مقاله پژوهشی

تأثیر ال– آرژنین بر بلاستوسیستیس زیرگروه ۳ در شرایط آزمایشگاهی

نویسندگان:

مریم احمدی[۱]، جاوید صدرایی[۲*]، عبدالحسین دلیمی[۳]، مجید پیرستانی[۴]

۱–دانشجوی دکترای انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲– دانشیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳– استاد گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴– استادیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.4, Winter 2024

چکیده:

مقدمه: ال– آرژنین به عنوان یک سوبسترا سبب تحریک آنزیم اکسید نیتریک سنتاز القاکننده (iNOS) شده که خود باعث سنتز اکسید نیتریک در سلول‌های اپیتلیال روده و حذف انگل روده‌ای تک سلولی مشترک بین انسان و حیوان به نام بلاستوسیستیس می‌شود. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تاثیر ال– آرژنین بر زیر گروه ۳ بلاستوسیستیس در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش کار: انگل در محیط کشت DMEM-F12 فاقد آرژنین کشت داده شد و سپس زیر گروه آن با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ، زیر گروه ۳ شناسایی شد. آزمایش‌های MTT و فلوسایتومتری به ترتیب برای سنجش میزان سمیت و مرگ سلولی در سلول‌های CaCO2 پس از مواجهه با ال– آرژنین و مترونیدازول انجام شد. تاثیر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ میلی‌مول ماده ال–آرژنین و غلظت های ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی مترونیدازول بر تروفوزوئیت‌های بلاستوسیستیس در دو دوره ۲۴ و ۴۸ ساعتی بررسی شد. در نهایت تعداد سلول‌های زنده با رنگ آمیزی تریپان بلو و به وسیله لام نئوبار شمارش و غلظت IC50 دارو و ماده مورد استفاده مشخص شد.

یافته‌ها: بعد از ۴۸ ساعت، تعداد تروفوزوئیت‌های زنده بلاستوسیستیس با افزایش غلظت ال– آرژنین به طور چشمگیری کاهش یافت. همچنین میزان تروفوزوئیت‌های زنده در غلظت ۱/۶ میلی‌مول ۳۳/۸۳ درصد تعیین شد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: ال– آرژنین در غلظت‌های بالا قادر به مهار رشد تروفوزوئیت‌های بلاستوسیستیس در شرایط آزمایشگاهی است.

واژگان کلیدی: بلاستوسیستیس، آرژنین، فلوسایتومتری، شرایط آزمایشگاهی

Pars J Med Sci 2024;21(4):36-45

مقدمه:

بلاستوسیستیس (Blastocystis) یک انگل تک‌یاخته‌ای، غیرمهاجم و خارج سلولی روده انسان و طیف وسیعی از حیوانات است. این انگل انتشار جهانی داشته و یکی از شایع ترین انگل‌های روده‌ای انسان محسوب می‌شود که شیوع آن در کشورهای در حال توسعه ۵۰ درصد و در کشورهای توسعه یافته ۱۰ درصد تخمین زده می‌شود [۱]. این انگل از نظر تاکسونومی در گروه Stramenopile قرار دارد و از نظر ژنتیکی بسیار متغیر است. بر اساس تحلیل ژن Small Sub Unit (SSU) rRNA تاکنون ۲۲ زیر گروه برای آن شناسایی شده که زیر گروه‌های ۹،۱ و ۱۲ در انسان گزارش شده‌است [۲]. زیر گروه ۳ شایع‌ترین زیر گروه بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک است [۳]. زیر گروه‌های مختلف از نظر بیولوژیکی تفاوت‌های شگفت انگیزی دارند، ولی از نظر مقاومت دارویی، پاسخ ایمنی و بیماری‌زایی متفاوت هستند [۲]. انتقال انگل بلاستوسیستیس در انسان و حیوانات معمولاً به صورت مدفوعی – دهانی بوده و بیماری‌زایی آن بسیار بحث برانگیز است. در برخی افراد آلوده، هیچ‌گونه علایم بالینی مشاهده نمی‌شود، در حالی که در بعضی دیگر، نشانه‌های شایع عفونت روده‌ای از قبیل درد شکمی، استفراغ، نفخ، اسهال

* نویسنده مسئول، نشانی: دانشیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

شماره تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۸۴۱ تلفن همراه: ۰۹۱۲۵۰۱۶۲۵۴ پست الکترونیک: sadraeij@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۳ اصلاح: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲ پذیرش:۱۴۰۳/۰۱/۱۱

