

Effect of Cecropin–melittin Chimeric Peptide (CM11) on Trophozoite of Giardia lamblia In Vitro

Somayeh Karimi Tanha¹,
Majid Pirestani²,
Javid Sadraei³

¹ MSc in Medical Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received April 27, 2019; Accepted July 14, 2019)

Abstract

Background and purpose: Antimicrobial peptides (AMP) are one of the most diverse antimicrobial compounds that have received much attention due to the development of drug resistance of pathogens to conventional antibiotics. But, few studies have evaluated anti-parasitic properties of AMP. The present study was conducted to compare the effect of a cecropin–melittin chimeric peptide (CM11) and metronidazole on *Giardia lamblia* trophozoite.

Materials and methods: In this study, using MTT assay, the cytotoxicity of CM-11 peptide (0.5-32 µg/ml) and metronidazole (0.25-25 µg/ml) was investigated on Caco-2 cells and IC50 was calculated. Flow cytometry was used to determine the rate of induction of apoptosis by CM11 and metronidazole. The toxicity of peptide on *G. lamblia* trophozitis was evaluated in vitro under different conditions.

Results: MTT results showed that the highest percentage of cytotoxicity in caco2 cells was seen at 32 µg/ml of CM11 peptide after 24 (84.3±1.2%), 48 (88.7±0.9%) and 72 (87±1.5%) hours. In metronidazole group, the highest cytotoxicity was observed in 20 µg/ml after 24 (35±2.3), 48 (39.3±1.2) and 72 (48.3±1.8%) hours. The highest concentrations of peptide (32 µg/ml) and metronidazole (20 µg/ml) showed 99.8±0.2% and 99±0.6% cytotoxicity effect, respectively. The cytotoxicity effect of peptide and metronidazole on *G. lamblia* attached to caco2 cells at highest concentrations were 99.7±0.1% and 99.5±0.3%, respectively.

Conclusion: This study showed that cecropin-melittin chimeric peptide could be an appropriate candidate for the treatment of giardiasis.

Keywords: *Giardia lamblia*, chimeric peptide, cecropin-melittin, metronidazole, Caco-2 cell

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(177): 42-55 (Persian).

* Corresponding Author: Majid Pirestani - Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
(E-mail: pirestani@modares.ac.ir)

ارزیابی اثر پپتید کایمیریک سکروپین-ملیتین (CM11) بر روی تروفوزویت ژیاوردیا لامبلیا در شرایط برون تنی

سمیه کریمی تنها^۱

مجید پیرستانی^۲

جاوید صدراپی^۳

چکیده

سابقه و هدف: پپتیدهای ضد میکروبی، یکی از متنوع ترین ترکیبات ضد میکروبی هستند که به دلیل پیدایش مقاومت عوامل بیماری زا به آنتی بیوتیک های رایج مورد توجه قرار گرفته اند. با این وجود در مطالعات اندکی خواص ضد انگلی آن ها مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعه پیش رو با هدف مقایسه اثرات پپتید کایمیریک-ملیتین-سکروپین (CM11) و مترونیدازول بر روی تروفوزویت ژیاوردیا لامبلیا صورت گرفته است.

مواد و روش ها: در این تحقیق تجربی، با استفاده از آزمایش MTT، سمیت سلولی پپتید CM11 در غلظت های $0.5-32 \mu\text{g/ml}$ و مترونیدازول در غلظت های $0.25-20 \mu\text{g/ml}$ بر روی سلول Caco-2 بررسی و IC_{50} محاسبه گردید. جهت تعیین میزان آپوپتوز القا می CM11 و مترونیدازول از روش فلوسایتومتری استفاده شد. سمیت دارویی پپتید بر روی تروفوزویت ژیاوردیا لامبلیا در شرایط مختلف برون تنی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج MTT نشان داد که بالاترین درصد کشندگی بر روی سلول Caco-2، در گروه پپتید CM11 در غلظت $32 \mu\text{g/ml}$ پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب 84.3 ± 1.2 ، 88.7 ± 0.9 و 87 ± 1.5 درصد بود، در حالی که در گروه مترونیدازول در غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب 3.3 ± 2.3 ، 39.3 ± 1.2 و 48.3 ± 1.8 درصد بود. در بالاترین غلظت مورد استفاده طی ۲۴ و ۴۸ ساعت، بالاترین درصد کشندگی بر روی انگل در گروه پپتید و مترونیدازول به ترتیب 99.8 ± 0.2 و 99 ± 0.6 درصد بود. میزان کشندگی پپتید و مترونیدازول بر روی انگل های متصل به سلول در بالاترین غلظت به ترتیب 99.7 ± 0.1 و 99.5 ± 0.3 درصد بود.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان داد که پپتید کایمیریک سکروپین-ملیتین (CM11) می تواند کاندید مناسبی جهت درمان ژیاوردیازیس باشد.

واژه های کلیدی: ژیاوردیا لامبلیا، پپتید کایمیریک، سکروپین-ملیتین، مترونیدازول، سلول Caco-2

مقدمه

مورد در سال، شایع ترین انگل روده ای مسبب اسهال در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته می باشد. عفونت ناشی از این تک یاخته فاقد علامت یا علامت دار بوده

ژیاوردیازیس بیماری انگلی است که به وسیله تک یاخته ای تازک دار به نام ژیاوردیا لامبلیا ایجاد می شود. ژیاوردیا لامبلیا دارای انتشار جهانی است و با ۲۸۰ میلیون

مؤلف مسئول: مجید پیرستانی - تهران: تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی E-mail: pirestani@modares.ac.ir

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۲/۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۴/۲۳

که به صورت بیماری مزمن یا حاد دیده می‌شود. داروی اصلی جهت درمان ژیا ردیا زیس، از مشتقات نیتروایمیدازول، مترونیدازول (فلاژیل)، می‌باشد (۱). این دارو پس از ورود توسط پروتئین‌های انتقال‌دهنده الکترون فردو کسین، احیا شده و با DNA پیوند کووالانسی برقرار نموده و در نتیجه منجر به آسیب DNA و درهم شکستگی ساختمان DNA و مرگ انگل می‌شود (۳،۲). با این وجود به علت مقاومت‌های دارویی ایجاد شده و اثرات سرطان‌زایی و جهش‌زایی این داروها، تلاش در جهت کشف داروهای مناسب برای مقابله با این بیماری ضروری به نظر می‌رسد.

