مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن *P2X7R* درده سلولی THP-1 مجاورشده با آنتی ژن STAg *توکسوپلاسماگوندی*

نویسندگان:

پریسا ئیل بیگی[۱]، جاوید صدرایی*[۲]، فاطمه غفاری فر[۳]، سید داور سیادت[۴]، حامد میرجلالی[۵]

۱- دانشجوی دکتری انگل شناسی ،گروه انگل شناسی وحشره شناسی ، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

۲ - دانشیارگروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

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

۴ - استاد میکروب شناسی،بخش تحقیقات باکتری شناسی، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران

۵- استادیار انگل شناسی مرکز تحقیقات بیماری های منتقله از راه غذا و آب، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.1, Spring 2023

چکیده:

مقدمه: انگل *توکسوپلاسماگوندی* عامل بیماری توکسوپلاسموزیس است و شکل اصلی بیماری زایی آن تاکی زوئیت می‌باشد. یکی از مهمترین سدهای دفاعی در مقابل این انگل ماکروفاژها هستند. ماکروفاژهای آلوده به توکسوپلاسماگوندی از طریق فعال شدن گیرنده *P2X7R* به حذف انگل کمک می‌کنند. هدف مطالعه حاضر بررسی بیان ژن *P2X7R* درسلول‌های رده منوسیت / ماکروفاژی THP-1 مجاور شده با غلظت های مختلف آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت *توکسوپلاسماگوندی* بود.

روش کار: در مطالعه اخیر سلول‌های رده ماکروفاژی THP-1 با غلظت های ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی ژن محلول تاکی‌زوئیت *توکسوپلاسماگوندی* به مدت چهار ساعت مجاور شدند. پس از استخراج RNA کلی و سنتز cDNA به روش Real time PCR بیان این ژن ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که پس از چهار ساعت همه غلظت‌های آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی در کشت سلولی تیمار شده سبب کاهش بیان ژن P2X7R می‌شوند. بیشترین کاهش بیان این ژن در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. همچنین کاهش بیان ژن مذکور با غلظت آنتی ژن درگروه ها ارتباط معناداری نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی سویه RH می تواند سبب کاهش بیان ژن *P2X7R* و احتمالاً کمک به فرار انگل از سیستم ایمنی شود.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسماگوندی، آنتی ژن محلول تاکی زوئیت *توکسوپلاسماگوندی* (ST-Ag)، سلول رده ماکروفاژTHP-1، گیرنده *P2X7*

Pars J Med Sci 2023;21(1):38-44

مقدمه:

توکسوپلاسماگوندی (*T. gondii*) یک انگل تک یاخته‌ای است که از طیف وسیعی از میزبان‌ها گزارش شده است. این انگل نزدیک به ۳۰ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار داده و در بیماران دچار نقص ایمنی تهدیدی برای زندگی محسوب می‌شود [۱]. گربه سانان تنها میزبان قطعی و همه پستانداران خون گرم از جمله انسان میزبان میانی این انگل هستند. شکل بیماری‌زای اصلی انگل در مرحله تاکی زوئیت است. تاکی‌زوئیت‌ها به سرعت در تمام سلول‌های هسته‌دار میزبان میانی تکثیر می‌شود که در این وضعیت، توانایی ایجاد یک پاسخ ایمنی سریع برای مهار تکثیر تاکی زوئیت ضروری است [۲، ۳].

یکی از مهمترین عوامل دفاعی در برابر این انگل ماکروفاژها هستند. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که توکسوپلاسماگوندی از سلول‌های ایمنی ذاتی مانند ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک برای مهاجرت به مکان‌های عفونت و اندام های هدف همچون

* نویسنده مسئول، نشانی: دکتر جاوید صدرایی: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی ، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، تهران، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۱۲۵۰۱۶۲۵۴ پست الکترونیک: sadraeij@modares.ac.ir

دریافت:۱۴۰۲/۰۳/۲۰ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۴/۱۹ پذیرش:۱۴۰۲/۰۴/۱۹

