تاثیر جزء پروتئینی و DNA *توکسوپلاسما گوندی* بر تولید نیتریک اکساید و رشد و بقاء ماکروفاژهای صفاقی

نویسندگان:

سعید دانشمندی*[1]، منیره حاجی مرادی[1]، مریم رودباری[2]، افشین آماری[3]

۱- بخش ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲ - بخش قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳ - بخش پاتوبیولوژی، بخش ایمنی شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی جهرم، دوره هشتم ، شماره یک ، بهار ۸۹

چکیده:

مقدمه: *توکسوپلاسما گوندی* یک انگل داخل سلولی اجباری است که به طیف وسیعی از سلول ها از جمله ماکروفاژها حمله کرده و در آن ها به صورت زنده می ماند. جزئی از *توکسوپلاسما* که در ساز و کارگریز آن از سیستم ایمنی و دفاع *توکسوپلاسما* شرکت می کند به طور کامل مشخص نشده است. در این مطالعه تاثیر جزء DNA و پروتئین *توکسوپلاسما* بر روی توانایی تکثیر و تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژهای صفاقی بررسی شد.

روش کار:

زنده بودن ماکروفاژها به کمک آزمون توانایی احیاء ۳- (۴ و ۵- دی متیل تترازول-۲-یل) ۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم برماید (MTT) و میزان تولید نیتریت با استفاده از روش گریس ارزیابی شد.

یافته ها:

میزان احیاء MTT و در نتیجه میزان رشد و فعالیت در دوز ۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر به طور معنی داری کم تر از کنترل منفی بود (P=۰/۰۲۲)، ولی در مورد سایر دوزهای پروتئینی از نظر آماری معنی دار نبود (P>۰/۰۵). به علاوه دوزهای مختلف از جزء پروتئینی *توکسوپلاسما* بر میزان تولید نیتریک اکساید تاثیری نداشتند (P>۰/۰۵). میزان احیاء MTT و تولید نیتریک اکساید در دوزهای مختلف جزء DNA تفاوتی نداشتند (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری:

مطابق با نتایج حاصل از این مطالعه، جزء پروتئینی *توکسوپلاسما* اثر مهارکنندگی وابسته به دوز بر روی حیات و فعالیت ماکروفاژها دارد ولی بر میزان تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژ تاثیری ندارد. جزء DNA تخلیص شده از توکسوپلاسما میزان تولید نیتریک اکساید و حیات مارکروفاژها را تحت تاثیر قرار نمی دهد. بنابراین توانایی گریز *توکسوپلاسما گوندی* از ساز و کارهای دفاعی ماکروفاژ وابسته به جزئی از ترکیب پروتئینی آن است.

واژگان کلیدی:

توکسوپلاسما گوندی، ماکروفاژ، نیتریک اکساید، آزمون MTT

مقدمه :

توکسوپلاسما گوندی انگلی داخل سلولی از شاخه اپی کمپلکسا (Apicomplexa) است که به صورت یک پاتوژن فرصت طلب مهم ایجاد توکسوپلاسموزیس می کند [۱].

درفاز حاد بیماریتاکی زوآیت های انگل به سرعت تکثیر می یابند که معمولاً این عفونت و تکثیر با آغاز تحریک سیستم ایمنی بیمار همراه است. به طور معمول پاسخ های ایمنی ایجاد شده با بروز برادی زوایت ها همراهند که نشانه ای بر مزمن شدن بیماری است. عفونت با *توکسوپلاسما* در افراد با نقص ایمنی و ایدز قابل توجه است [۲]. مطالعات اهمیت پاسخ های تیپ I سایتوکاینی (Th1) و نقش مشخص اینترفرون گاما (IFN-γ) را در مقاومت به عفونت *توکسوپلاسما گوندی* نشان داده اند [۳]. برخی مطالعات در محیط زنده و آزمایشگاه (IN VIVO and IN VITRO) نیز نقش اینترفرون گاما و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF - α) در القاء پاسخ های ضد انگلی وابسته به نیتریک