در سال‌های اخیر از بین ترکیبات ارائه شده جهت درمان بیماری‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی توجه بسیاری از پژوهشگران علوم دارویی را به خود جلب نموده است. پپتیدهای ضد میکروبی، به عنوان بخشی از ایمنی ذاتی، میزبان را در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها نظیر قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و تک‌یاخته‌ها محافظت می‌نمایند. علاوه بر عملکردهای ضد میکروبی، فعالیت‌هایی نظیر تحریک سیستم ایمنی، فعالیت ضد سرطانی و نقش در انتقال پیام‌ها از دیگر وظایفی است که به این پپتیدها نسبت داده می‌شود. تا به امروز، بیش از ۵۰۰۰ پپتید ضد میکروبی از منابع مختلفی نظیر میکروارگانیسم‌ها، بی‌مهرگان، مهره‌داران و گیاهان شناسایی شده است. از خصوصیات مشترک پپتیدهای ضد میکروبی، توالی کوتاه، کاتیونی و آمفی‌پاتیک بودن است (۴). پپتیدهای ضد میکروبی در اصل از ۱۲ الی ۵۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند. این پپتیدها شامل ۲ یا تعداد بیش‌تری دامنه با شارژ مثبت هستند که در شرایط طبیعی توسط اسید آمینه آرژنین و لیزین و در شرایط اسیدی توسط اسید آمینه هیستیدین ایجاد می‌شود (۵). قسمت عمده‌ای که به‌طور معمول بیش از ۵۰ درصد پپتید را تشکیل می‌دهد، از بقایای هیدروفوبی ایجاد شده است. ساختارهای دوم این مولکول‌ها به چهار صورت مارپیچ آلفا، صفحه بتا، حلقه بتا و طویل و کشیده می‌باشد. بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی در

محلول‌ها فاقد ساختار ثانویه بوده و در مجاورت غشاهای زیستی به شکل نهایی خود تاخوردگی پیدا می‌کنند (۶). این تاخوردگی در اثر قرار گرفتن قسمت‌های آب‌دوست اسیدهای آمینه در یک سو و قسمت‌های آب‌گریز در سوی مخالف، یک مولکول مارپیچ ایجاد می‌شود. به علت داشتن خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی همزمان (آمفی‌پاتیک)، به پپتیدهای ضد میکروبی این اجازه داده می‌شود تا بخشی از دو لایه لیپیدی غشاء شوند (۶). توان همراهی با غشاءهای زیستی، یک ویژگی قطعی برای همه پپتیدهای ضد میکروبی است. طریقه عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی در کشتن میکروب‌ها، بر اساس اهداف میکروبی متفاوت می‌باشد. غشاء سیتوپلاسمی شایع‌ترین هدف بوده ولیکن برخی از آن‌ها در سنتز DNA و پروتئین، تاخوردگی پروتئین‌ها و سنتز دیواره سلولی تداخل ایجاد می‌نمایند (۷). تماس اولیه بین پپتید و ارگانیسم هدف الکترواستاتیکی بوده و به خاطر تفاوت شارژ الکتریکی غشاء و پپتید اتصال برقرار می‌شود. به دلیل آمفی‌پاتیک بودن، اندازه کوچک و شارژ کاتیونی، پس از اتصال وارد غشاء دو لایه شده و منافذی را به وسیله مکانیسم‌های carpet, barrel-stave یا toroidal-pore ایجاد می‌کند. به‌طور متناوب آن‌ها می‌توانند به داخل سلول نیز نفوذ کرده تا به مولکول‌های داخل سلولی حیاتی در بقای سلول متصل شوند. مدل‌های اتصال داخل سلولی می‌توانند منجر به مهار سنتز دیواره سلولی، تغییر در غشای سیتوپلاسمی، فعال‌سازی اتولیزین، مهار سنتز DNA، RNA، پروتئین و آنزیم‌های خاص شوند (۸،۷).

از بین پپتیدهای ضد میکروبی، سکروپین و ملیتین دو عضوی هستند که اثرات درمانی آن‌ها بر روی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. ملیتین با ۲۶ اسید آمینه دارای خواص ضد میکروبی فراوانی است که اصلی‌ترین عنصر با مارپیچ آلفا در سم زنبور عسل (*Apis mellifera*) را تشکیل می‌دهد (۹). از بین پپتیدهای آمفی‌پاتیک، سکروپین در اصل از همولنف

این ترکیبات به عنوان دارو در مصارف سیستمیک می‌باشد. با این وجود در طراحی و سنتز پپتیدها با استفاده از تغییراتی که در ترکیب پپتیدها انجام می‌شود، می‌توان تا حدود زیادی به این مسئله فائق آمد (۲۰). هزینه‌های سنتز پپتیدها به چند عامل بستگی دارد که عبارتند از: (۱) تعداد اسیدهای آمینه، (۲) مقدار پپتید بر حسب mg، (۳) درصد خلوص، (۴) اصلاحات صورت گرفته بر روی اسید آمینه نظیر استیلاسیون، فرمیلاسیون، گلیکوزیلاسیون، اضافه کردن گروه‌های چربی و ... که هر کدام می‌تواند بر هزینه‌های سنتز بیفزاید. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر پپتید کایمیریک سکروپین - ملیتین (CM11) بر روی تروفوزوئیت ژنرال لاملیلا در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

ترکیبات دارویی

پپتید CM11 بر اساس پروتکل‌های استاندارد سنتز (۲۱) و با استفاده از تکنیک HPLC و گرادیان خطی ۲۵ تا ۷۵ درصد استونیتریل در آب در حضور تری فلوئورواستیک اسید (TFA) در بازه زمانی ۳۰ دقیقه عمل تخلیص صورت گرفت. درصد خلوص پپتید با استفاده از طیف سنج جرمی بالای ۹۵ درصد تعیین شد. جرم مولکولی پپتید توسط طیف سنج ۱۴۱۵/۱۸ تعیین شد، در حالی که به لحاظ تئوری این جرم مولکولی، ۱۴۱۴/۹۰ تعیین شد.

کشت ژنرال لاملیلا

در این مطالعه از نمونه مدفوع مثبت از لحاظ کیست ژنرال لاملیلا موجود در گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد. نمونه مورد نظر به لحاظ ژنتیکی متعلق به زیرمجموعه AII بود. با استفاده از تکنیک گرادیان ساکاروز (فاز بینابینی بخش ۰/۸۵ و ۰/۴ مولار پس از سانتریفیوژ در دور ۶۰۰ g) کیست‌های ژنرال لاملیلا تخلیص شدند (۲۲). به منظور حذف ساکاروز

پروانه ابریشم غول پیکر (*Hyalophora cecropia*) گرفته شده است که دارای خواص ضد میکروبی است. در میان انواع مختلف سکروپین، نوع A دارای ۳۷ اسید آمینه بوده و اثرات کشندگی بالایی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی از خود نشان می‌دهد (۱۰). با این وجود قیمت بالای این پپتیدها در زمان تولید به لحاظ توالی طولانی آن‌ها، خاصیت لیز گلبول‌های قرمز توسط ملیتین و حساسیت سکروپین A نسبت به هضم پروتئازی، این پپتیدها را جهت درمان‌های ضد میکروبی نامناسب ساخته است (۱۲، ۱۱). به منظور استفاده از این پپتیدها جهت درمان، بایستی تغییراتی در توالی این پپتیدها ایجاد نمود تا خواص دارویی آن‌ها از قبیل پایداری متابولیکی، اختصاصیت و گرایش بالا برای یک آنزیم یا گیرنده خاص بهبود یابد. یکی از راه‌های موجود در حل این موضوع، طراحی و سنتز پپتیدهای کوچک با خواص بهبود یافته می‌باشد. با وجود کوتاه بودن، پتانسیل ضد میکروبی بالاتر، سمیت کمتر یا غیر سمی بودن و محافظت در برابر هضم پروتئازی از ویژگی‌های بهبود یافته این پپتیدهاست (۱۴، ۱۳). یکی از مهم‌ترین مزایای پپتیدهای طراحی شده به عنوان دارو این است که معمولاً چنین ترکیباتی به علت عوارض جانبی و سمیت پایین، مشکلات خاصی را برای بیمار به وجود نخواهند آورد (۱۶، ۱۵). پپتید کایمیریک سکروپین - ملیتین (CM11) یکی از این پپتیدهای کوچک است که ۱۱ اسید آمینه طول داشته و در انتهای کربوکسیل دارای گروه آمین با فرمول WKLFFKILKVL-NH₂ می‌باشد. اسید آمینه ۲ الی ۸ آن برگرفته از توالی سکروپین A و اسید آمینه ۶ الی ۹ آن برگرفته از توالی ملیتین می‌باشد که خواص پپتیدهای اصلی در آن بهبود یافته است (۱۸، ۱۷). این پپتید در ابتدا توسط کاوالارین تحت عنوان Pep3 شرح داده شد (۱۹) و در مطالعات بعدی تحت عنوان CM11 از آن نامبرده شده است. عارضه جانبی مهم پپتیدهای ضد میکروبی سمیت دارویی برای سلول‌های یوکاریوتی و لیز گلبول‌های قرمز است که مانع بزرگی در استفاده از