سیستم عصبی مرکزی استفاده می‌کند و عفونت مزمن مادام العمر ایجاد می‌کند [۴]. این انگل با غلبه بر سازوکارهای ضد میکروبی میزبان با تولید ROS و NO و اتصال فاگوزوم به لیزوزوم (به واکوئل انگلی)، القای مرگ سلول میزبان و ترشح سیتوکین‌های پیش‌التهابی، در داخل سلول‌های میزبان زنده می‌ماند [۵].
تاکی‌زوئیت مرحله اصلی زندگی توکسوپلاسما است که مسئول بیماری توکسوپلاسموزیس است. در طول عفونت با توکسوپلاسماگوندی، تاکی زوئیت ها ایجاد التهاب می‌کنند. ایمنی ذاتی به عنوان اولین دیواره دفاعی در برابر توکسوپلاسما است که باعث تحریک پاسخ‌های التهابی به ویژه در ماکروفاژها در راستای محدود کردن بار انگل و ایجاد عفونت می‌شود [۶].
مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گیرنده *P2X7R* یک فعال کننده مهم پاسخ پیش التهابی ضد انگلی است که در اوایل آلودگی ژن‌های اتوفاژی را فعال کرده و باعث حذف سلول آلوده می‌شود [۷]. در این مطالعه بیان این ژن با استفاده از غلظت های مختلف آنتی‌ژن محلول تاکی‌زوئیت توکسوپلاسماگوندی در رده سلولی THP-1 بررسی شد.

روش کار:

تهیه آنتی‌ژن محلول تاکی‌زوئیت توکسوپلاسماگوندی

سویه RH تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسماگوندی از آزمایشگاه دکتر فاطمه غفاری فر (دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران) تهیه و سپس در حفره صفاقی موش‌های آزمایشگاهی سفید BALB/c آلوده تکثیر شد. سپس تاکی‌زوئیت‌های برداشته شده و با PBS (pH =7.4) شسته شدند. وضعیت زنده ماندن آن‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ارزیابی شد. برای تهیه آنتی ژن محلول تاکی‌زوئیت توکسوپلاسماگوندی $۱۰^{۷}$ × ۱٫۶ تاکی زوئیت تازه به ۷ میلی‌لیتر PBS استریل حاوی بازدارنده پروتئاز (Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) اضافه شد. به منظور تهیه آنتی‌ژن محلول خام با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (UPS400) عمل سونیکه (۳۰ پالس در دامنه ۷۰ درصد و چرخه ۰٫۷) برای سه چرخه یک دقیقه‌ای در حالی که pH روی ۷–۸ نگه داشته شده بود، انجام شد. سپس برای حذف مهارکننده‌های پروتئاز و تغلیظ آنتی‌ژن محلول توکسوپلاسماگوندی، نمونه در کیسه دیالیز با کات آف ۱۷ کیلو دالتون ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در ظرف حاوی PBS در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی صفحه گردان مغناطیسی غوطه ور شد. آنتی‌ژن محلول توکسوپلاسماگوندی باقی مانده به کمک صافی پلی اتر سولفون (PES) با اندازه منافذ ۰٫۲۲ میکرومتر استریل و به لوله‌های استریل ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. غلظت پروتئین با استفاده از روش BCA با کیت پارس طوس (LOT2046) مورد ارزیابی قرار گرفت [۸]. آنتی ژن محلول توکسوپلاسماگوندی به دست آمده در دمای ۷۰– درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

کشت سلول THP-1

برای انجام سنجش سلولی، رده سلولی لوسمی مونوسیت انسانی: (THP-1) Cell line (ATCC: TIB- 202) تهیه شده از بانک سلول انستیتو پاستور استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت کامل سلولی حاوی RPMI-1640، ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (FBS)، ۱درصد پنیسیلین و استرپتومایسین (سیگما آلدریچ، ایالت متحده آمریکا) تکمیل شد. در ادامه فلاسک 25-cm^2 صافی دار حاوی سلول‌ها THP-1 به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۰ درصد و ۵ درصد CO_2 قرار داده شد [۹].
سلول‌های THP-1 با لام نئوبار شمارش و سپس به پلیت‌های ۲۴ خانه کشت (۲×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک) منتقل شدند. برای تمایز این سلول ها به ماکروفاژ ۵۰ نانوگرم PMA از شرکت (Santa Cruz Biotechnology Cat No. sc-3576) به هر چاهک منتقل و سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO2 به مدت ۳۶ ساعت انکوبه شدند. تمایز با میکروسکوپ معکوس تایید شد.