* نویسنده مسئول: آدرس: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

تلفن: ۸۲۸۸۴۵۲۹-۰۲۱ تلفن همراه: ۰۹۱۷۷۱۶۵۷۸۸ پست الکترونیک: daneshmandi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت۱۳۸۷/۱۱/۲۱ تاریخ اصلاح:۱۳۸۸/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۳

اکساید را بیان کرده اند [۴ و ۵].
توکسوپلاسما گوندی می تواند طیف وسیعی از سلول های موجودات خونگرم، بویژه ماکروفاژها را آلوده کرده و در آنها زنده باقی بماند [۶]. نیتریک اکساید (NO) تولید شده از ماکروفاژها یکی از مهم ترین واسطه های دفاعی در مقابل *توکسوپلاسما* بوده [۷ و ۸] و سایتوکاین های مختلف ماکروفاژها را در جهت تولید نیتریک اکساید و واسطه های فعال اکسیژن و در نتیجه مقابله و از بین بردن انگل های زنده درون آن ها تحریک می کند به طوری که ماکروفاژهای تحریک شده با اینترفرون گاما، انگل را مهار می کنند. ولی هم در آزمایشگاه و هم در موجود زنده نشان داده شده است که انگل ها می توانند در مقابل این سیستم دفاعی ماکروفاژها مقابله کنند و درون سلول ها زنده باقی مانده و حتی تکثیر یابند [۹ و ۱۰]. برخی مطالعات نشان داده اند که انگل های درون ماکروفاژ، تولید نیتریک اکساید و دیگر واسطه ها را مهار کرده و کاهش می دهند [۶].
این ویژگی های توکسوپلاسما گوندی همواره مورد سوال بوده است که کدامین جزء انگل، وظیفه ایجاد قابلیت مقاومت در مقابل پاسخ های ایمنی و کدام قسمت از *توکسوپلاسما* نقش خنثی سازی عملکردهای ضد انگلی ماکروفاژ را به عهده دارند به گونه ای که انگل به راحتی می تواند درون ماکروفاژ تکثیر کند. در مطالعه حاضر برای بررسی این که کدام جزء *توکسوپلاسما گوندی* سبب مهار پاسخ های ایمنی و ماکروفاژها می شود، اجزاء پروتئینی و DNA انگل را جدا کرده و تاثیر آن ها بر روی بقاء و زنده بودن ماکروفاژهای صفاقی موش و توانایی تولید نیتریک اکساید از این ماکروفاژها مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار:

توکسوپلاسما گوندی

در این مطالعه از سویه RH *توکسوپلاسما گوندی* که به صورت مخزن در صفاق موش ها نگهداری می شد استفاده شده است. پس از ۴-۳ روز از آلوده کردن موش ها با انگل، ماکروفاژهای آلوده از صفاق موش خارج شدند. برای تهیه آنتی ژن، محتویات صفاق ۱۰-۸ بار از سرسوزن ۲۷ عبور داده شد تا ماکروفاژها پاره گردند و تاکی زوآیت ها آزاد شوند.

استخراج DNA توکسوپلاسما گوندی

برای جداسازی و تخلیص DNA از کیت استخراج DNA شرکت کیاژن آلمان (Cat.no.51304) استفاده شد. به طور خلاصه طبق روش مشخص شده در کیت به پلیت باکتریایی مقدار ۱۸۰ میکرولیتر محلول۲۰ میکروگرم در میلی لیتر لیزوزیم افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۳۷ قرار داده شد. به سوسپانسیون حاصله ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه و سپس آن ها را مخلوط کرده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۵۶ و سپس در دمای ^{o}C ۹۵ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. بعد از این مرحله ۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۹۶-۱۰۰ در صد به نمونه اضافه شد. بعد از آن ماده حاصله به ستونی که در لوله ۲ میلی‌لیتری قرارداشت منتقل شد. سپس به مدت ۱ دقیقه آن را درشتاب ۶۰۰۰ g (۸۰۰۰rpm) سانتریفوژ کرده و لوله حاوی مواد فیلتر شده دور ریخته شد. بعد از فیلترکردن، محلول تا زمان انجام آزمایشات در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری شد. درضمن میزان جذب ماده با دستگاه بیوفتومتر ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.