Caco-2 درون هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی به صورت سه بار تکرار اضافه شد و در دمای ۳۷°C و ۵ درصد CO₂ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از انکوباسیون و چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک، محیط کشت تخلیه و ۱۰۰ μl محیط کشت کامل حاوی غلظت‌های مورد نظر دارو به هر چاهک اضافه و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون انجام شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، مایع رویی هر چاهک تخلیه و ۱۰ μl محلول MTT (۵ mg/ml) و ۹۰ μl محیط کشت کامل اضافه و ۳-۴ ساعت انکوباسیون انجام شد (محلول MTT در تاریکی اضافه و درون انکوباتور قرار می‌گیرد). سپس مایع رویی هر چاهک تخلیه و مقدار ۱۰۰ μl محلول DMSO اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون انجام شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ nm اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده با توجه به میزان جذب نوری گروه درمان و کنترل طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری سلول های درمان شده}}{\text{میانگین جذب نوری سلول های کنترل}} \times 100$$

غلظتی که سبب مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های زنده گردید به عنوان IC₅₀ تعیین گردید (۲۸).

بررسی آپوپتوز القا می‌شود توسط پپتید CM11 و مترونیدازول در سلول‌های Caco-2

به منظور تعیین درصد آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با دارو و مقایسه آن با جمعیت سلولی کنترل منفی، از تکنیک فلوسایتومتری و کیت تجاری FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) استفاده شد (۲۹). بدین منظور، ۳ ml محیط کشت کامل حاوی ۵×۱۰^۵ سلول Caco-2 در هر خانه از پلیت ۶ خانه به صورت سه بار تکرار برای هر غلظت دارویی ریخته و مدت ۱۴ ساعت انکوباسیون انجام شده تا سلول‌ها به کف خانه‌ها بچسبند. سپس سلول‌ها پس از تیمار شدن با

از کیست‌ها، با استفاده از نرمال سالین به همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۵۰۰ IU/ml)، استرپتومایسین (۵۰۰ μg/ml) و جنتامایسین (۵۰ μg/ml) با دور ۴۰۰ g، سه مرتبه شستشو داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت اکسیستاسیون از روش Bingham and Meyer و جهت کشت تروفوزوئیت‌های خارج شده از محیط کشت TYI-S-33 و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. محیط کشت هر ۲۴-۴۸ ساعت یک‌بار، بسته به میزان آلودگی میکروبی و رشد تروفوزوئیت تعویض گردید (۲۳). جهت شمارش تروفوزوئیت‌ها از لام نئوبار و به منظور جلوگیری از حرکت تروفوزوئیت‌ها از سوسپانسیون انگلی رقیق شده با فرمالین ۱ درصد به نسبت ۱/۱۰ استفاده شد (۲۴). به منظور جداسازی تروفوزوئیت‌های متصل به جداره لوله کشت از حمام آب یخ ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه استفاده شد (۲۵).

کشت سلول Caco-2

رده سلولی Caco-2 از بانک سلولی مرکز ذخائر ژنتیک ایران خریداری شد. رده سلولی Caco-2 در محیط DMEM-F12 همراه ۱۰ درصد سرم گاوی، ال-گلوتامین ۲ mM و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شد. پس از رشد یکنواخت در فلاسک محیط کشت و پوشیده شدن ۸۵-۹۰ درصد از کف فلاسک، جهت جدا کردن سلول‌ها و کشت مجدد از ۰/۲۵ Trypsin/EDTA درصد استفاده شد.

بررسی سمیت دارویی بر روی سلول Caco-2 و تعیین IC₅₀

میزان سمیت دارویی پپتید و مترونیدازول بر روی سلول Caco-2 با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. از غلظت‌های مختلف پپتید CM11 (۰/۵-۳۲ μg/ml) (۲۶) و مترونیدازول (۰/۲۵-۲۰ μg/ml) استفاده شد (۲۷). بدین منظور، ۲۰۰ μl محیط کشت کامل حاوی ۲×۱۰^۴ سلول

مترونیدازول به هر خانه اضافه و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. در نهایت برای جداسازی انگل از سلول، پلیت‌ها را به مدت ۰/۵ الی ۱ ساعت روی یخ قرار داده، سپس کل مایع رویی به میکروتیوب ۱/۵ ml انتقال و پس از سانتریفیوژ، میزان زنده و مرده بودن انگل‌ها طبق روش قبلی با استفاده از لام نئوبار و رنگ آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد محاسبه گردید (۳۱).

آنالیز آماری

درصد مرگ و میر سلولی و نیز میزان حیات سلول‌ها، توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey و همچنین آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney به وسیله نرم افزار SPSS version 20 انجام شد. سطح معنی دار $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج آزمایش MTT نشان داد که درصد کشندگی پایین ترین غلظت پپتید CM11 ($0/5 \mu\text{g/ml}$) بر روی سلول‌های Caco-2 حدود $4 \pm 1/2$ ، $5 \pm 1/7$ و $3/3 \pm 0/9$ درصد به ترتیب طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود. این در حالی است که این میزان در بالاترین غلظت پپتید ($32 \mu\text{g/ml}$) به ترتیب $84/3 \pm 1/2$ ، $88/7 \pm 0/9$ و $87 \pm 1/5$ درصد بود. در مقایسه با پپتید، پایین ترین غلظت مترونیدازول ($0/25 \mu\text{g/ml}$) پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درصد کشندگی در حدود $3/3 \pm 1/9$ ، $4/3 \pm 1/8$ و $14/7 \pm 2/3$ درصد داشت. این مقادیر در بالاترین غلظت مترونیدازول ($20 \mu\text{g/ml}$) به ترتیب $35 \pm 2/3$ ، $39/3 \pm 1/2$ و $48/3 \pm 1/8$ درصد بود. از لحاظ آماری، گروه‌های درمان با گروه کنترل تفاوت معنی دار مشاهده شد (جدول و نمودار شماره ۱). پس از محاسبه IC50 مشخص شد این میزان برای پپتید و مترونیدازول به ترتیب برابر $17/72$ و $11/73 \mu\text{g/ml}$ می باشد.