تیمار سلول های THP-1 با غلظت های مختلف آنتی ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی، استخراج RNA، سنتز cDNA، Quantitative Real-Time PCR

اثر غلظت های آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی در رده سلولی THP-1 تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مدت زمان چهار ساعت روی بیان ژن *P2X7R* مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس RNA با کیت شرکت یکتا تجهیز آزما (Total RNA Purification Mini kit, Cat No: YT9065) استخراج شد. به منظور حذف آلودگی DNA و بهبود کیفیت RNA استخراج شده از DNase طبق پروتکل شرکت سازنده (Thermo Fisher Scientific™) استفاده شد. برای سنتز cDNA بر اساس پایین‌ترین غلظت RNA، مقدار RNA تام مورد نیاز محاسبه و سپس از روی RNA استخراج شده، cDNA به کمک کیت شرکت یکتا تجهیز آزما(cDNA Synthesis Kit) سنتز شد. لازم به ذکر است که قبل از سنتز، غلظت RNA های تخلیص شده با خواندن OD آن‌ها توسط دستگاه NanoDrop (Multi-Mode reader ,SYNERGY/HTX BioTek) تعیین شد .
بیان ژن *P2X7R* با استفاده از Real-time PCR با پرایمر اختصاصی و با استفاده از شرایط ذکر شده بررسی شد (جدول ۱ تا ۳). سطح بیان با مقایسه ژن *P2X7R* با ژن بتا اکتین (β-actin) به عنوان ژن داخلی محاسبه شد. سطح بیان نسبی هر ژن با

استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نرم افزار بیان نسبی (REST) تحلیل شد.

تحلیل آماری

برای تحلیل آماری نتایج بیان ژن و همچنین رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS 16 (Chicago, IL, USA) و GraphPad Prism Version 8.3.0.538 استفاده شد. برای مقایسه اختلاف در بیان ژن در پنج گروه مورد مطالعه از آزمون های آماری تی و تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. P-value ≤ ۰/۰۵ به عنوان سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

نتایج به دست آمده از بیان ژن *P2X7R* در پنج گروه با غلظت‌های ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی ژن محلول تاکی‌زوئیت توکسوپلاسماگوندی درکشت سلولی THP-1 حاکی از کاهش بیان در تمام گروه ها با بیشترین کاهش بیان در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. بیان این ژن درگروه با غلظت های ۱۰۰، ۸۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری داشتند (۰/۰۲۸۰, ۰/۰۳۴۳, P-value = ۰/۰۰۰۰۱) که بیشترین اختلاف مربوط به گروه با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. در سایر غلظت ها اختلاف معنادار نبود. همچنین در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی پس از ۴ ساعت باعث کاهش ۲/۰۳۵۵ برابری بیان ژن در سلول‌های THP-1 شد. آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه ارتباط آماری معناداری بین گروه‌ها نشان نداد (تصویر ۱).

جدول ۱: پرایمرهای ژن های P2X7Rf و βactf مورد استفاده در مطالعه

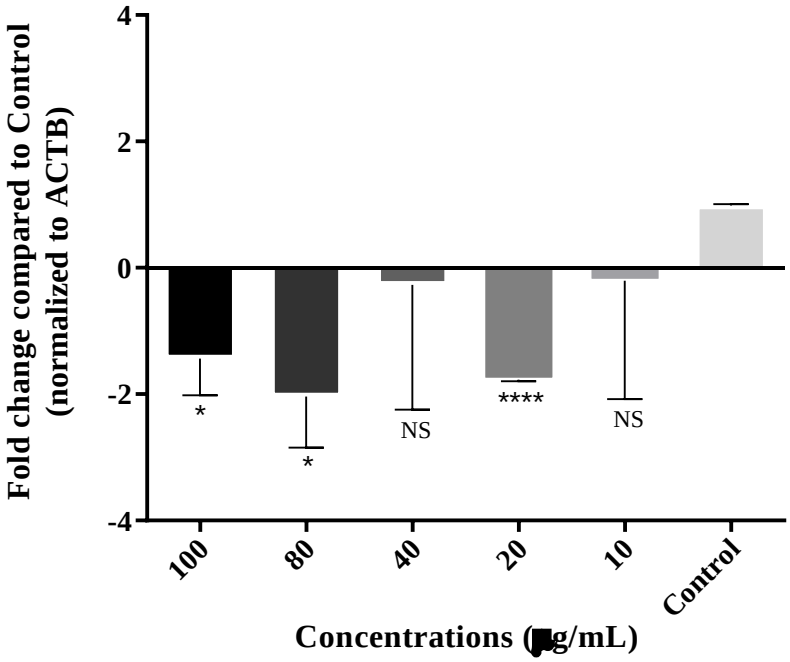
مرجع	نام ژن	طول پرایمر	توالی '5 به '3	نام پرایمر
[۱۰]	P2X7R	۲۲	GAAGAAGTGCGAGTCCATTGTG	P2X7Rf
		۲۰	CATCGCAGGTCTTGGGACTT	P2X7Rr
[۱۱]	βact	۲۰	ATGTGGCCGAGGACTTTGATT	βactf
		۲۰	AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG	βactr

