

# تأثیر جزء پروتئینی و DNA توکسوپلازما گوندی بر تولید نیتریک اکساید و رشد و بقا ماکروفاژهای صفافی

نویسندگان:

سعید دانشمندی\*<sup>۱</sup>، منیره حاجی مرادی<sup>۱</sup>، مریم رودباری<sup>۲</sup>، افشین آماری<sup>۳</sup>  
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:** توکسوپلازما گوندی یک انگل داخل سلولی اجباری است که به طیف وسیعی از سلول‌ها از جمله ماکروفاژها حمله کرده و در آن‌ها به صورت زنده می‌ماند. جزئی از توکسوپلازما که در ساز و کارگریز آن از سیستم ایمنی و دفاع توکسوپلازما شرکت می‌کند به طور کامل مشخص نشده است. در این مطالعه تأثیر جزء DNA و پروتئین توکسوپلازما بر روی توانایی تکثیر و تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژهای صفافی 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 تترازولیموم برماید (MTT) و میزان تولید نیتریک اکساید با استفاده از روش گریس ارزیابی شد.

## یافته‌ها:

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 ( $P=0/022$ )، ولی در مورد سایر دوزهای پروتئینی از نظر آماری معنی دار نبود ( $P>0/05$ ). به علاوه دوزهای مختلف از جزء پروتئینی توکسوپلازما بر میزان تولید نیتریک اکساید تأثیری نداشتند ( $P>0/05$ ). میزان احیاء MTT و تولید نیتریک اکساید در دوزهای مختلف جزء DNA تفاوتی نداشتند ( $P>0/05$ ).

## بحث و نتیجه گیری:

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

## واژگان کلیدی:

توکسوپلازما گوندی، ماکروفاژ، نیتریک اکساید، آزمون MTT

## مقدمه:

بیماری است. عفونت با توکسوپلازما در افراد با نقص ایمنی و ایدز قابل توجه است [۲]. مطالعات اهمیت پاسخ‌های تیپ I سائتوکاینی (Th1) و نقش مشخص اینترفرون گاما ( $\gamma$ -IFN) را در مقاومت به عفونت توکسوپلازما گوندی نشان داده اند [۳]. برخی مطالعات در محیط زنده و آزمایشگاه (and IN VITRO) نیز نقش اینترفرون گاما و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF -  $\alpha$ ) در القاء پاسخ‌های ضد انگلی وابسته به نیتریک

توکسوپلازما گوندی انگلی داخل سلولی از شاخه اپی کمپلکسا (Apicomplexa) است که به صورت یک پاتوژن فرصت طلب مهم ایجاد توکسوپلازموزیس می‌کند [۱]. درفاز حاد بیماریتاکسی زوایت‌های انگل به سرعت تکثیر می‌یابند که معمولاً این عفونت و تکثیر با آغاز تحریک سیستم ایمنی بیمار همراه است. به طور معمول پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده با بروز برادی زوایت‌ها همراهند که نشانه‌ای بر مزمن شدن

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۱/۲۱ تاریخ اصلاح: ۱۳۸۸/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۳

حاصله ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه و سپس آن ها را مخلوط کرده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $56^{\circ}\text{C}$  و سپس در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  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 میلی لیتری قرار داشت منتقل شد. سپس به مدت ۱ دقیقه آن را درشتاب  $6000\text{ g}$  ( $8000\text{ rpm}$ ) سانتریفیوژ کرده و لوله حاوی مواد فیلتر شده دور ریخته شد. بعد از فیلترکردن، محلول تا زمان انجام آزمایشات در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد. در ضمن میزان جذب ماده با دستگاه بیوفتومتر  $260/280$  نانومتر اندازه گیری شد.