استخراج اجزاء پروتئین توکسوپلاسما گوندی

برای جداسازی و تخلیص پروتئین از کیت شرکت کیاژن آلمان (Cat.no.37900) استفاده شد. برای این کار ابتدا ۱۰ میلی لیتر از بافر لیزات (حاوی لیزوزیم و بنزوناز) به پلیت انگلی اضافه کرده و به روش مخلوط کردن سوسپانسیون یکنواخت تهیه شد. سپس سوسپانسیون آماده شده به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و به مدت ۳-۲ دقیقه روی یخ بهم زده تا محلولی یکنواخت حاصل شود. پس از آن با دور ۴۰۰۰g در دمای ^{o}C ۴ به مدت ۳۰ دقیقه محلول را سانتریفیوژ کرده و قسمت روئی برای ارزیابی پروتئین جمع آوری شد. بعد از فیلتر کردن، غلظت پروتئین محلول حاصل با اسپکتروفوتومتری محاسبه شد و نمونه تا زمان آزمایش در ^{o}C ۲۰- نگهداری شد.

جداسازی، کشت و تحریک ماکروفاژها

ماکروفاژها از صفاق موش های BALB/c جنس ماده ۸-۶ هفته ای که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، جدا شدند. برای جداسازی ماکروفاژها، ۱۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 (سیگما) سرد به درون صفاق موش ها تزریق و سپس کشیده شد. سلول ها در محیط RPMI حاوی مواد مکملی به صورت ۲ گرم در لیتر سدیم بی کربنات، ۲ میلی مولار L-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به صورت سوسپانسیونی از $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر در آمده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون درون هر پلیت ۹۶ خانه ای (نانک) به مدت ۴ ساعت در ^{o}C ۳۷ و CO2 ۵ درصد کشت داده شد. در زمان انکوباسیون، سلول های چسبان (۹۵ درصد ماکروفاژ) به ته پلیت چسبیدند. سپس سلول های غیر چسبان با سه بار شستشو به وسیله محلول RPMI با دمای ^{o}C ۳۷ شستشو داده شدند.
برای تحریک ماکروفاژها از غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰، ۵ و ۰/۵

نانوگرم در میلی لیتر پروتئین های *توکسوپلاسما گوندی* و غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ نانوگرم در میلی لیتر DNA استخراج شده از *توکسوپلاسما گوندی* استفاده شد. هر یک از غلظت های آنتی ژنی به صورت سه تایی به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای کشت ماکروفاژها اضافه شد . یک سری سلول ماکروفاژ تنها بدون تحریک به عنوان گروه کنترل منفی و یک سری ماکروفاژ تحریک شده با IFN-γ به عنوان گروه کنترل مثبت کشت داده شدند.

سنجش غلظت نیتریت

در هنگام کشت ماکروفاژها NO به درون محیط کشت آزاد می شود. این ماده ناپایدار است و به سرعت به نیتریت و نیترات تبدیل می شود. در نتیجه می توان میزان نیتریت در محیط کشت را با روش استور و ناتان (Nathan, Stuehr) [۱۱] اندازه گیری نمود. در این روش از معرف گریس استفاده می شود. بدین نحو که پس از ۴۸ ساعت از کشت ماکروفاژها، سوپ روئی کشت برداشته و به میزان ۱ به ۱ با معرف گریس و در پلیت ۹۶ خانه ای مخلوط می شود (آزمایش نمونه ها به صورت ۳ تایی انجام می گرفت). بعد از ۱۵ دقیقه میزان جذب (OD) در طول موج ۵۴۰ نانومتر به کمک دستگاه میکروپلیت ریدر مولتی اسکن (Microplate reader Multi Skan) اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت نیتریت از نمودار استاندارد (۲۰۰-۱ میکرو مولار) از محلول سدیم نیتریت ($NaNO_2$) استفاده شد.