غلظت‌های (در محدوده IC_{50} $8 \mu\text{g/ml}$ و $16 \mu\text{g/ml}$) پپتید و $10 \mu\text{g/ml}$ و $20 \mu\text{g/ml}$ مترونیدازول به مدت ۲۴ ساعت، تریپسینه شده به میکروتیوب ۱/۵ ml انتقال و با بافر فسفات سالین استریل (PBS) شستشو صورت گرفت. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ سلول‌ها، $500 \mu\text{l}$ بافر اتصال اضافه گردید. پس از آن $5 \mu\text{l}$ رنگ آنکسین و $5 \mu\text{l}$ رنگ پروپیدیوم یدید اضافه نموده و محتویات هر میکروتیوب به آرامی مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (25°C) در تاریکی انکوبه گردید. در نهایت آنالیز سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری BD FACSCalibur انجام شد.

بررسی سمیت دارویی بر روی تروفوزوئیت ژیا ردیا لامبلیا بدین منظور تعداد 10^4 تروفوزوئیت ژیا ردیا لامبلیا در $200 \mu\text{l}$ محیط TYI-S-33 به میکروتیوب‌های $0/5 \text{ ml}$ اضافه شد. در مرحله بعد تروفوزوئیت‌ها با غلظت‌های $8-32 \mu\text{g/ml}$ از پپتید و $0/5-10 \mu\text{g/ml}$ از مترونیدازول به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از انکوباسیون به وسیله لام نئوبار میزان زنده و مرده بودن انگل با استفاده از آزمون خروج تریپان بلو تعیین گردید. در این آزمون پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو ۰/۴ درصد، تروفوزوئیت‌های زنده و مرده به ترتیب بی رنگ و آبی می شوند. جهت بررسی سمیت، تعداد موارد زنده و مرده از بین ۱۰۰۰ تروفوزوئیت شمارش و درصد کشندگی تعیین شد (۳۰).

بررسی سمیت دارویی بر روی تروفوزوئیت ژیا ردیا لامبلیا متصل به سلول Caco-2

در این مرحله 10^5 سلول Caco-2 به هر یک از خانه‌های پلیت‌های ۱۲ خانه به همراه 1 ml محیط کشت کامل اضافه شد. پس از ۱۴ ساعت انکوباسیون و اتصال سلول‌ها به کف خانه‌ها، به نسبت ۱ به ۱۰، تروفوزوئیت ژیا ردیا به هر چاهک اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با تخلیه کل محیط رویی، تعداد تروفوزوئیت‌های اتصال نیافته شمارش شد. سپس غلظت‌های $8-32 \mu\text{g/ml}$ از پپتید و $0/5-10 \mu\text{g/ml}$ از

جدول شماره ۱: سمیت دارویی غلظت های مختلف پپتید CM11 و مترونیدازول روی سلول Caco-2 طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

ساعت	کنترل	پپتید (µg/ml)								مترونیدازول (µg/ml)							
		۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶	۳۲		
۲۴	۱/۷±۰/۹	۴±۱/۲	۷/۷±۱/۵	۱۲/۷±۱/۵	۲۸±۱/۷	۳۷±۳/۱	۵۰/۷±۲/۲	۸۴/۳±۱/۲	۳/۳±۱/۹	۶/۳±۱/۹	۱۰/۳±۲/۴	۱۳±۲/۵	۱۷/۷±۲/۳	۲۱/۳±۱/۹	۲۷±۲/۱	۳۵±۲/۳	
۴۸	۱/۷±۱/۲	۵±۱/۷	۱۰±۱/۲	۱۵/۳±۲/۶	۲۹/۳±۳/۵	۳۹/۳±۲/۷	۴۹/۳±۱/۲	۸۸/۷±۰/۹	۴/۳±۱/۸	۹±۱/۲	۱۲/۷±۰/۹	۱۶/۳±۲/۳	۱۸/۳±۲/۲	۲۷±۱/۷	۲۸±۲/۱	۳۹/۳±۱/۲	
۷۲	۲/۷±۱/۷	۳/۳±۰/۹	۸/۳±۱/۲	۱۲±۲/۱	۲۷/۳±۲/۳	۲۵±۲/۳	۴۸/۳±۱/۸	۸۷±۱/۵	۱۴/۷±۲/۳	۲۲/۷±۱/۲	۲۶±۲/۱	۲۹±۲/۳	۳۴±۲/۵	۳۸±۱/۵	۴۱±۰/۶	۴۸/۳±۱/۸	

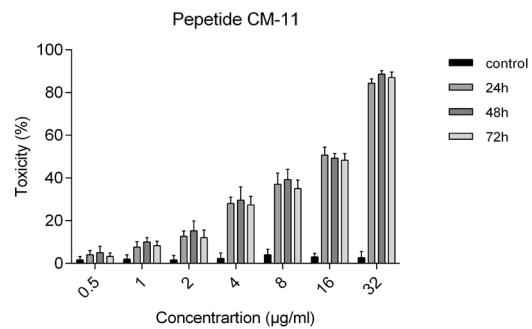
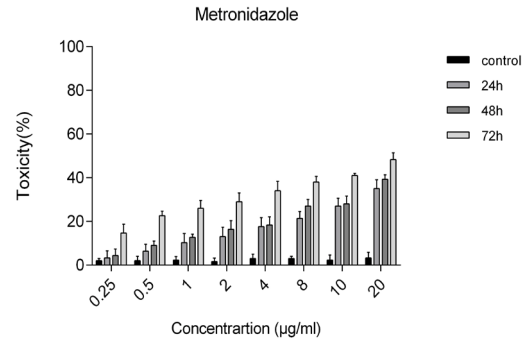
پپتید و ۲۰ میکروگرم مترونیدازول مشاهده شد. در تمام گروه‌ها، درصد سلول‌های آپوپتوزی اولیه بیش از گروه کنترل بود. در جدول شماره ۲، به تفکیک میزان آپوپتوز اولیه، تاخیری و نکروز در گروه‌های مختلف نشان داده شده است.

