فیزیوپاتولوژی بلاستوسیستوز شرکت کنند (۱۲، ۳۷). اگرچه در مطالعه حاضر، اثر سیتوپاتیک بلاستوسیستیس از طریق مولکول‌ها و آنزیم‌هایی که در آنتی‌ژن‌های محلول انگل آزاد می‌شوند، بررسی شد، احتمالاً همان‌طور که برای ژیاردیا لامبلیا و همچنین انتامبا هیستولیتیکا نیز نشان داده شده است، بلاستوسیستیس از طریق مولکول‌های لکتین مانند به سلول‌های هدف چسبیده و سبب ایجاد مکانیسم تخریبی می‌شود (۳۸، ۳۹). با این حال پیشنهاد می‌شود که بلاستوسیستیس 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 بلاستوسیستیس را ارزیابی کردند و افزایش فاکتور تحریک‌کننده کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ (GM- CSF) و اینترلوکین ۸ (IL8) را نشان دادند (۴۱). به نظر می‌رسد سیستئین پروتئازهای ترشح شده از بلاستوسیستیس یاب تایپ ۴ می‌تواند تولید IL-8 را از سلول‌های اپیتلیال کولون انسانی (HT84) از طریق فاکتور هسته‌ای κB (NF- kB) القا کند (۴۲). علاوه بر این، نشان داده شده است که بلاستوسیستیس ساب تایپ ۴ آپوپتوز سلول‌های میزبان را در سلوهای 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 ساب تایپ‌های مختلف بلاستوسیستیس وجود ندارد. وجود فعالیت سیتوپاتیک بیشتر در ساب تایپ‌های ۱، ۳ و ۶ در این مطالعه تاییدکننده یافته‌های مطالعه پیشین توسط Karamati و همکاران است که نشان می‌داد ساب تایپ‌های ۱، ۳ و ۶ جدا شده از افراد با علایم 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 بلاستوسیستیس روی سیر بیماری و نیز علایم بالینی ایجاد شده مورد نیاز است، مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت‌های ساب تایپی می‌تواند در شدت عوارض نقش داشته باشد.

هم‌راستا با مطالعه انجام شده توسط Walderich و همکاران، یافته‌های ما نشان داد که تمام ایزوله‌های بلاستوسیستیس 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 ساب تایپ با یکدیگر بود در حالی که در مطالعه Waderich و همکاران مقایسه در سطح ساب تایپ انجام نگرفته بود و تنها تأثیر انگل بلاستوسیستیس 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 ساب تایپ‌های ۲ و ۳، ایزوله‌های به‌دست‌آمده از بیماران علامت‌دار اثر سیتوپاتیک بیشتری را نشان دادند. با این وجود، در مورد ساب تایپ ۱، ایزوله‌ای که از حامل‌های بدون علامت به دست آمد، در مقایسه با ایزوله علامت دار، اثرات سیتوپاتیک بیشتری نشان داد. با این حال، به نظر می‌رسد که اثرات بیماری‌زایی بلاستوسیستیس 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 ساب تایپ‌ها 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 ساب تایپ‌ها 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 بلاستوسیستیس 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 ساب تایپ ۳ انگل بلاستوسیستیس جدا شده از افراد دارای علایم بالینی می‌تواند سبب تغییر در بیان

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

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

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بلاستوسیستیس ساب تایپ‌های 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 ایمونولوژیک میزبان نقش اساسی در پاسخ به بلاستوسیستیس دارد. در واقع، مقایسه بین ساب تایپ‌ها نشان داد که ساب تایپ ۲ اثر 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. 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 ساب تایپ‌های شایع انگل بلاستوسیستیس با یکدیگر در اثر سایتوپاتیک روی سلول رده گوارشی است. همچنین در مطالعه ما ایزوله‌های کلینیکی جدا شده از افراد دارا و بدون علامت بالینی بررسی شدند، در حالی‌که در سایر مطالعات تنها یک یا چند ایزوله محدود بررسی شدند. از مهم‌ترین محدودیت‌های مطالعه ما عدم به دست آمدن و مقایسه ایزوله بلاستوسیستیس ساب تایپ ۶ از افراد بدون علامت بالینی بود. همچنین به دلیل محدودیت‌های مالی و آزمایشگاهی تنها دو ایزوله از هر ساب تایپ بررسی شد، در حالی‌که 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 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 منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

References

1. 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.

2. Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65.

3. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. Parasitol Int. 2016;65(6 Pt B):763-71.

4. Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of the box. Trends Parasitol. 2012;28(8):305.

5. 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.

6. Alinaghizade A, Mirjalali H, Mohebali 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.

7. 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.

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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. Rajamanikam A, Govind SK. Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. Parasit Vectors. 2013;6(1):295.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. Balakrishnan DD, Kumar SG. Higher Caspase-like activity in symptomatic isolates of *Blastocystis* spp. Parasite Vectors. 2014;7(1):219.

22. 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.

23. Wang W, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ, Cuttell L, Owen H. Location and pathogenic potential of

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]

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, Haghighi 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, Haghighi 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, Haghighi 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. Denoeud 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.11.0]