آزمون MTT

آزمون MTT بر اساس احیاء ۳-(۴و۵- دی متیل تترازول-۲-یل)۲و۵- دی فنیل تترازولیوم برماید (MTT) می باشد که نشان دهنده فعالیت متابولیک داخل سلولی است. هر چقدر تعداد سلول ها بیش تر باشند میزان احیاء MTT بیشتر خواهد بود و بالعکس [۱۲]. پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت ماکروفاژها، ۲۰ میکرو لیتر (۵ میلی گرم در میلی لیتر PBS) MTT (شرکت مرک) به چاهک ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در 37^oC انکوبه شد. پس از انکوباسیون محیط روئی کشت به آرامی برداشته شد و ۱۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول ۵ درصد HCl (سیگما) به چاهک ها اضافه شد تا کریستال های فرمازان تشکیل شده حل شده، سبب ایجاد رنگ شوند. میزان جذب چاهک هادرطول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. نتایج بدست آمده بر حسب ایندکس تحریک (Stimulation Index: SI) محاسبه شد که SI میزان جذب ۵۴۰ هر تست به جذب ۵۴۰ کنترل منفی می باشد.

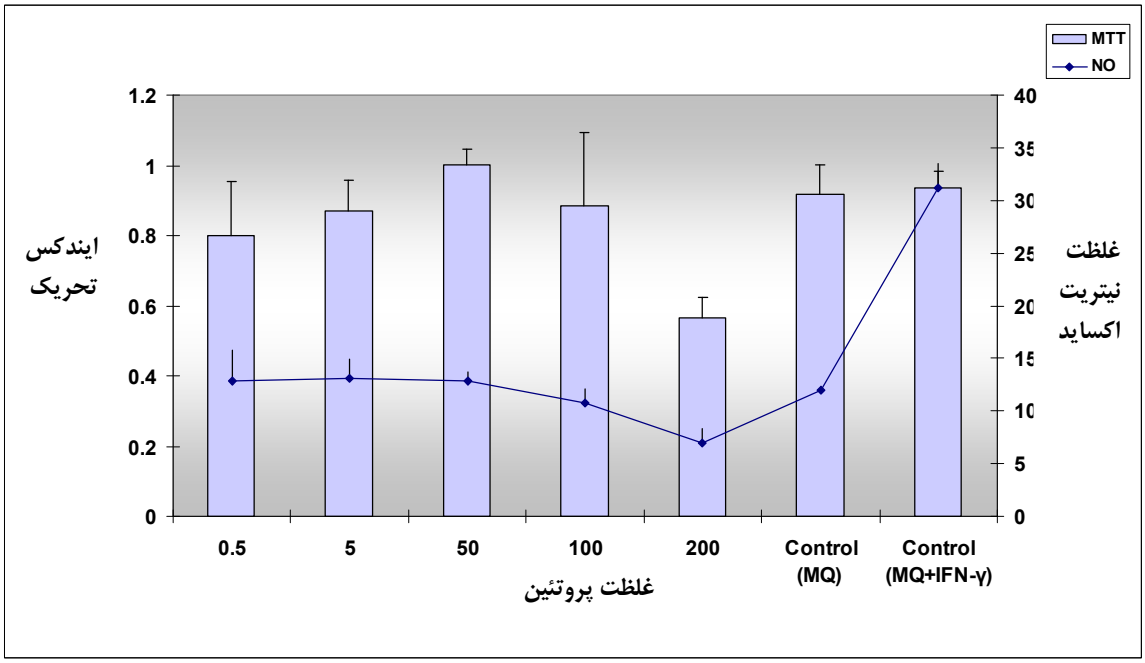
تحلیل های آماری

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده است. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده و تحلیل های آماری روی داده های آزمون ها در غلظت های مختلف آنتی ژنی DNA و پروتئین با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey) انجام شدند. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شد.