آبکی و موکوسی دیده شده‌است. مشکلات پوستی و سندروم روده تحریک‌پذیر به شدت با عفونت‌های بلاستوسیستیس در ارتباطند [۴ و ۵]. مترونیدازول داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های بلاستوسیستیس است، ولی عوارضی از قبیل سردرد، التهاب زبان، کهیر، خارش، سرگیجه، حالت تهوع، خشکی دهان و استفراغ برای آن گزارش شده‌است. این دارو پتانسیل سرطان زایی و جهش زایی دارد. همچنین مترونیدازول روی جنین تاثیر زیان باری داشته و مقاومت دارویی آن درحال افزایش است. با توجه به این موارد، مطالعات گوناگونی در راستای یافتن درمان مناسب جایگزین برای عفونت‌های بلاستوسیستیس انجام شده‌است [۶]. آرژنین یک اسیدآمینه نیمه ضروری و چندوجهی است که در دهه‌های گذشته توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده‌است. این ماده علاوه بر داشتن نقش در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مهم از جمله سنتز پروتئین‌ها، اوره و پلی آمین‌ها، در افراد در حال رشد و بزرگسالان سالم از طریق واکنش‌های کاتابولیک در روده و کلیه به اندازه کافی ساخته می‌شود. آرژنین در وضعیت بیماری و در مراحل مختلف بیماری‌های قلبی – عروقی و دیابت اثرات متفاوتی از خود نشان می‌دهد [۷]. این دارو سوبسترای اصلی برای دو آنزیم مهم یعنی اکسیدنیتریک سنتتاز القاکننده (iNOS) و آرژیناز است. بسته به نوع سایتوکاین تولیدی توسط سیستم ایمنی، ال- آرژنین می‌تواند توسط آرژیناز استفاده شده و باعث تولید ال- اورنیتین و در نهایت پلی‌آمین‌ها شود. پلی‌آمین‌ها به عنوان مولکول‌های کاتیونیکی ریز در بسیاری از فعالیت‌های مهم سلولی از جمله تکثیر و انتقال سلولی دخالت دارند و یا توسط آنزیم iNOS مورد استفاده قرار گرفته، تولید اکسید نیتریک (NO) می‌کنند. اکسید نیتریک یک مولکول مهم بیولوژیک و تنظیم کننده سیستم‌های ایمنی، قلبی – عروقی و عصبی است. این ماده یک محرک قوی سیستم ایمنی و یک مدیاتور سیتوتوکسیک در مسیر ایمنی محسوب می‌شود که در التهاب، عفونت و دفع پیوند نقش مهمی بازی می‌کند. اکسید نیتریک همچنین فعالیت ضدمیکروبی بسیار قوی داشته و با طیف وسیعی از مولکول‌ها همچون DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای باکتری‌ها، پروتوزواها، قارچ‌ها و انگل‌های کرمی واکنش داده و موجب تخریب آن‌ها می‌شود [۸]. در برابر بلاستوسیستیس موجود در مجرای روده، پاسخ ایمنی ذاتی سبب سنتز اکسید نیتریک در سلول‌های اپیتلیال روده میزبان و تخریب پاتوژن می‌شود [۹]. بلاستوسیستیس، آرژنین را از طریق آنزیم آرژیناز خود مصرف کرده و میزان تولید اکسید نیتریک میزبان را کاهش و سنتز پلی آمین را افزایش می‌دهد که به نفع رشد و بقای انگل است [۱]. نتایج مطالعه‌ای روی ژیاردیا نشان داد زمانی که آرژنین به صورت اگزوژن و در غالب مکمل یا دارو وارد بدن می‌شود، باعث معکوس شدن واکنش‌ها و تولید بیشتر اکسید نیتریک می‌شود که تهدیدی برای بقا انگل خواهدبود [۱۰]. نکته قابل توجه این است که چون اکسید نیتریک، سیستئین پروتئاز را خنثی می‌کند، بلاستوسیستیس‌هایی که به مترونیدازول مقاوم هستند و سیستئین پروتئاز بیشتری تولید می‌کنند در برابر اکسید نیتریک حساس‌تر بوده و به خوبی حذف می‌شوند [۱]. هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی تاثیر ال- آرژنین روی رشد بلاستوسیستیس و تعیین درصد حیات به وسیله آزمایش ممانعت از رشد تروفوزوئیت‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو، بررسی میزان سمیت ال- آرژنین روی سلول‌های CaCO2 با آزمایش MTT و تعیین میزان آپوپتوز و نکروز سلول‌های CaCO2 با استفاده از آزمایش فلوسایتومتری بود.

روش کار:

کشت انگل

در این مطالعه نمونه انگل از آرشیو گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و در محیط DMEM-F12 عاری از آرژنین کشت داده شد و سپس با آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) زیر گروه آن تعیین شد.

آزمایش PCR برای تعیین زیرگروه

از انگل‌های موجود در محیط کشت به وسیله کیت کیاژن QIA amp DNA Stool mini Kit, Cat.No.51504) و طبق پروتکل شرکت سازنده، DNA استخراج و در۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکسر (Master Mix)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر F، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر R، ۵ میکرولیتر آب مقطر و ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده، بود. پرایمرهای زیر که متعلق به زیرگروه ۳ هستند، مورد استفاده قرار گرفتند.

F: TAGGATTTGGTGTTTGGAGA
R: TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG

در واکنش PCR، ابتدا سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه شامل: ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مرحله دناتوره شدن، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای مرحله اتصال Annealing، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای مرحله طویل شدن و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مرحله طویل شدن نهایی (Final Extension) اجرا شد. محصول PCR به دست‌آمده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد همراه با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و الکتروفورز شد و از طریق دستگاه اشعه فرابنفش تحلیل انجام شد. در نهایت باندی به اندازه ۵۲۶ bp که نشان دهنده زیرگروه ۳ بود، مشاهده شد.

آماده سازی مترونیدازول و آرژنین

برای تهیه رقت‌های مورد نظر از مترونیدازول، ۱۲۸ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۵ درصد دارو با PBS استریل به حجم ۱۰ میلی‌لیتر (۶۴ میکروگرم برمیلی‌لیتر) رسانده‌شد و بار دیگر با استفاده از PBS رقت‌های ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. برای تهیه رقت ۱/۶ میلی‌مول، ۱۴ میلی‌گرم از استوک آرژنین به جرم ۱۷۴/۲ گرم به ۵۰ میلی‌لیتر PBS اضافه شد. مجدداً با استفاده از PBS رقت‌های ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱ میلی مول تهیه شد.