جدول شماره ۲: نتایج فلوسایتومتری سلول Caco-2 پس از تیمار با پپتید CM11 و مترونیدازول در مدت زمان ۲۴ ساعت

مرگ سلولی	کنترل	پپتید CM11 (µg/ml)				مترونیدازول (µg/ml)			
		۰/۵	۱	۲	۴	۰/۵	۱	۲	۴
آپوپتوز اولیه (درصد)	۰/۴±۰/۲	۵/۹±۰/۵	۶/۱±۱/۸	۶/۵±۲/۱	۳/۱±۰/۷	۳/۹±۱/۲	۳/۹±۱/۲	۴/۷±۰/۹	
آپوپتوز تاخیری (درصد)	۰/۲±۰/۱	۲۵/۵±۲/۸	۳۸/۶±۲/۲	۵۷±۴/۵	۸/۶±۱/۹	۹/۵±۱/۱	۱۶/۳±۲/۷	۱۶/۳±۲/۷	
نکروز (درصد)	۰/۳±۰/۲	۱/۷۸±۰/۹	۱/۷۸±۰/۹	۲/۹±۰/۶	۸/۵±۲/۹	۱±۰/۲	۱±۰/۲	۱/۹±۰/۸	

نتایج بررسی سمیت دارویی بر روی تروفوزوئیت ژیا ردیا لامبلیا

جهت بررسی تأثیر سمیت پپتید و مترونیدازول روی انگل ژیا ردیا لامبلیا غلظت‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت نتایج به دست آمده نشان داد که پایین‌ترین غلظت پپتید (۰/۵ µg/ml) بر روی انگل ژیا ردیا لامبلیا پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۵/۳±۰/۳ و ۲۷/۳±۱/۳ درصد کشندگی را ایجاد نموده است. در حالی که در بالاترین غلظت مورد استفاده از پپتید (۳۲ µg/ml) این مقادیر در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۹۹/۷±۰/۳ و ۹۹/۸±۰/۲ درصد بود. مترونیدازول با غلظت ۰/۵ µg/ml پس از گذشت ۲۴ ساعت بر روی انگل ژیا ردیا لامبلیا به میزان ۵۶/۹±۰/۷ درصد و در ۴۸ ساعت ۷۴/۹±۲/۴ درصد کشندگی مشاهده شد. در بالاترین غلظت مترونیدازول (۲۰ µg/ml) در ۲۴ ساعت، ۹۸/۲±۱/۰۱ درصد و در ۴۸ ساعت، ۹۹±۰/۶ درصد کشندگی دیده شد (جدول شماره ۳). در تمام گروه‌ها درصد کشندگی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (نمودار شماره ۲).



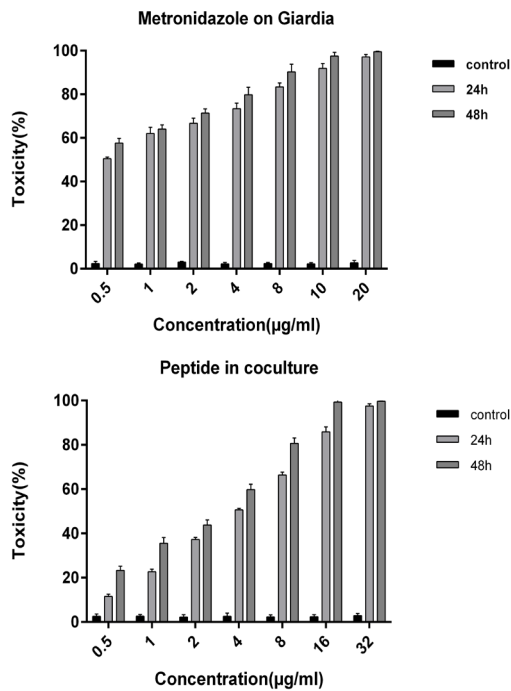
نمودار شماره ۱: الگوی سمیت دارویی پپتید CM11 و مترونیدازول روی سلول Caco-2 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های درمان و گروه کنترل مشاهده شد ($P \leq 0.05$). بین گروه‌های درمان پپتید بین غلظت‌های ۰/۵ تا ۳۲ با غلظت‌های ۰/۵ الی ۴ تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ($P \leq 0.05$). در گروه‌های درمان مترونیدازول بین زمان‌های ۷۲ با ۴۸ و ۲۴ ساعت تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ($P \leq 0.05$).

نتایج بررسی آپوپتوز القا شده توسط پپتید CM11 و مترونیدازول در سلول Caco-2

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوزی اولیه در گروه تیمار شده با پپتید CM11 در غلظت‌های ۰/۵، ۱۶ و ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۵/۹±۰/۵، ۴/۱±۱/۸ و ۶/۵±۲/۱ درصد و مترونیدازول در غلظت‌های ۰/۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳/۱±۰/۷، ۳/۹±۱/۲ و ۴/۷±۰/۹ درصد بود که بیش‌ترین درصد سلول‌های آپوپتوزی اولیه در غلظت ۳۲ میکروگرم

جدول شماره ۳: سمیت دارویی پپتید CM11 و مترونیدازول بر روی انگل ژیرادیا لامبلیا پس از تیمار با غلظت‌های مختلف

زمان	پپتید CM11 (µg/ml)						
	کنترل	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶
۲۴	۱/۷±۰/۳	۱۵/۳±۰/۳	۲۴/۴±۰/۸	۵۰/۷±۱/۵	۶۰/۶±۰/۶	۸۸/۸±۱/۶	۹۶/۴±۰/۵
۴۸	۳/۳±۰/۹	۲۷/۳±۱/۳	۳۱/۹±۰/۸	۶۰/۴±۰/۷	۷۴/۲±۰/۶	۹۶/۵±۰/۹	۹۹/۸±۰/۲
زمان	مترونیدازول (µg/ml)						
	کنترل	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۰
۲۴	۱/۷±۰/۳	۵۶/۹±۰/۷	۶۲/۹±۱/۵	۶۶/۶±۱/۵	۷۳/۵±۱/۳	۸۵/۵±۱/۳	۹۷/۵±۱
۴۸	۳/۳±۰/۹	۷۴/۹±۲/۴	۷۸/۸±۲/۲	۸۷/۹±۱/۴	۹۰/۸±۱/۲	۹۵±۱/۲	۹۸±۰/۶



نمودار شماره ۲: الگوی سمیت دارویی پپتید CM11 و مترونیدازول تروفوزوئیت ژیرادیا لامبلیا پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. تفاوت معنی دار بین گروه‌های درمان و گروه کنترل مشاهده شد ($p \leq 0/05$). بین گروه‌های درمان پپتید بین غلظت‌های ۸، ۱۶ و ۳۲ درصد با غلظت‌های ۰/۵ الی ۴ تفاوت معنی دار مشاهده شد ($p \leq 0/05$).

بررسی سمیت دارویی بر روی تروفوزوئیت ژیرادیا لامبلیا متصل به سلول Caco-2

۲۴ ساعت بعد از آلوده نمودن سلول Caco-2 به تروفوزوئیت انگل، درمان صورت گرفت. پس از جدا سازی تروفوزوئیت‌های آزاد مشخص شد که بیش از ۶۰ درصد تروفوزوئیت‌ها به سلول‌های میزبان اتصال یافته‌اند. نتایج به دست آمده نشان داد که درصد کشندگی پپتید CM11 با کم‌ترین (۰/۵ µg/ml) و بیشترین (۳۲ µg/ml) غلظت پس از گذشت ۲۴ ساعت بر روی ژیرادیا لامبلیا متصل به سلول به ترتیب $11/6 \pm 0/6$ و $97/5 \pm 0/6$ درصد بود که این مقادیر در ۴۸ ساعت در پایین‌ترین غلظت $23/3 \pm 1/1$ درصد و در بالاترین غلظت $99/7 \pm 0/1$ درصد بود (جدول شماره ۴ و نمودار شماره ۳). بالاترین درصد کشندگی مترونیدازول پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت ۲۰ µg/ml مشاهده شد، به طوری که به ترتیب $97/1 \pm 0/7$ و $99/5 \pm 0/3$ درصد بود.