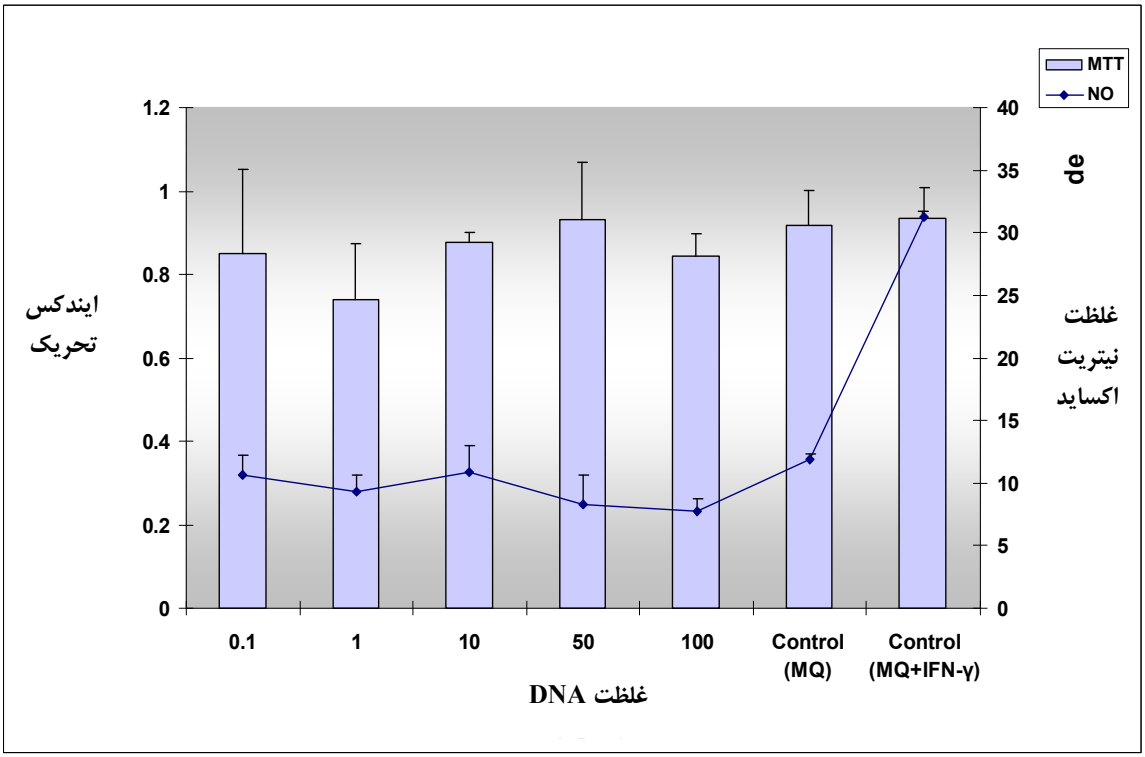
یافته ها:

نتایج آزمون MTT و سنجش نیتریک اکساید ماکروفاژهای مواجهه شده با پروتئین های تخلیص شده از *توکسوپلاسما گوندی* در شکل ۱ نشان داده شده است. مقایسه ایندکس تحریک (SI) (شاخصی از تعداد سلول ها) غلظت های مختلف آنتی ژنیک پروتئینی در برابر گروه کنترل منفی نشان می دهد که ایندکس تحریک در گروه های مختلف با گروه کنترل منفی تفاوت معنی داری ندارد ($P>0/05$)، اما در گروه ۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر به طور قابل توجهی از نظر آماری کاهش یافته است ($P=0/022$). میزان تولید نیتریک اکساید در غلظت های مختلف پروتئینی نیز تفاوتی نشان نداده است ($P>0/05$).