استخراج اجزاء پروتئین توکسوپلازما گوندی برای جداسازی و تخلیص پروتئین از کیت شرکت کایزن آلمان (Cat.no.37900) استفاده شد. برای این کار ابتدا ۱۰ میلی لیتر از بافر لیزات (حاوی لیزوزیم و بنزوزان) 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 ۲-۳ دقیقه روی یخ بهم زده تا محلولی یکنواخت حاصل شود. پس از آن با دور  $4000\text{ g}$  در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  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  $20^{\circ}\text{C}$ - 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  $\text{L-}$  گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به صورت سوسپانسیونی از  $10^6 \times 1/5$  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  $37^{\circ}\text{C}$  و  $5\text{ CO}_2$  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  $37^{\circ}\text{C}$  شستشو داده شدند. برای تحریک ماکروفاژها از غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰، ۵ و ۰/۵

اکساید را بیان کرده اند [۴ و ۵]. توکسوپلازما 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 توکسوپلازما 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 توکسوپلازما گوندی همواره مورد سوال بوده است که کدامین جزء انگل، وظیفه ایجاد قابلیت مقاومت در مقابل پاسخ های ایمنی و کدام قسمت از توکسوپلازما 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 توکسوپلازما 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:

##### توکسوپلازما گوندی

در این مطالعه از سویه RH توکسوپلازما گوندی که به صورت مخزن در صفاق موش ها نگهداری می شد استفاده شده است. پس از ۳-۴ 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 توکسوپلازما گوندی

برای جداسازی و تخلیص DNA از کیت استخراج DNA شرکت کایزن آلمان (Cat.no.51304) استفاده شد. به طور خلاصه طبق روش مشخص شده در کیت به پلیت باکتریایی مقدار ۱۸۰ میکرولیتر محلول ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر لیزوزیم افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. به سوسپانسیون

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  $\pm$  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 در نظر گرفته شد.

#### یافته ها:

نتایج آزمون MTT و سنجش نیتریک اکساید ماکروفاژهای مواجهه شده با پروتئین های تخلیص شده از توکسوپلازما 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 آزمون MTT و سنجش نیتریک اکساید تولیدی از ماکروفاژها در مواجهه با جزء DNA توکسوپلازما در شکل ۲ آورده شده است. مقادیر بدست آمده از بررسی آماری حاکی از آن است که میزان ایندکس تحریک MTT و غلظت نیتریک تولید شده از ماکروفاژها در غلظت های مختلف DNA تخلیص شده از توکسوپلازما 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- $\gamma$  در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه های مختلف آنتی ژنی DNA و پروتئین به طور معنی داری افزایش یافته بود ( $P < 0/001$ ).

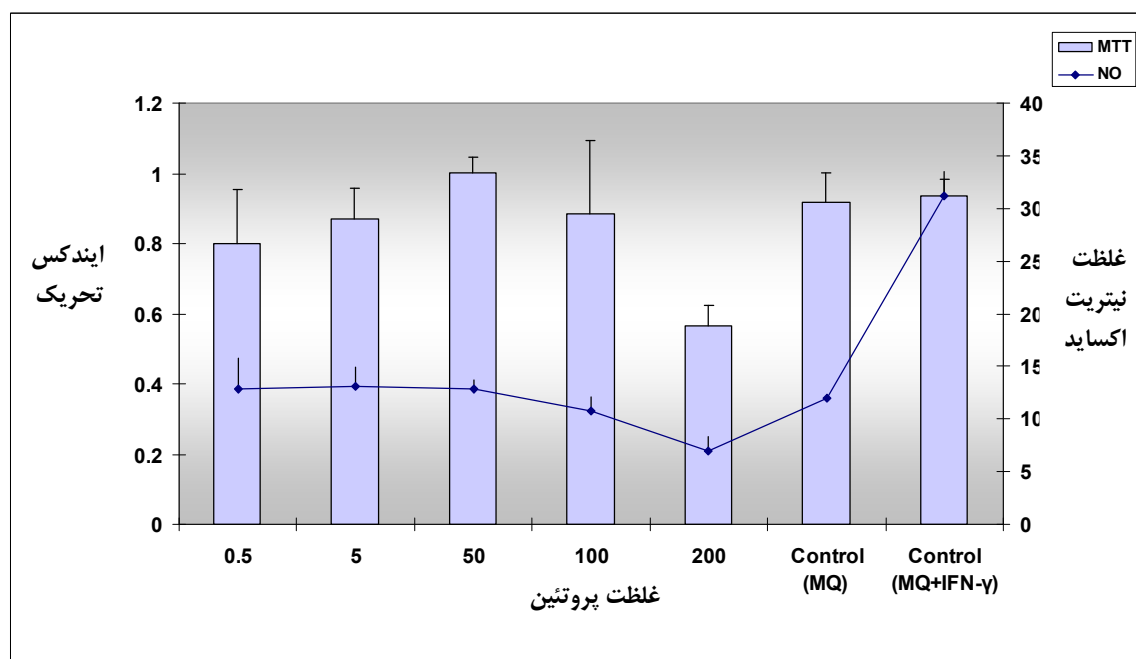
نانوگرم در میلی لیتر پروتئین های توکسوپلازما گوندی و غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ نانوگرم در میلی لیتر DNA استخراج شده از توکسوپلازما گوندی استفاده شد. هر یک از غلظت های آنتی ژنی به صورت سه تایی به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای کشت ماکروفاژها اضافه شد. یک سری سلول ماکروفاژ تنها بدون تحریک به عنوان گروه کنترل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