نمودار شماره ۳: الگوی سمیت دارویی پپتید CM11 و مترونیدازول تروفوزوئیت ژیرادیا لامبلیا متصل به سلول Caco-2 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. تفاوت معنی دار بین گروه‌های درمان و گروه کنترل مشاهده شد ($p \leq 0/05$). بین گروه‌های درمان پپتید بین غلظت‌های ۸، ۱۶ و ۳۲ با غلظت‌های ۰/۵ الی ۴ تفاوت معنی دار مشاهده شد ($p \leq 0/05$).

بحث

با توجه به کشته شدن میلیون‌ها نفر در اثر عفونت‌های انگلی در سراسر جهان و عدم کفایت داروهای نظیر کلروکین در مقاومت دارویی مالاریا و یا سایر عفونت‌های انگلی چون لیشمانیا و کریپتوسپوریدیوم در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و...، استفاده از ترکیبات جدید به تنهایی و یا به عنوان مکمل درمان مطرح شده است.

جدول شماره ۴: سمیت دارویی غلظت های مختلف پپتید CM11 و مترونیدازول روی ژئاریدیا لامبلیا متصل به سلول در ۲۴ و ۴۸ ساعت

پپتید CM11 (µg/ml)							
زمان	کنترل	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۱۶
۲۴	۲/۵±۰/۷	۱۱/۶±۰/۶	۲۲/۷±۰/۷	۳۷/۳±۰/۵	۵۰/۶±۰/۴	۶۶/۴±۰/۷	۸۵/۹±۱/۳
۴۸	۲/۹±۰/۶	۲۳/۳±۱/۱	۳۵/۵±۱/۵	۴۳/۸±۱/۴	۵۹/۸±۱/۴	۸۰/۶±۱/۵	۹۹/۷±۰/۸
مترونیدازول (µg/ml)							
زمان	کنترل	۰/۵	۱	۲	۴	۸	۲۰
۲۴	۲/۵±۰/۷	۵۰/۴±۰/۴	۶۲/۱±۱/۶	۶۶/۷±۱/۴	۷۳/۴±۱/۵	۸۳/۴±۱/۱	۹۱/۸±۱/۳
۴۸	۲/۹±۰/۶	۵۷/۶±۱/۲۵	۶۴/۱±۱/۱	۷۱/۴±۱/۱	۷۹/۸±۲	۹۰/۳±۲/۱	۹۷/۵±۱

استفاده سیستمی آن‌ها می‌باشد (۳۴). در این مطالعه با استفاده از تکنیک MTT میزان سمیت سلولی CM11 بر روی سلول‌های Caco-2 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج MTT نشان داد که طی ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون پپتید با سلول، میزان سمیت وابسته به دوز می‌باشد. این در حالی است که با افزایش زمان انکوباسیون به ۷۲ ساعت از میزان سمیت کاسته می‌شود که می‌توان دلیل کاهش را به میزان پایداری این پپتید در محیط پیرامون سلول دانست زیرا در برخی از سلول‌ها نظیر Caco-2، ترشح پروتئاز موجب از بین رفتن پپتیدهای ضد میکروبی می‌شود (۳۵). سمیت این پپتید بر روی سلول‌های متعددی نظیر RAJI، SP2/0، HeLa، CHO و LNCAP مورد بررسی قرار گرفته است که بر روی هر یک از آن‌ها همانند Caco-2، سمیت پپتید وابسته به دوز بوده ولی یکسان نمی‌باشد (۲۶). بیشترین میزان سمیت مشاهده شده در این مطالعه مربوط به بالاترین غلظت (۳۲ µg/ml) CM11 بود که در زمان‌های ۲۴ الی ۷۲ ساعت انکوباسیون بیش از ۸۴-۸۹ درصد کشندگی را نشان می‌داد. این تفاوت حساسیت به پپتید احتمالاً به اختلاف در میزان فسفولیپیدها و استرول‌های اسیدی در ترکیب غشاء سلولی و جهت‌گیری ترکیبات فسفولیپیدی در دو لایه غشایی می‌باشد. مقادیر پایین فسفولیپید اسیدی و ترکیبات زیاد استرول در ساختارهای غشایی، از حساسیت سلول‌های یوکاریوتی به پپتیدهای لیزکننده می‌کاهد. این کاهش حساسیت به دلیل ثبات دو لایه لپیدی یا تعامل بین استرول و پپتید کاهش می‌یابد. مقادیر اندک فسفولیپید اسیدی همچنین باعث کاهش بار منفی سلول غشایی می‌شود که منجر به تعامل ضعیف بین پپتید و غشاء

کارایی پپتیدهای ضد میکروبی در عفونت‌های باکتریایی و قارچی به خوبی شناخته شده ولی به دلایل متعددی بر روی تک‌یاخته‌ها مطالعات اندکی صورت گرفته است (۳۲). پتانسیل بیماری‌زایی تک‌یاخته‌ها، محدود بودن آن‌ها به مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، شرایط اقتصادی مناطق درگیر این بیماری‌ها، هزینه‌های بالای تولید پپتیدهای ضد میکروبی و همچنین خصوصیات زیست‌شناسی و مراحل پیچیده زندگی آن‌ها (مراحل داخل سلولی، کیستی و...) عوامل دخیل در این ارتباط هستند. توسعه ترکیبات ضد تک‌یاخته‌ای نسبت به سایر عوامل عفونی کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است، در حالی که تک‌یاخته‌های انگلی مانند کریپتوسپوریدیوم و لیشرمانیا در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، نرخ مرگ و میر را بالا برده و نگران‌کننده هستند. با وجود تمام مشکلات یاد شده، تک‌یاخته‌ها مدل‌های جذابی جهت تحقیقات دارویی جدید هستند (۳۳).

در این مطالعه، مقایسه‌ای بین پپتید هیبریدی سکروپین-ملیتین (CM11) و داروی مترونیدازول در غلظت‌های مختلف بر روی تک‌یاخته ژئاریدیا لامبلیا انجام شد. پپتید CM11 از دو پپتید با فعالیت بالای ضد میکروبی سکروپین A و ملیتین گرفته شده است. این پپتید هیبریدی در واقع از بخش‌های کاتیونی سکروپین A و هیدروفوبی ملیتین ساخته شده که فعالیت آنتی‌بیوتیکی قوی‌تری نسبت به سکروپین داشته و بر روی میکروارگانیسم‌های مقاوم به سکروپین A عمل می‌کند. گاهی اوقات فعالیت تخریبی غشاء سیتوپلاسمی پپتیدهای ضد میکروبی بر روی برخی از سلول‌های یوکاریوت نظیر لیز گلبول‌های قرمز، مانع بزرگی در

استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروجنوزا، ویبریو کلرا، آسینتوباکتر بومانی و اشرشیاکلی انجام گرفت، میزان MIC و MBC در ۲۴ ساعت انکوباسیون به ترتیب برابر با ۸ و ۳۲ $\mu\text{g/ml}$ بود. در این مطالعه باکتری‌ها تا ۲۴ ساعت اولیه انکوباسیون به پیتید حساس بوده و با گذشت زمان تغییری در میزان کشندگی و اثرات مهارتی پیتید CM11 مشاهده نشد (۳۹). این در حالی است که اثرات کشندگی این پیتید روی تروفوزوئیت ژیا ردیا با گذشت زمان افزایش می‌یافت. در مطالعه‌ای دیگر اثرات هم افزایی CM11 بر اثرات ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم بر روی ۶ باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد که استفاده هم زمان CM11 با آنتی‌بیوتیک‌ها موجب کم شدن دوز کشنده آنتی‌بیوتیک شده و اثر هم‌افزایی آن به اثبات رسید (۱۷، ۴۰). اثرات کشندگی CM11 بر روی سالمونلا تیفی موریوم و کلبسیلا پنومونیه نشان داد که برای هر دو باکتری MBC برابر با ۳۲ $\mu\text{g/ml}$ بود، در حالی که MIC برای سالمونلا و کلبسیلا به ترتیب ۴ و ۸ $\mu\text{g/ml}$ بود (۲۶). تغییر در محتوی اسید آمینه CM11 (اسید آمینه تریپتوفان به جای لوسین در جایگاه ۳) نشان می‌دهد که اثرات سمیت سلولی را بر روی سلول‌های یوکاریوتی کاسته و از طرفی همان اثرات پیتید اصلی را بر روی بروسلا ملتینسیس خواهد داشت (۱۸).

تخریب دولایه لیپیدی توسط ملیتین مکانیسم Droste نام دارد (۴۱). کاترین‌ها یا همان یون‌های خنثی کننده شارژ الکتریکی غشاء سیتوپلاسمی نقش مهمی در پایداری غشاء و منافذ موجود در آن دارند. هنگامی که این یون‌ها حضور نداشته باشند، پارگی در غشاء سیتوپلاسمی رخ می‌دهد. از آنجائی که پیتید CM11 یک پیتید کاتیونی می‌باشد، با برهم زدن غلظت این یون‌ها، غشاء را در معرض پارگی قرار می‌دهد. چنین مکانیسم بازگشتی یا Droste، یک مکانیسم عمومی برای سورفکتانت‌ها و پیتیدهایی هستند که منجر به حل شدن غشا می‌شوند. دو مدل کلی برای مکانیسم مولکولی

سلولی می‌شود. همچنین گلیکوپروتئین‌های غشایی با شارژ منفی غشاء در ارتباط بوده و برخی از این گلیکوپروتئین‌ها منجر به تعامل پیتیدهای ضد میکروبی کاتیونی بر روی سلول‌های یوکاریوتی می‌شود (۳۶). نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بالاترین غلظت مورد استفاده از پیتید CM11 موجب آپوپتوز تاخیری در حدود ۵۷ درصد می‌شود. در طول فرایند آپوپتوز، سلول‌ها با استفاده از فسفاتیدیل سرین موجود در غشای خارجی سیتوپلاسمی، سیگنالی را به فاگوسیت‌ها فرستاده تا سلول‌های دچار آپوپتوز را پاکسازی کنند. در فاز تاخیری آپوپتوز، به علت از بین رفتن تمامیت غشای سیتوپلاسمی محتویات داخل سلولی به بیرون تراوش می‌نماید (۳۷). میزان بالای آپوپتوز در سلول‌هایی که با پیتید CM11 تیمار شده‌اند حاکی از آن است که این پیتید توان بسیار بالایی در از بین بردن تمامیت غشاء سیتوپلاسمی و در نتیجه مرگ سلولی دارد.

در این مطالعه به مقایسه اثرات سایتوتوکسیک CM11 و مترونیدازول بر روی ژیا ردیا لامبلیا در شرایط مختلف پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت ضد ژیا ردیایی این پیتید به تنهایی و در حالت متصل به سلول Caco-2 وابسته به دوز و زمان بوده است، به طوری که در غلظت‌های بالای پیتید (۱۶ و ۳۲ $\mu\text{g/ml}$) نتایج همانند غلظت‌های بالای مترونیدازول (۱۰ $\mu\text{g/ml}$) و ۲۰ (نزدیک به ۱۰۰ درصد کشندگی ایجاد شد. اختلاف بین میزان کشندگی پیتید CM11 بر روی ژیا ردیا و سلول Caco-2 را می‌توان به حضور کلسترول در غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های Caco-2 مرتبط دانست که موجب پایداری لایه‌های لیپیدی غشاء و محافظت آن در برابر آسیب‌های القایی از طرف پیتیدهای ضد میکروبی می‌شود (۳۶). تاکنون تنها بر روی لیشمانیا ماژور اثرات سایتوتوکسیک پیتید CM11 سنجیده شده است. این پیتید در غلظت ۳۲ $\mu\text{g/ml}$ همانند ژیا ردیا لامبلیا، بر روی لیشمانیا ماژور ۱۰۰ درصد اثر کشندگی داشته است (۳۸). در مطالعه‌ای که بر روی ۵ باکتری بیماری‌زای

طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که پپتید CM11 در مقایسه با مترونیدازول، اثر کشندگی بیش‌تری روی تروفوزوئیت‌های ژیا ردیا لامبلیا دارد. به علت القای آپوپتوز و میزان پایین نکرروز بر روی سلول‌های Caco-2، غلظت‌های مورد استفاده کم‌ترین میزان سمیت را دارند. از طرفی غلظت‌های مورد استفاده به علت خاصیت ضد ژیا ردیایی بالا، این پپتید را به عنوان کاندید مناسبی جهت مطالعات دارویی آتی بر روی این انگل و سایر انگل‌ها مطرح می‌کند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس (کد تاییدیه اخلاق پزشکی: IR.TMU.REC.1395.436 مصوب ۱۳۹۵/۹/۱۴) به انجام رسیده است. لذا بدین وسیله از همکاری‌های ارزنده این معاونت تشکر و قدردانی می‌نمایم.

عملکرد غشایی سکروپین پیشنهاد شده است: تشکیل منافذ در غشاء و carpet model (۴۲). سکروپین A و B در غشاء دو لایه لیپیدی با ایجاد کانال‌های یونی منجر به بی‌ثباتی و متعاقب آن جدا شدن این دو لایه می‌شوند. مشخص شده است که در مراحل اولیه بی‌ثباتی غشاء سیتوپلاسمی به وسیله پپتید، شکل‌گیری منافذ رخ می‌دهد، در حالی که برای تجزیه کامل و پارگی غشاء به تجمع و تراکم بالای پپتید نیاز است (۴۳). براساس مطالعات گذشته به نظر می‌رسد که پپتید CM11 بر اساس مکانیسم carpet like میکروارگانیزم‌ها را می‌کشد (۴۴،۴۵). براساس این مکانیسم، پس از پوشیده شدن غشاء سیتوپلاسمی توسط پپتید، غشاء ضخامت خود را از دست داده و در یک غلظت آستانه در غشاء سیتوپلاسمی تشکیل حفره‌های گذرای توروئیدال نموده و در غلظت‌های بالاتر از آن غشاء متلاشی شده و پس از تخریب دو لایه لیپیدی به صورت میسل در می‌آید (۴۸-۴۶).