نتایج آزمونMTT و سنجش نیتریک اکساید تولیدی از ماکروفاژها در مواجهه با جزء DNA ی *توکسوپلاسما* در شکل ۲ آورده شده است. مقادیر بدست آمده از بررسی آماری حاکی از آن است که میزان ایندکس تحریک MTT و غلظت نیتریت تولید شده از ماکروفاژها در غلظت های مختلف DNA تخلیص شده از *توکسوپلاسما* در مقایسه با یک دیگر و گروه کنترل تفاوت بارزی نداشته است ($P>0/05$). لازم به ذکر است که میزان تولید نیتریک اکساید در غلظت ۱۰۰ نانو گرم در میلی لیتر از DNA کاهش یافته بود، اما این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/091$). آزمون MTT و غلظت نیتریک اکساید سلول های تحریک شده با IFN-γ در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه های مختلف آنتی ژنی DNA و پروتئین به طور معنی داری افزایش یافته بود ($P<0/001$).



شکل ۱: نتایج آزمون MTT و سنجش نیتریک اکساید ماکروفاژهای مواجهه شده با پروتئین های تخلیص شده از *توکسوپلاسما گوندی*. میانگین ± انحراف معیار ایندکس تحریک (SI) در غلظت ۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر جزء پروتئینی به طور معنی داری کاهش یافته است (P=۰/۰۲۲).



شکل ۲: نتایج آزمون MTT و سنجش نیتریک اکساید ماکروفاژهای مواجهه شده با DNA ی تخلیص شده از *توکسوپلاسما گوندی*. میانگین ± انحراف معیار ایندکس تحریک (SI) و میزان نیتریک اکساید تولیدی شده در غلظت های مختلف تفاوت معنی داری را نشان نمی دهند (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری:

توکسوپلاسما گوندی انگلی فراگیر در دنیاست که بسیاری از سلول های جانوران خونگرم از جمله ماکروفاژها را آلوده می کند. این انگل در مقابل پاسخ های ایمنی مقاومت کرده و می تواند در این سلول ها زنده باقی بماند. تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژها یکی از ساز وکارهای دفاعی بسیار با اهمیت در مقابل *توکسوپلاسماست*. به طوری که مشاهده شده است تولید نیتریک اکساید با محافظت در مقابل *توکسوپلاسموزیس* چشمی همراه است [۱۳].

ولی *توکسوپلاسما گوندی* می تواند تولید نیتریک اکساید را از طریق مهار iNOS کنترل نماید [۶]. مشاهده شده است که *توکسوپلاسما* با ساز و کارهایی سبب القاء آپوپتوزیس در ماکروفاژهای غیر آلوده مجاور می شود [۱۴].

جزء پروتئینی *توکسوپلاسما گوندی* می تواند جزء بالقوه مهارکننده ماکروفاژها باشد. شواهد نشان داده است که استئوپروتئین های گرانول های دنس *توکسوپلاسما* در ایجاد *توکسوپلاسموزیس* نقش دارند [۱۵] و *توکسوپلاسما گوندی* حاوی پروتئین های ترشحی و غشائی است که موجب مهار فاگوزوم ها می شود [۱۶]. گزارش شده است پروتئین شبه پاتاتین (patatin-like) *توکسوپلاسما گوندی* از تجزیه شدن انگل درون ماکروفاژها جلوگیری می کند [۱۷].