جدول ۲ : مواد لازم برای انجام واکنش RT-PCR

مواد	مقدار (میکرولیتر)
SYBR Green qPCR Master Mix 2X	7
cDNA (10 ng)	2
Forward Primer (10 pmol)	0.75
Reverse Primer (10 pmol)	0.75
DW	4.5
Total Volume	15

جدول ۳: برنامه دستگاه برای انجام واکنش Quantitative Real-time PCR

چرخه	زمان	دما	مراحل	
1	10 min	95°C	Initial Denaturation	اول
40	25 sec	95ºC	Denaturation	دوم
	30 sec	60ºC	Annealing	
	20 sec	72ºC	Extension	
1	5 min	72°C	Final extension	سوم



بحث:

توکسوپلاسماگوندی در سلول‌های مونوسیت / ماکروفاژها زنده مانده و تکثیرمی‌شوند. توکسوپلاسماگوندی در افراد مبتلا به کمبود ایمنی به عنوان بیماری حاد شناخته می‌شود که منجر به التهاب و آسیب بافتی شدید می‌شود [۱۲]. در سال‌های اخیر، مطالعات جدیدی در ارتباط با مسیر پوریینرژیک در ایجاد پاسخ ایمنی علیه پاتوژن‌های داخل سلولی انجام شده و اهمیت آن ها را در مقابل عفونت تایید کرده‌اند [۱۳]. همچنین نشان داده شده که گیرنده *P2X7* یک فعال کننده مهم پاسخ پیش التهابی ضد انگلی است که در اوایل آلودگی رخ می‌دهد [۱۲، ۱۴]. گیرنده مذکور همچنین ژن‌های اتوفاژی را فعال کرده و باعث حذف سلول آلوده می‌شود [۱۵]. فعالیت گیرنده *P2X7* توسط *eATP* باعث تشکیل کمپلکس NALRP3 و فعال‌سازی کاسپاز۱ شده که IL1β نابالغ را به بالغ تبدیل کرده و التهاب ایجاد می‌کند [۱۶]. به علاوه، فعال شدن این گیرنده باعث پدیده های التهابی همچون مرگ سلولی توسط آپوپتوز یا نکروز می‌شود [۱۷]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که فعال شدن *P2X7R* توسط ATP خارج سلولی *(eATP)* در ماکروفاژهای آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی به حذف انگل از طریق ترشح ترکیبات فعال اکسیژن *(ROS)*، ترکیب لیزوزوم با فاگوزوم و همچنین فعال کردن ژن‌های اتوفاژی کمک می‌کند [۷، ۱۸].

کشتن با واسطه ATP مرتبط با فعال‌سازی *P2X7R* برای جلوگیری از تکثیر توکسوپلاسماگوندی ضروری است و از دست دادن عملکرد *P2X7R* در جمعیت انسانی باعث ایجاد حساسیت بالاتر در نتیجه بیماری می‌شود [۱۹]. به دلیل سهم زیاد آن‌ها در پاکسازی پاتوژن، مطالعات زیادی روی نقش مسیر پورینرژیک در تأثیرگذاری بر عملکرد کشتن ماکروفاژها متمرکز شده‌اند [۲۰]. نشان داده شده است که فعال شدن گیرنده *P2X7* توسط ATP خارج سلولی (*eATP*) در ماکروفاژهای آلوده به توکسوپلاسماگوندی به حذف انگل توسط تولید ROS و ادغام لیزوزوم با واکوئل پارازیتوفور کمک می‌کند [۲۱].