References

- Özbilgin A, Ertan P, Yereli K, Tamay AT, Kurt Ö, Degerli K, et al. Giardiasis treatment in Turkish children with a single dose of ornidazole. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(12): 918-920.
- Mørch K, Hanevik K, Robertson LJ, Strand EA, Langeland N. Treatment-ladder and genetic characterisation of parasites in refractory giardiasis after an outbreak in Norway. *J Infect* 2008; 56(4): 268-273.
- Ali SA, Hill DR. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(5):453-460.
- Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol* 2017; 55(1): 1-12.
- da Cunha NB, Cobacho NB, Viana JFC, Lima LA, Sampaio KBO, Dohms SSM, et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov Today* 2017; 22(2): 234-248.
- Onardien S, Drijfhout JW, Vaz FM, Wenzel M, Hamoen LW, Zaat SAJ, et al. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 2018; 1860(11): 2404-2415.
- Lee T-H, N.Hall K, Aguilar M-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr Top Med Chem* 2016; 16(1): 25-39.
- Strandberg E, Grau-Campistany A, Zamora-Carreras H, Gagnon M-C, Mühlhäuser P, Wadhvani P, et al. Mode of Action of Antimicrobial Peptides: Long and Short

- Amphipathic Alpha-Helices Use Different Mechanisms. *Biophys J* 2017; 112(3): 381a.
9. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett* 2017; 402: 16-31.
 10. Tassanakajon A, Somboonwivat K, Amparyup P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol* 2015; 48(2): 324-341.
 11. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 2005; 134(2): 183-189.
 12. Bland JM, De Lucca AJ. Identification of cecropin A proteolytic cleavage sites resulting from *Aspergillus flavus* extracellular protease(s). *J Agric Food Chem* 1998; 46(12): 5324-5327.
 13. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, et al. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2003; 24(9): 1315-1318.
 14. Yevtushenko DP, Romero R, Forward BS, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. *J Exp Bot* 2005; 56(416): 1685-1695.
 15. Woo HJ, Wallqvist A. Spontaneous buckling of lipid bilayer and vesicle budding induced by antimicrobial peptide magainin 2: A coarse-grained simulation study. *J Phys Chem B* 2011; 115(25): 8122-8129.
 16. Polyansky AA, Ramaswamy R, Volynsky PE, Sbalzarini IF, Marrink SJ, Efremov RG. Antimicrobial peptides induce growth of phosphatidylglycerol domains in a model bacterial membrane. *J Phys Chem Lett* 2010; 1(20): 3108-3111.
 17. Amani J, A Barjini K, M Moghaddam M, Asadi A. In vitro synergistic effect of the CM11 antimicrobial peptide in combination with common antibiotics against clinical isolates of six species of multidrug-resistant pathogenic bacteria. *Protein Pept Lett* 2015; 22(10): 940-951.
 18. Moravej H, Fasihi-Ramandi M, Moghaddam MM, Mirnejad R. Cytotoxicity and Antibacterial Effect of Trp-Substituted CM11 Cationic Peptide Against Drug-Resistant Isolates of *Brucella melitensis* Alone and in Combination with Recommended Antibiotics. *Int J Pept Res Ther* 2019; 25(1): 235-245.
 19. Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B. Cecropin A—derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol plant-microbe Interact* 1998; 11(3): 218-227.
 20. Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, et al. Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Sci Rep* 2016; 6: 27394.
 21. Badosa E, Ferre R, Planas M, Feliu L, Besalú E, Cabrefiga J, et al. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* 2007; 28(12): 2276-2285.
 22. Cruz A, Sousa MI, Azeredo Z, Leite E, de Sousa JCF, Cabral M. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: In vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(4): 1017-1020.
 23. Céu Sousa M, Poiaraes-Da-Silva J. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(12): 2939-2942.

24. Korman SH, Hais E, Spira DT. Routine in vitro cultivation of *Giardia lamblia* by using the string test. *J Clin Microbiol* 1990; 28(2): 368-369.
25. Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, Van Der Giezen M, et al. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 2003; 426(6963): 172-176.
26. Moghaddam MM, Barjini KA, Ramandi MF, Amani J. Investigation of the antibacterial activity of a short cationic peptide against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* strains and its cytotoxicity on eukaryotic cells. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30(5): 1533-1540.
27. Müller J, Rühle G, Müller N, Rossignol JF, Hemphill A. In vitro effects of thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1): 162-170.
28. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 1-6.
29. Wlodkovic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol* 2009; 559: 19-32.
30. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; 111(1): A3-B.
31. Fisher BS, Estraña CE, Cole JA. Modeling long-term host cell-*Giardia lamblia* interactions in an in vitro co-culture system. *PLoS One* 2013; 8(12): e81104.
32. Kang SJ, Park SJ, Mishig-Ochir T, Lee BJ. Antimicrobial peptides: Therapeutic potentials. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12(12): 1477-1486.
33. Torrent M, Pulido D, Rivas L, Andreu D. Antimicrobial Peptide Action on Parasites. *Curr Drug Targets* 2012; 13(9): 1138-1147.
34. Steckbeck JD, Deslouches B, Montelaro RC. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14(1): 11-14.
35. Rico-Mata R, De Leon-Rodriguez LM, Avila EE. Effect of antimicrobial peptides derived from human cathelicidin LL-37 on *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Exp Parasitol* 2013; 133(3): 300-306.
36. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? *Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim Biophys Acta* 1999; 1462(1-2): 1-10.
37. Brauchle E, Thude S, Brucker SY, Schenke-Layland K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Sci Rep* 2014; 15(4): 4698.
38. Khalili S, Ebrahimzade E, Mohebbi M, Shayan P, Mohammadi-Yeganeh S, Moosazadeh Moghaddam M, et al. Investigation of the antimicrobial activity of a short cationic peptide against promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MHRO/IR/75/ER): An in vitro study. *Exp Parasitol* 2019; 196: 48-54.
39. Moghaddam MM, Abolhassani F, Babavalian H, Mirnejad R, Barjini KA, Amani J. Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2012; 4(2): 133-139.
40. Azad ZM, Moravej H, Fasihi-Ramandi M, Masjedan F, Nazari R, Mirnejad R, et al. In vitro synergistic effects of a short cationic peptide and clinically used antibiotics against

- drug-resistant isolates of *Brucella melitensis*. *J Med Microbiol* 2017; 66(77): 919-926.
41. Sengupta D, Leontiadou H, Mark AE, Marrink S-J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(10): 2308-2317.
42. Melo MN, Ferre R, Castanho MARB. Antimicrobial peptides: Linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(3): 245-250.
43. Efimova SS, Schagina L V, Ostroumova OS. Channel-forming activity of cecropins in lipid bilayers: Effect of agents modifying the membrane dipole potential. *Langmuir* 2014; 30(26): 7884-7892.
44. Ferre R, Badosa E, Feliu L, Planas M, Montesinos E, Bardají E. Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(5): 3302-3308.
45. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2002; 66(4): 236-248.
46. Lee MT, Hung WC, Chen FY, Huang HW. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1; 105(13): 5087-5092.
47. Madani F, Lindberg S, Langel Ü, Futaki S, Gräslund A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J Biophys* 2011; 2011: 414729.
48. Papo N, Shai Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(7-8): 784-790.