یکی از اهداف مطالعه حاضر یافتن جزء *توکسوپلاسما گوندی* عامل بروز خاصیت های مقاومت و بقاء در ماکروفاژها بوده است. نتایج بررسی آزمون MTT در مورد جزء پروتئینی *توکسوپلاسما* نشان داد که میزان بقاء ماکروفاژها درغلظت های بالاتر (۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) پروتئین بطور شاخصی پائین تر از سلول های طبیعی بوده است. می توان نتیجه گرفت که جزء پروتئینی حاوی ترکیب یا ترکیباتی (پروتئین هایی) است که موجب مهار رشد و فعالیت ماکروفاژها می شود و احتمالاً جزء موثر انگل در مهار ماکروفاژها جزء موجود در پروتئین های انگل است.

مطالعات دیگر ی نیز این مطلب را تائید کرده اند . علاوه بر مشاهدات ذکر شده در بالا، نشان داده شده است که داروهایی نظیر آزیتومایسین [۱۸] و کلیندامایسین [۱۹] که پروتئین سازی انگل را مهار می کنند سبب تحریک *توکسوپلاسما گوندی* به از بین رفتن درون ماکروفاژها می شوند. نتایج نشان داد که جزء پروتئینی بر میزان تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژها تاثیر معنی دار تحریکی یا مهار کنندگی نداشته است. مطالعه ای بر روی ماکروفاژهای جوجه (chicken) نشان داده که آلودگی ماکروفاژها سبب کاهش تولید نیتریک اکساید شده است [۶] و مطالعه ای دیگر بر روی ماکروفاژهای موشی کاهش تولید نیتریک اکساید را درماکروفاژهای آلوده شده با *توکسوپلاسما* نشان داده است [۲۰]. لیکن مطالعه مشخصی بر روی اجزاء پروتئینی *توکسوپلاسما* و اثر آن بر تولید نیتریک اکساید صورت نگرفته است. نتایج بررسی اثر جزء DNA بر روی ماکروفاژها حاکی از این است که جزء DNA انگل اثری بر قدرت تکثیر و یا تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژها ندارد و درنتیجه جزئی که سبب مهار عملکرد ماکروفاژ و بقاء انگل و یا حتی مواردی که سبب تحریک پاسخ های ضد انگلی ماکروفاژ می شود، ملکول های DNA انگل نمی باشند. شاید بتوان نتیجه گرفت که DNA به طور غیرمستقیم و پس از ترجمه شدن اثرات احتمالی تحریکی با مهاری خود را اعمال می‌کند. در مجموع از نتایج این مطالعه می توان گفت که جزء پروتئینی *توکسوپلاسما گوندی* جزء با اهمیت در مهار رشد و بقاء ماکروفاژهاست و جزء DNA اثر مشخصی بر روی ماکروفاژها ندارد. برای مشخص شدن دقیق جزء پروتئینی که باعث مهار پاسخ ماکروفاژ می شود، نیاز به انجام مطالعات بیش تر بر روی اجزاء خالص و مشخص انگل خواهد بود.

تقدیر و تشکر: در خاتمه از جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله و جناب آقای دکتر زهیر محمد حسن به خاطر راهنمایی های جامع و راهگشای شان در تدوین مقاله حاضر تشکر و قدردانی می شود.

References: منابع:

1. Alexander J, Scharton-Kersten M, Yap G, et al.Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1997; 352(1359): 1355-9.
2. Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune response deficiency syndrome. JAMA 1984; 252(7): 913-917.
3. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, et al. Interferon-γ: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Sci 1988; 240 (4851): 516-518.
4. Deckert-Schluter M, Bluethmann H, Rang A, et al. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. J Immunol 1998; 160 (7) : 3427-3436.
5. Langermans JA, Van Der Hulst ME, Nibbering PH, et al. IFN-γ induced L-argininedependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-α. J Immunol 1992 148 (2): 568-574.
6. Guillermo LV, DaMatta RA. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. Poultry Sci 2004; 83(5): 776-782.
7. Adams LB, Hibbs JBJ, Taintor RR, et al. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from 1-arginine. J Immunol 1990; 144(7): 2725-2729 .
8. Murray,HW,Teitelbaum,RF.1-argininedependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. J Infect Dis 1992; 165(3): 513-517.
9. Zhao Y, Wilson D, Matthews S, et al. Rapid elimination of *Toxoplasma gondii* by gamma interferon-primed mouse macrophages is independent of CD40 signaling. Infect Immun 2007; 75(10): 4799-4803.
10. Sibley LD, Adams LB, Fukutomi AY, et al. Tumor necrosis factor-α triggers antitoxoplasmal activity in IFN-γ primed macrophages. J Immunol 1991;147(7): 2340-5.
11. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasisand respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med 1989; 169(5): 1543-55.
12. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, et al. An improved MTT assay. J Immunol Methods 1993; 157(1-2): 203-7.
13. Hayashi S, Chan C, Gazzinelli RT, et al. Protective role of nitric oxide in ocular toxoplasmosis. British J Ophthalmo 1996; 80(7): 644-648.
14. Nishikawa Y, Kawase O, Vielemeyer O, et al.*Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. Parasite Immunol 2007; 29(7): 375-85.
15. Cortez E, Carolina Stumbo A, Saldanha-Gama R, et al. Immunolocalization of an osteopontin-like protein in dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and its association with the parasitophorous vacuole. Micron 2008; 39(1): 5-31.
16. David Sibley L, James L, Krahenbuhl G, et al. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. J Cell Biol 1986; 103(3): 867-874.
17. Mordue DG, Scott-Weathers CF, Tobin CM, et al. A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages. Mol Microbiol 2007; 63(2): 482-496.
18. Blais J, Garneau V, Chamberland S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* protein synthesis by azithromycin. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(8): 1701-1703.
19. Blais J, Tardif C, Chamberland S.Effect replication, of clindamycin on intracellular protein synthesis, and infectivity of *Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(12): 2571-2577.
20. Sergio SH, Wanderley DS, Renato DA *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitricoxid producti of activated murine macrophages.Exp Parasitol 2002;100(1):62-70.

Nitric Oxide Production and Growth and Survival of Peritoneal Macrophages

Daneshmandi S* [1], Hajimoradi M[1], Roudbary M[2], Amari A[3]

1. Dept. of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Dept. of Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Dept. of Immunology, School of public Health, Tehran University of Medical Sciences. Tehran, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Seiences Vol. 8, No.1, Spring 2010

Abstract:

Introduction:
Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that invades a wide variety of host cells including macrophages and survives within it. The parts of Toxoplasma that participate in the mechanism of its evasion from immune system and macrophage defenses are not completely defined. In this study, we evaluated the effect of protein and DNA Toxoplasma fractions on proliferation and nitric oxide production by peritoneal macrophages.
Material and Methods:
The viability of macrophages was evaluated using3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) reduction assay and the production of nitrite using Griess method.
Results:
MTT reduction and hence the growth and viability of macrophages in a dose of 200 ng/ml was significantly lower than those of the negative control (P=0.022); in other lower doses of protein it was not statistically significant (P>0.05). Different doses of *Toxoplasma* protein fraction did not affect NO production (P>0.05). MTT assay and NO production in different doses of DNA fraction was not different (P>0.05).
Conclusion:
According to the results of the present study, protein fraction of *Toxoplasma* has a suppressive effect on macrophage viability, but this effect is dose dependent. Protein fraction of *Toxoplasma* does not affect the amount of NO production by macrophage. The isolated DNA fraction of *Toxoplasma* did not influence the viability and NO production of macrophages. So, the ability of evasion of *Toxoplasma* gondii from macrophage defense is due to a component of its protein.

Keywords:
Toxoplasma gondii, Macrophage, Nitric Oxide, MTT assay

* Corresponding author، ، E-mail: daneshmandi@modares.ac.ir