آزمایش مهار رشد تروفوزوئیت‌ها

تاثیر غلظت های مختلف ال – آرژنین (۱/۶، ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱، میلی مول) و همچنین مترونیدازول (۱۶، ۸، ۴، ۲ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر) روی انگل، پس از انکوبه شدن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رنگ‌آمیزی با تریپان بلو بررسی شد. پس از رنگ آمیزی توسط لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری، تعداد نهایی انگل‌ها شمارش و IC50 مترونیدازول و ال- آرژنین محاسبه شد.

آزمایش MTT

برای تعیین میزان سمیت مواد تهیه شده، آزمایش MTT با استفاده از سلول‌های CaCO2 انجام شد. برای آماده‌سازی محلول MTT مقدار ۵ میکروگرم از پودر MTT (نمک تترازولیوم) در یک میلی‌لیتر از محلول PBS حل شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت سلولی که تقریباً حاوی ۲۰۰۰۰ عدد سلول CaCO2 بود به پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. برای چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مورد نظر مترونیدازول و آرژنین اضافه شد. در آزمایش ۲۴ ساعته، پلیت‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در آزمایش ۴۸ ساعته، بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون از انکوباتور خارج شده، مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع‌آوری و دور ریخته شد. سپس ۹۰ میکرولیتر محیط کشت جدید و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ تا ۵ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۵ ساعت، مایع رویی به دقت توسط سمپلر از چاهک‌ها جمع‌آوری و تخلیه شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و پس از ۱۵ دقیقه جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. آزمایش MTT برای هر دارو به صورت ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته انجام شد و همه مراحل بیان شده سه مرتبه برای هر رقت تکرار شد.

آزمایش فلوسایتومتری

تعداد ۵۰۰۰۰۰ سلول CaCO2 در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. غلظت IC50 مترونیدازول و غلظتی از آرژنین که بیشترین میزان سمیت بر سلول‌های CaCO2 داشت (۱/۶ میلی مول) به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها تریپسینه شده و در میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری استریل جمع‌آوری و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته و طبق دستورالعمل کیت، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول Binding Buffer به رسوب اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر پروپیدیوم یداید به میکروتیوپ‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند. شدت رنگ Annexin-V جذب شده توسط سلول‌ها به وسیله دستگاه FACS calibur بررسی شد[۱۱].

تجزیه تحلیل آماری

در نهایت، داده‌های حاصل با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل آماری شدند.

یافته‌ها:

نتایج آزمایش ممانعت از رشد تروفوزوئیت‌ها نشان داد که در مواجهه ال- آرژنین در غلظت های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ میلی مول با تروفوزوئیت‌های بلاستوسیستیس پس از گذشت ۲۴ ساعت با افزایش غلظت ال- آرژنین، رشد انگل تحریک شده و درصد حیات انگل بیشتر می‌شود، در حالی که بعد از گذشت ۴۸ ساعت با افزایش غلظت ال- آرژنین، رشد انگل کاهش یافته، به تدریج از درصد حیات انگل کاسته می‌شود. با توجه به نتایج حاصل هر چند در غلظت‌های پائین (۰/۱، ۰/۲ میلی‌مول) در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معنادار نبود، ولی در غلظت‌های بالاتر (۰/۸و ۱/۶ میلی مول) اختلاف معنادار بود ($P<0/05$) (جدول ۱).

نتایج تاثیر مترونیدازول (کنترل مثبت) در رقت‌های ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر تروفوزوئیت‌های انگل نشان داد که با گذشت زمان و افزایش غلظت دارو از درصد حیات انگل‌ها کاسته می‌شود. در غلظت‌های ۴، ۸ و۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری اختلاف معنادار بود ($P<0/05$) (جدول ۲).

IC50 ال-آرژنین بعد از ۴۸ ساعت، ۱/۶ میلی‌مول و IC50 مترونیدازول بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین درصد مهار رشد تروفوزوئیت‌های بلاستوسیستیس نیز

به ترتیب برای ال- آرژنین، ۶۶/۱۷ درصد و برای مترونیدازول، ۵۱/۷۶ درصد محاسبه شد.

نتایج آزمایش MTT برای محاسبه میزان سمیت (میزان کشندگی) ال- آرژنین و مترونیدازول روی سلول‌های CaCO2 نشان داد که پس از گذشت ۲۴ ساعت و با افزایش غلظت ال- آرژنین، درصد حیات سلول‌های CaCO2 کاهش یافت، ولی پس از ۴۸ ساعت و با افزایش غلظت ماده مذکور، رشد سلول‌های CaCO2 تحریک شده و درصد حیات سلولی افزایش یافت. در حالی که در مورد مترونیدازول با گذشت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت و افزایش غلظت دارو، درصد حیات سلول‌های CaCO2 کاهش داشت (جدول ۳ و ۴). در این مطالعه بیشترین میزان سمیت سلولی برای ال- آرژنین و مترونیدازول به ترتیب در غلظت‌های ۱/۶ میلی مول و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت گزارش شد (نمودار ۱و ۲).

تحلیل فلوسایتومتری

در مطالعه حاضر از روش سنجش فلوسایتومتری برای ارزیابی نسبت سلول‌های نکروتیک، آپوپتوز شده و سلول‌های طبیعی استفاده شد. غلظت‌هایی از ال- آرژنین و مترونیدازول که در آزمایش MTT بیشترین میزان سمیت را بر سلول‌های CaCO2 نشان دادند، مجدداً به این سلول‌ها اضافه شد و پس از انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، سنجش فلوسایتومتری روی آن‌ها انجام شد. نتایج نشان داد، وقتی سلول‌های CaCO2 تحت تاثیر ال- آرژنین با غلظت ۱/۶ میلی مول قرار می‌گیرند، تعداد سلول‌های طبیعی، نکروز و آپوپتوز شده به ترتیب ۸۱/۸، ۳/۰۵ و ۱۵/۱۲ درصد و وقتی تحت تاثیر مترونیدازول با غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار می‌گیرند، به ترتیب ۴۹/۷، ۱۲/۳ و ۳۸/۰۳ درصد در مقابل، این وضعیت برای گروه کنترل ۹۸/۹، ۰/۱۷ و ۰/۹۳ درصد بود. یافته‌ها در شکل ۱ نشان داده شده‌است.