#### سنجش غلظت نیتریک

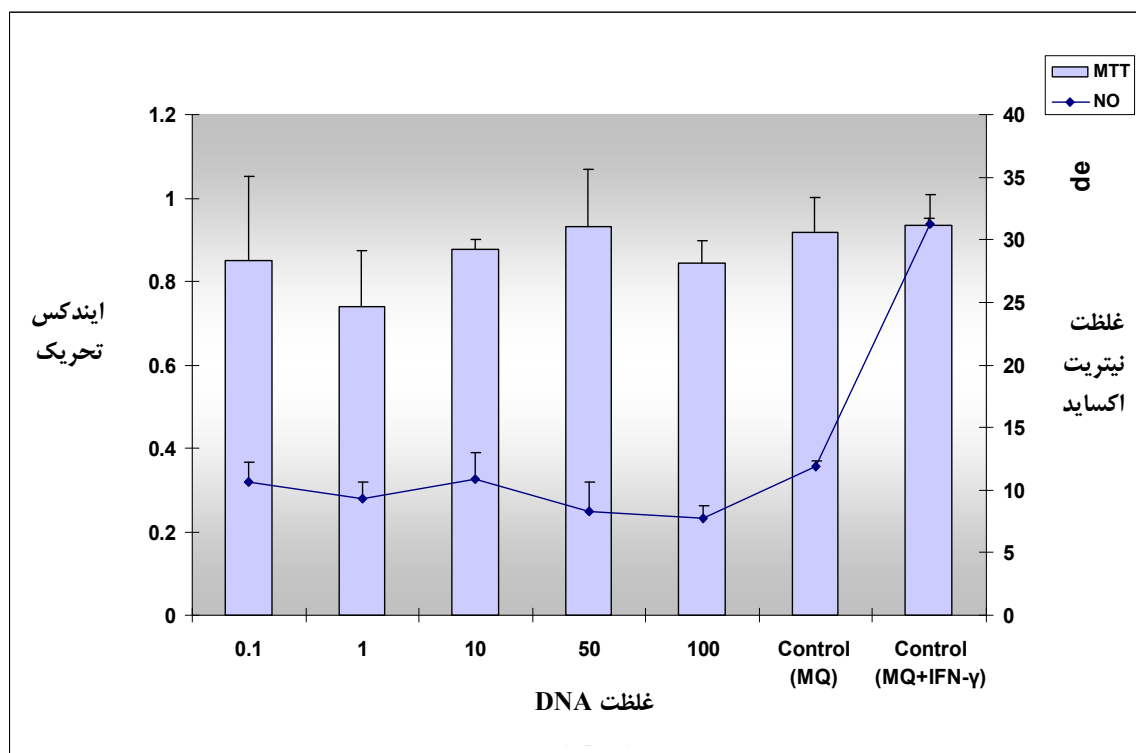
در هنگام کشت ماکروفاژها NO به درون محیط کشت آزاد می شود. این ماده ناپایدار است و به سرعت به نیتريت و نیترات تبدیل می شود. در نتیجه می توان میزان نیتريت در محیط کشت را با روش استور و ناتان (Nathan, Stuehr) [۱۱] اندازه گیری نمود. در این روش از معرف گریس استفاده می شود. بدین نحو که پس از ۴۸ ساعت از کشت 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 نیتريت از نمودار استاندارد (۲۰۰-۱ میکرو مولار) از محلول سدیم نیتريت (NaNO<sub>2</sub>) استفاده شد.