جدول ۱: میانگین و درصد تروفوزوئیت‌های زنده بلاستوسیستیس زیرگروه ۳ پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف ال- آرژنین، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت (تعداد اولیه انگل‌ها 10^4)

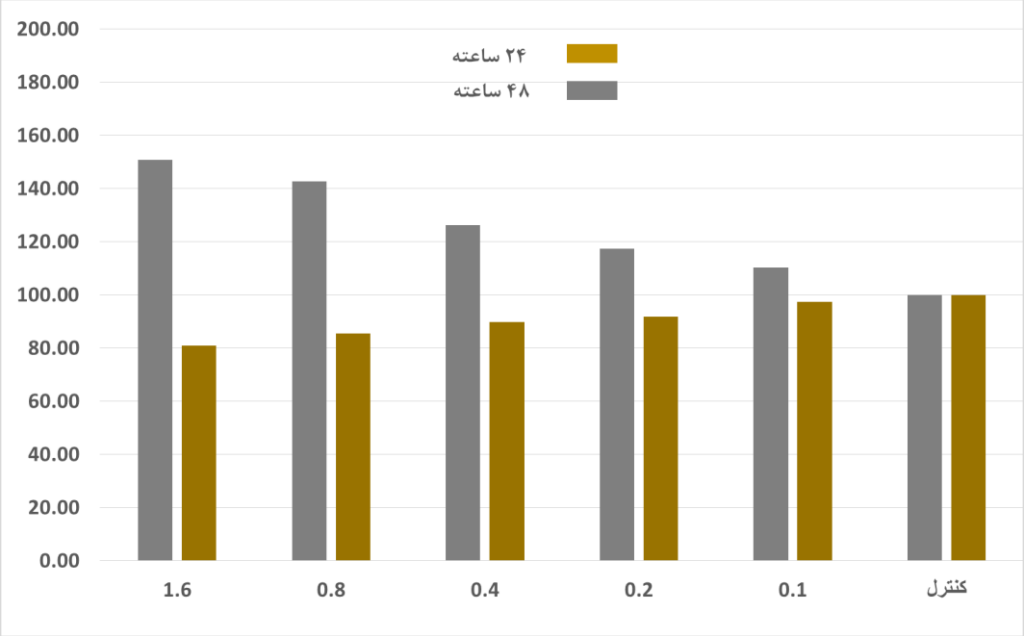
غلظت (میلی مول)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت	
	درصد حیات	میانگین و انحراف	درصد حیات	میانگین و انحراف
۰/۱	(۱۱۷/۵۲)	۲۲/۳۳± ۱/۲۴	(۹۸/۵۴)	۲۲/۳۳± ۲/۸۶
۰/۲	(۱۲۱/۰۵)	۲۳± ۱/۴۱	(۸۶/۷۶)	۱۹/۶۶± ۰/۴۷
۰/۴	(۱۳۸/۵۷)	۲۶/۳۳± ۴/۴۹	(۷۰/۶۰)	*۱۶± ۰/۸۱
۰/۸	(۱۵۶/۱۰)	*۲۹/۶۶± ۲/۰۵	(۵۱/۴۸)	*۱۱/۶۶± ۰/۹۴
۱/۶	(۱۷۰/۱۵)	*۳۲/۳۳± ۲/۰۵	(۳۳/۸۳)	*۷/۶۶± ۱/۶۹
گروه کنترل	(۱۰۰)	۱۹± ۱/۴۱	(۱۰۰)	۲۲/۶۶± ۰/۴۷

* دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P<0/05$)

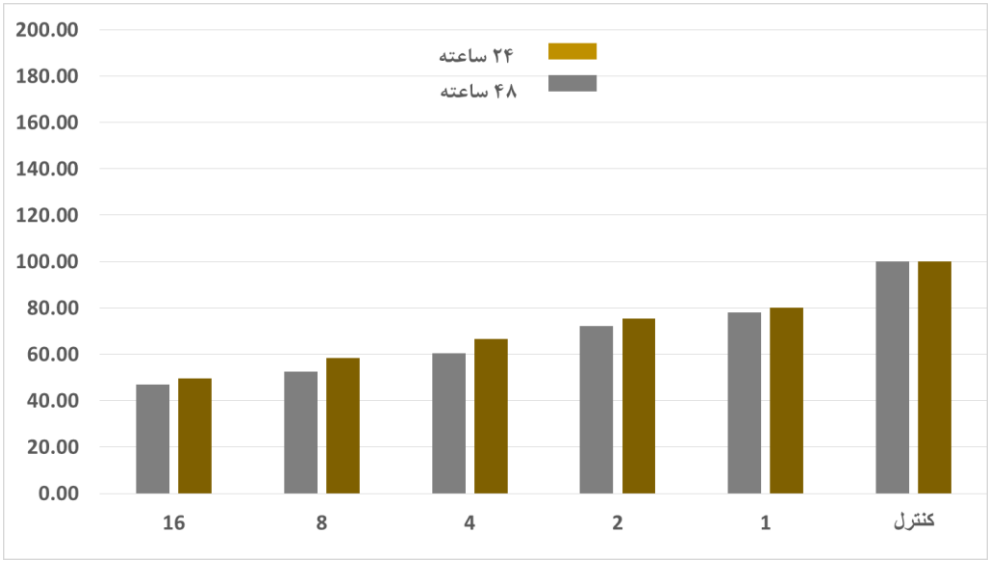
جدول ۲ : میانگین و درصد تروفوزوئیت‌های زنده بلاستوسیستیس زیرگروه ۳ پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف مترونیدازول، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت (تعداد اولیه انگل 10^4)

غلظت (میکرو گرم بر میلی لیتر)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت	
	درصد حیات	میانگین و انحراف	درصد حیات	میانگین و انحراف
۱	(۹۸/۴۹)	۲۱/۳۳± ۰/۴۷	(۹۷/۶۵)	۲۷/۶۶± ۲/۴۹
۲	(۸۰/۰۲)	۱۷/۳۳± ۰/۹۴	(۷۸/۸۳)	۲۲/۳۳± ۱/۸۸
۴	(۶۱/۵۵)	*۱۳/۳۳± ۱/۲۴	(۶۰)	*۱۷± ۱/۶۳
۸	(۴۹/۲۴)	*۱۰/۶۶± ۱/۲۴	(۴۸/۲۴)	*۱۳/۶۶± ۱/۶۹
۱۶	(۳۶/۹۳)	*۸± ۱/۴۱	(۳۴/۱۲)	*۹/۶۶± ۰/۹۴
گروه کنترل	(۱۰۰)	۲۱/۶۶± ۱/۶۹	(۱۰۰)	۲۸/۳۳± ۲/۸۶

* دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P<0/05$)



نمودار ۱: درصد حیات سلول‌های $CaCO_2$ در مواجهه با غلظت‌های مختلف ال- آرژنین بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون



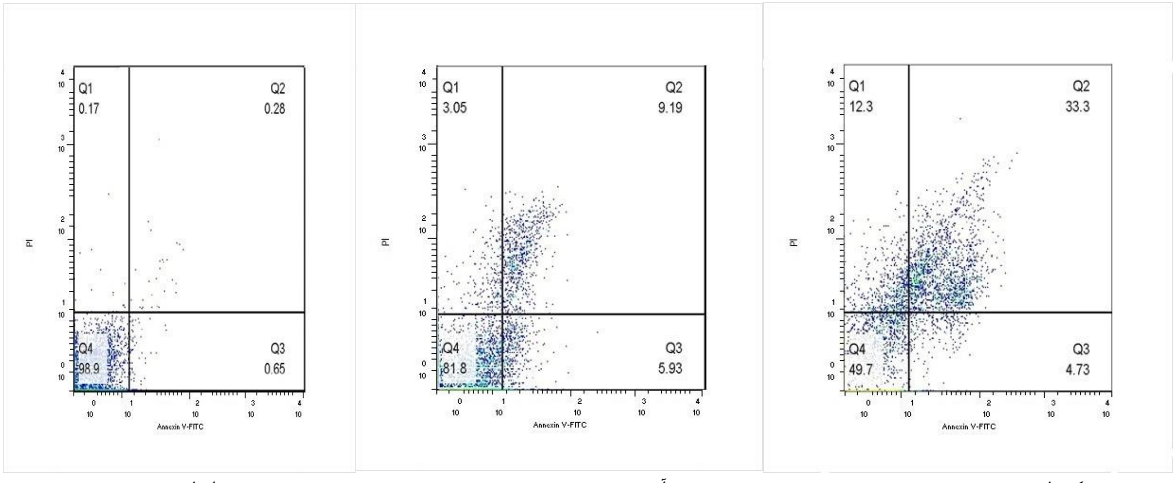
نمودار ۲: درصد حیات سلول‌های $CaCO_2$ در مواجهه با غلظت‌های مختلف مترونیدازول بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون

جدول ۳ : درصد میانگین سلول‌های زنده CaCO2 در مواجهه با غلظت‌های مختلف ال- آرژنین و مترونیدازول پس از ۲۴ ساعت (آزمایش MTT)

نوع دارو	شماره نمونه	غلظت ها	درصد میانگین و انحراف معیار	شماره نمونه هایی که نسبت به نمونه مورد نظر اختلاف معنی داری دارند (P<۰/۰۵)
	۱	۰/۱	۹۷/۴۵±۱/۳۵	۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰
آرژنین (میلی مول)	۲	۰/۲	۹۱/۸۵±۰/۹۵	۱،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۳	۰/۴	۸۹/۷۵±۱/۴	۱،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۴	۰/۸	۸۵/۵۰±۱/۰۵	۱،۲،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۵	۱/۶	۸۱/۰۵±۱/۰۵	۱،۲،۳،۸،۹،۱۰،۱۱
	۶	۱	۸۰/۴۵±۱/۰۵	۱،۲،۳،۸،۹،۱۰،۱۱
مترونیدازول (میکروگرم بر میلی لیتر)	۷	۲	۷۵/۲۵±۰/۹	۱،۲،۳،۴،۸،۹،۱۰،۱۱
	۸	۴	۶۶/۷۷±۱/۱۲	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۹	۸	۵۸/۴۰±۰/۵	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۱۰،۱۱
	۱۰	۱۶	۴۹/۶۰±۰/۸۵	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۱
کنترل	۱۱	۰	۱۰۰	۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰

جدول ۴: درصد میانگین سلول‌های زنده $CaCO_2$ در مواجهه با غلظت‌های مختلف ال- آرژنین و مترونیدازول پس از ۴۸ ساعت (آزمایش MTT)