#### آزمون MTT

آزمون MTT بر اساس احیاء ۳-(۴-۵ دی متیل تترازول-۲-یل)۲-۵ 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 ۳۷°C 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



شکل ۱: نتایج آزمون MTT و سنجش نیتريت اکساید ماکروفاژهای مواجهه شده با پروتئین های تخلیص شده از توکسوپلاسما گوندی. میانگین  $\pm$  انحراف معیار ایندکس تحریک (SI) در غلظت ۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر جزء پروتئینی به طور معنی داری کاهش یافته است ( $P=0/022$ ).



شکل ۲: نتایج آزمون MTT و سنجش نیتريت اکساید ماکروفاژهای مواجهه شده با DNA ی تخلیص شده از توکسوپلاسما گوندی. میانگین  $\pm$  انحراف معیار ایندکس تحریک (SI) و میزان نیتريت اکساید تولیدی شده در غلظت های مختلف تفاوت معنی داری را نشان نمی دهند ( $P>0/05$ ).

## بحث و نتیجه گیری:

توکسوپلازما 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 و کارهای دفاعی بسیار با اهمیت در مقابل توکسوپلازماست. به طوری که مشاهده شده است تولید نیتریک اکساید با محافظت در مقابل توکسوپلازما همراهِ است [۱۳].

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

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

یکی از اهداف مطالعه حاضر یافتن جزء توکسوپلازما گوندی عامل بروز خاصیت های مقاومت و بقا در ماکروفاژها بوده است. نتایج بررسی آزمون MTT در مورد جزء پروتئینی توکسوپلازما نشان داد که میزان بقا ماکروفاژها در غلظت 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 دیگری نیز این مطلب را تأیید 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 توکسوپلازما گوندی به از بین رفتن درون ماکروفاژها می شوند. نتایج نشان داد که جزء پروتئینی بر میزان تولید نیتریک اکساید از ماکروفاژها تأثیر 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 در ماکروفاژهای آلوده شده با توکسوپلازما نشان داده است [۲۰]. لیکن مطالعه مشخصی بر روی اجزاء پروتئینی توکسوپلازما 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 در نتیجه جزئی که سبب مهار عملکرد ماکروفاژ و بقا 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 مهار خود را اعمال می کند. در مجموع از نتایج این مطالعه می توان گفت که جزء پروتئینی توکسوپلازما گوندی جزء با اهمیت در مهار رشد و بقا 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, Scharon-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- $\gamma$ : 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- $\gamma$  induced L-arginine dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *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 L-arginine. *J Immunol* 1990; 144(7): 2725-2729.
8. Murray, HW, Teitelbaum, RF. L-arginine dependent 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- $\alpha$  triggers antitoxoplasmal activity in IFN- $\gamma$  primed macrophages. *J Immunol* 1991; 147(7): 2340-5.
11. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and 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 Ophthalmol* 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 nitric oxide product of activated murine macrophages. *Exp Parasitol* 2002; 100(1): 62-70.

# Nitric Oxide Production and Growth and Survival of Peritoneal Macrophages

Daneshmandi S\*<sup>1</sup>, Hajimoradi M<sup>1</sup>, Roudbary M<sup>2</sup>, Amari A<sup>3</sup>

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 Sciences 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 using 3-(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