نوع دارو	شماره نمونه	غلظت ها	درصد میانگین و انحراف معیار	شماره نمونه هایی که نسبت به نمونه مورد نظر اختلاف معنی داری دارند (P<۰/۰۵)
	۱	۰/۱	۱۱۰/۲۷±۱/۲۷	۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
آرژنین (میلی مول)	۲	۰/۲	۱۱۷/۲۲±۱/۳۲	۱،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۳	۰/۴	۱۲۶/۲۵±۱/۱	۱،۲،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۴	۰/۸	۱۴۲/۶۰±۰/۶	۱،۲،۳،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۵	۱/۶	۱۵۰/۷۵±۱/۶	۱،۲،۳،۴،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
	۶	۱	۷۸/۱۹±۰/۳۱	۱،۲،۳،۴،۵،۷،۸،۹،۱۰،۱۱
مترونیدازول (میکروگرم بر میلی لیتر)	۷	۲	۷۲/۲۱±۰/۲۳	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۸،۹،۱۰،۱۱
	۸	۴	۶۰/۴۴±۰/۸۹	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۹،۱۰،۱۱
	۹	۸	۵۲/۷۰±۱/۴	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۱۰،۱۱
	۱۰	۱۶	۴۶/۹۰±۱/۱	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۱
کنترل	۱۱	۰	۱۰۰	۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰



مترونیدازول آرژنین کنترل

شکل ۱: نتایج فلوسایتومتری سلول‌های $CaCO_2$ پس از ۲۴ ساعت

بحث:

از زمان شناسایی بلاستوسیستیس تا به امروز مطالعات زیادی در خصوص بیماری‌زایی این انگل انجام شده‌است. براساس مطالعات دهه‌های گذشته، بلاستوسیستیس به عنوان یک انگل غیرپاتوژن معرفی شده، در حالی که در مطالعات اخیر وجود انگل در هر دو نمونه بدون علائم بالینی و علامت دار گزارش شده و علاوه بر آن آنزیمی مترشحه از بلاستوسیستیس به نام سیستئین پروتئاز شناسایی شده که با تخریب IgA ترشحی، AntiMicrobial Peptid (AMP) و فرار از پاسخ ایمنی، سبب بقا و لانه‌گزینی انگل در کریپت‌های روده می‌شود [۱۳]. هر چند مترونیدازول، داروی انتخابی در درمان این عفونت انگلی است، اما علاوه بر عوارض و مشکلات متعددی که در میزبان ایجاد می‌کند [۶] به ویژه در غلظت‌های پائین سبب مقاومت دارویی انگل می‌شود. در چنین شرایطی انگل به فرم گرانولار دیده می‌شود که در شرایط مساعد تبدیل به فرم واکوئلار و در نهایت تبدیل به فرم آمیبوئیدی که سیستئین پروتئاز بیشتری تولید می‌کند، می‌شود. سیستئین پروتئاز سرطان‌زا بوده و در روند سرطانی شدن سلول‌های روده نقش مهمی ایفا می‌کند. آنزیم یاد شده بهترین هدف برای اکسید نیتریک است که با خنثی کردن سیستئین پروتئاز سبب حذف بلاستوسیستیس می‌شود [۱۲]. از این رو، در دهه‌های اخیر به خصوص در درمان بیماری‌های عفونی، استفاده از ال- آرژنین و موادی که در نهایت منجر به تولید اکسید نیتریک می‌شوند، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌است. در مطالعه حاضر در آزمایش ممانعت از رشد تروفوزوئیت‌ها در ۲۴ ساعت اول، درصد حیات تروفوزوئیت‌های بلاستوسیستیس افزایش داشت، در حالی که با گذشت ۴۸ ساعت و افزایش غلظت ال - آرژنین به تدریج از درصد حیات انگل کاسته شد و در غلظت ۱/۶ میلی‌مول بیشترین اثر مهارکنندگی (۶۶/۱۷ درصد) دیده شد. بر اساس آزمایش MTT میزان سمیت ال- آرژنین در غلظت ۱/۶ میلی مول بر سلول‌های CaCO2 پس از ۲۴ ساعت، ۱۹ درصد گزارش شده‌است. همچنین بر اساس سنجش فلوسایتومتری درصد سلول‌های طبیعی، آپوپتوز و نکروز شده به ترتیب ۸۱/۸، ۱۴/۹۳ و ۳/۰۵ درصد بود. تاثیر آرژنین و داروهای NO-donor که باعث آزادسازی اکسید نیتریک می‌شوند بر باکتری‌ها، پروتوزواها، قارچ‌ها و انگل‌های کرمی مشخص شده‌است و اثرات ضد انگلی آن از انگلی به انگل دیگر متفاوت است [۸]. برای نمونه، غلظت بالای ۳۵۰ میکرومول از S- Nitrosoglutathione (GSNO) اثر سیتوتوکسیک بر آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی دارد [۱۴]. Sodium NitroPrusside (SNP) در غلظت ۲ میلی‌مول سبب مهار کامل تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما در شرایط آزمایشگاهی و S-Nitroso-N-acetyl-Penicillamine (SNAP) در غلظتی مشابه، سبب مهار کامل تریپانوزوما کروزی در محیط کشت می‌شود [۱۵و۱۶]. آیدا و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر نیتریت سدیم (NaNO2) در غلظت‌های ۰/۶ ، ۰/۸ و۱ میلی‌مول را بر تروفوزوئیت‌های بلاستوسیستیس در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. بعد از گذشت ۹۶ ساعت، کمترین میزان کشندگی در غلظت ۰/۶ میلی‌مول و بیشترین میزان کشندگی (۱۰۰ درصد) در غلظت ۱ میلی‌مول گزارش شد [۱۷]. در همه مطالعات ذکر شده، داروهای مورد استفاده سبب نابودی کامل انگل شده و در غلظت‌های مشابه با غلظت مطالعه حاضر، به صورت سیتوتوکسیک عمل کرده‌اند، در حالی که در مطالعه حاضر، بیشترین اثر مهارکنندگی ال- آرژنین بعد از ۴۸ ساعت و در غلظت ۱/۶ میلی مول (۶۶/۱۷ درصد) بود. علت این تفاوت، وجود آنزیم آرژیناز در بلاستوسیستیس و استفاده از آرژنین به عنوان سوبسترا و تولید اورنیتین و پلی‌آمین‌ها است که به خصوص در ۲۴ ساعت اول سبب رشد و بقای انگل می‌شوند، ولی پس از ۴۸ ساعت و افزایش غلظت ال- آرژنین، از درصد حیات انگل کاسته می‌شود. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه اشتادلمان و همکاران در سال ۲۰۱۳ با عنوان نقش آرژنین و آنزیم های موثر در متابولیسم آرژنین در طول تعاملات ژیاردیا- سلول میزبان در شرایط آزمایشگاهی هم‌خوانی دارد [۷]. در مطالعه حاضر، غلظت ۱/۶ میلی مول ال- آرژنین، خاصیت سیتواستاتیک برای تروفوزوئیت‌های بلاستوسیستیس داشته و سبب نابودی کامل انگل نشد. برای این که ال- آرژنین این خاصیت را از خود نشان دهد، غلظت‌های بالاتری از آن نیاز است. ایکمان و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ در یک مطالعه تائید کردند که اکسید نیتریک و داروهای تولیدکننده اکسید نیتریک، بدون تاثیر بر قابلیت حیات فقط سبب مهار رشد تروفوزوئیت‌های ژیاردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی می‌شود [۱۸]. هاداس و همکاران در مطالعه‌ای که نتایج آن در سال ۲۰۰۲ منتشر شد از Sodium DiethylAmine / Nitric Oxide (DEA/NO) به عنوان یک دارو که در نهایت منجر به تولید اکسید نیتریک می‌شود، برای درمان موش‌های آلوده به لارو تریشینلا استفاده کردند که در مقایسه با موش‌های گروه کنترل موجب عفونت بیشتر و وخیم‌تر شدن بیماری شد. علت این امر سرکوب پاسخ ایمنی میزبان به علت وجود مقادیر بسیار زیاد اکسید نیتریک ذکر شد [۱۹]. در مطالعه‌ای که توسط عبدل‌تواب و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام شده‌است، تاثیر ال- آرژنین در درمان موش‌های آلوده به لارو تریشینلااسپیرالیس سبب افزایش ۵۱/۸ درصدی در تعداد لاروها شد، در حالی که در درمان با

آلبندازول میزان لاروها ۹۵/۵ درصد کاهش و در درمان توامان ال- آرژنین و آلبندازول ۶۹/۶ درصد کاهش گزارش شده‌است [۲۰]. به هر حال، سمیت سلولی و توانایی درمانی اکسید نیتریک حاصل از ال- آرژنین در برابر طیف وسیعی از عوامل میکروبی به خوبی شناخته شده‌است و نیاز به کنترل دقیق دارد تا آسیب سیتوتوکسیک به سلول‌های میزبان محدود شود. تولید اکسید نیتریک در مقادیر بسیار زیاد، کنترل نشده و نامنظم منجر به مهار پاسخ‌های ایمنی و وخیم تر شدن عفونت می‌شود [۲۱ و ۲۲]. بنابر این، هر چند طراحی دارویی ایمن، موثر، با سمیت پائین و کم هزینه یک هدف با ارزش برای درمان و کنترل بیماری‌های عفونی است، با توجه به نتایج مطالعه حاضر و دیگر مطالعات مشابه، به خصوص در شرایط آزمایشگاهی، ال- آرژنین واجد همه ویژگی‌های ذکر شده بالا می‌باشد، ولی برای کاندیدا شدن به عنوان یک دارو به ویژه در غلظت‌های بالا به خاطر برهم‌کنش واکنش‌های مختلف در بدن و تاثیر بسیار مهم سیستم ایمنی و پاسخ‌های مرتبط با آن به ویژه کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های مختلف به پژوهش‌های بیشتری در محیط بدن موجود زنده نیاز است.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.TMU.REC.1396.571 است. بدین‌وسیله از کلیه کارکنان گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس ایران برای همکاری در اجرای پژوهش قدردانی و تشکر می‌شود. همچنین از دکتر فاطمه غفاری‌فر از گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس برای مشاوره و ارائه نظرات مفید در نگارش مقاله سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده‌است.

References:

1. Mirza H, Wu Z, Kidwai F, Tan KS. A metronidazole-resistant isolate of Blastocystis spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. Infect Immun 2011; 79 (12): 5019–26
2. Deng L, Wojciech L, Gascoigne NRJ, Peng G, and Tan KSW. New insights into the interactions between Blastocystis, the gut microbiota, and host immunity. PLoS Pathog 2021; 17 (2): e1009253
3. Stensvold CR, Tan KSW, Clark CG. Blastocystis. Trends Parasitol 2020; 36 (3): 315-316
4. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. Blastocystis: to treat or not to treat. Clin Infect Dis 2012; 54 (1); 105-110
5. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. Clin Microbiol Rev 2008; 21 (4): 639-665
6. Hernández Ceruelos A, Romero-Quezada LC, Ruvalcaba Ledezma JC, López Contreras L. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2019; 23 (1): 397-401
7. Stadelmann B, Merino MC, Persson L, Svard SG. Arginine Consumption by the Intestinal Parasite Giardia intestinalis Reduces Proliferation of Intestinal Epithelial Cells. PLoS One2012; 7 (9): e45325
8. Badirzadeh A. Arginase activity and Its effects on Pathogenesis of Leishmania Parasites. J Ardabil Univ Med Sci 2019; 19 (2): 126-136 . (Persian)
9. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. Virulence 2012; 3 (3): 271–279
10. Stadelmann B, Hanevik k, Andersson M, Bruserud O, and Svard SG. The role of arginine and arginine –metabolizing enzymes during Giardia –host cell interactions in vitro. BMC Microbiol 2013; 13 (1): 1-11
11. Pazoki R, Ghasemi Nejad Raeeni M, Ghaffarifar F, Karimipour Saryazdi A, Bineshian F.The effect of aqueous extract of Artemisia aucheri seed on Acanthomoeba in vitro. J Pharm Rest Int 2019; 31 (6): 1-10
12. Rajamanikam A, Hooi HS, Kudva M, Samudi C, and Kumar S. Resistance towards metronidazole in Blastocystis sp.: A pathogenic consequence. PLoS One 2019; 14 (2): e 0212542
13. Helmy MM, Hussein EM, El- moamly AA, Eida AM, Eida OM, Salem AM. Effect of exogenous adminstration of anti-oxidants on Blastocystis hominis In vivo. J Egypt Soc Parasitol 2008; 38 (1): 103-114
14. Costa ISF, Souza GFP, Oliveira MG, Abrahamsohn IA. S-nitrosoglutathione (GSNO) is cytotoxic to intracellular amastigotes and promotes healing of topically treated Leishmania major or Leishmania braziliensis skin lesions.J Antimicrob Chemother 2013;68 (11): 2561-2568
15. Peng BW, Lin J, Lin JY, Jiang MS, Zhang T. Exogenous nitric oxide induces apoptosis in Toxoplasma gondii tachyzoites via a calcium signal transduction pathway. Parasitol Open 2003; 126 (6): 541-550
16. Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infect Immun1994; 62 (11): 5177-5182

17. Eida OM, Hussein EM, Eida AM, El-moamly AA, and Salem AM. Evaluation of the nitric oxide activity against Blastocystis hominis in vitro and in vivo. J Egypt Soc Parasitol 2008; 38 (2): 521-536
18. Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen Giardia lamblia. J Immunol 2000;164 (3): 1478-1487
19. Hadas E, Derda M, and Wandurska-Nowak E. Effect of exogenous nitric oxide in experimental trichinellosis. Parasitol Res 2002; 88: 86-88
20. Abdeltawab MS, Abdel-Shafi IR, Aboulhoda BS, Wanas H, El-Din Sh, Amer SA, Hamed AM. Investigating the effect of the nitric oxide donor L-arginine on albendazole efficacy in Trichinella spiralis induced myositis and myocarditis in mice. Parasitol United J 2022; 15 (1): 60-70
21. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Ramacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu,Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Redox Biol 1994; 17 (3): 235-248
22. EL-Khazragy N, and Saad GhA. Blastocystis sp. Enhances oxidative stress-induced carcinogenesis in colorectal cancer: In vivo experimental study. Int J Adv Res 2019; 7 (9): 1231-1238

Original Article

Investigating the Effect of L-arginine on Blastocystis SubType 3 In Vitro

Maryam Ahmadi[1], Javid Sadraei[2*], Abdolhossein Dalimi[3], Majid Pirestani[4]

Received:2024.01.23 Revised:2024.03.02 Accepted: 2024.03.30

1. Ph.D student in medical parasitology, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Full Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.4, Winter 2024

Pars J Med Sci 2024;21(4):36-45

Abstract:

Introduction:
Blastocystis is an extracellular and noninvasive unicellular enteric parasite with zoonotic potential. Intestinal epithelial cells produce nitric oxide (NO), primarily on the apical side, in order to target luminal pathogens. L-arginine acts as a substrate for inducible nitric oxide synthesis (iNOS), which leads to the synthesis of nitric oxide. The current study was designed to assess the effect of L-arginine on Blastocystis ST3 in vitro conditions.

Materials and Methods:
The parasite was cultivated in DMEM F-12`s medium and was then identified by polymerase chain reaction (PCR) and the subtype of the parasite was determined which was subtype 3. Then, the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and flow cytometry methods were used to evaluate the cytotoxicity and probable apoptosis of the prepared druges /substances on CaCO2 cells. This study investigated the concentrations of L-arginine (0.1∀ 0.2∀ 0.4, 0.8 and 1.6 mM) and Metronidazole (1 ∀2 ∀4 ∀8 and 16 µg/ml), and their effect on 24 and 48 hour time points after exposure to the parasite. Then, the final number of parasites was counted after staining with trypan blue by a Neubauer slide and the values of IC50 were calculated for each substance.

Results:
It was found that after 48 hours∀ the number of live Blastocystis trophozoites decreases with the increase in L-arginine concentration and At the concentration of 1.6 mM the number of live trophozoites was 33.83% ($P< 0.05$).

Conclusion:
L-arginine, in high concentrations, is capable of inhibiting Blastocystis trophozoites In vitro.

Keywords: Blastocystis, L-arginine, Flow cytometry, In vitro

* Corresponding author Email: sadraeij@modares.ac.ir