توکسوپلاسماگوندی مدل خوبی برای بررسی نقش این واسطه‌های پورینرژیک در کنترل عفونت‌های داخل سلولی در مرحله حاد بیماری است. اوبرایان نشان داد تحریک با آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی در موش باعث کاهش میزان تیتر ویروس آنفولانزای پرندگان *N1*۵ شده و افزایش بقا را در موش‌های آلوده به این ویروس ایجاد می‌کند که نشان می‌دهد درمان با این آنتی‌ژن می‌تواند ایمنی را علیه پاتوژن‌های غیر مرتبط تحریک کند [۲۲]. بنابر این، به نظر می‌رسد توکسوپلاسماگوندی از طریق *P2X7R* می تواند سبب تحریک سیستم ایمنی شود. در این مطالعه بیان ژن *P2X7R* در رده سلولی THP1 تیمارشده با غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی بررسی شد که نتایج به دست آمده از پنج گروه با غلظت‌های ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این آنتی‌ژن در کشت سلولی THP-1 به مدت چهار ساعت حاکی از کاهش بیان ژن در تمام گروه ها بود. همچنین مشخص شد ارتباطی بین بیان ژن *P2X7R* و غلظت

آنتی ژن مورد نظر وجود ندارد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، می توان گفت در مراحل ابتدایی ورود انگل توکسوپلاسما، احتمالاً این انگل از طریق پروتئین‌های ترشحی خود سبب سرکوب *P2X7R* شده تا بتواند در سلول تکثیر شود.

نتیجه گیری:

مطالعه ایمنی‌زایی توکسوپلاسما می تواند به شناخت نقش این انگل به عنوان ادجوانت و یا تحریک کننده ایمنی کمک زیادی کند. در این مطالعه بیان ژن *P2X7R* درکشت سلولی THP-1 بعد از تیمار با آنتی ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی به مدت چهار ساعت بررسی شد. پیشنهاد می شود در مطالعات آتی به کشت سلول THP-1 بعد از تیمار با آنتی ژن محلول تاکی زوئیت توکسوپلاسماگوندی نیز افزوده شود و علاوه بر بیان ژن *P2X7R*، بار انگلی توکسوپلاسماگوندی نیز بررسی شود.

تایید اخلاقی:

این طرح مورد تایید کمیته بررسی اخلاقی پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران با کد IR.SBMU.RIGLD.REC.1398.035 قرار گرفت. همچنین کلیه مراحل اجرای طرح توسط کمیته بررسی اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس تهران (IR.MODARES.REC.1398.102) بررسی و تایید شد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله برگرفته از پایان نامه خانم پریسا ئیل بیگی در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (MID: 80972) بوده و توسط پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (Grant no.: 1059) حمایت مالی شده است. نویسندگان از همکاری همه کارکنان مرکز تحقیقات بیماری های منتقله از غذا و آب تشکر و قدردانی دارند.

تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

References:

1. Montoya J. Liesenfeld, O1: CAS: 528: Toxoplasmosis. vol. 363. Lancet. 2004:1965-76.
2. Dubey J. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998;28(7):1019-24.
3. Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Act Trop. 2002;81(2):111-22.
4. Bierly AL, Shufesky WJ, Sukhumavasi W, Morelli AE, Denkers EY. Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma* gondii infection. J Immunol. 2008;181(12):8485-91.
5. Schenten D, Medzhitov R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. Adv Immun. 2011;109:87-124.
6. Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. Int Immunol. 2018;30(3):113-9.
7. Corrêa G, da Silva CM, de Abreu Moreira-Souza AC, Vommaro RC, Coutinho-Silva R. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. Microb Infect. 2010;12(6):497-504.
8. Khosroshahi KH, Ghaffarifar F, D'souza S, Sharifi Z, Dalimi A. Evaluation of the immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete SAG1 and ROP2 genes against toxoplasmosis. Vaccine. 2011;29(4):778-83.
9. Chen L, Yao Q, Xu S, Wang H, Qu P. Inhibition of the NLRP3 inflammasome attenuates foam cell formation of THP-1 macrophages by suppressing ox-LDL uptake and promoting cholesterol efflux. Biochem Biophys Res Commun. 2018;495(1):382-7.
10. Shi J, Folwaczny M, Wichelhaus A, Baumert U. Differences in RUNX 2 and P2 RX 7 gene expression between mono-and coculture of human periodontal ligament cells and human osteoblasts under compressive force application. Orthodontic Craniofac Res. 2019;22(3):168-76.
11. Huang T-L, Yang S-H, Chen Y-R, Liao J-Y, Tang Y, Yang K-C. The therapeutic effect of aucubin-supplemented hyaluronic acid on interleukin-1beta-stimulated human articular chondrocytes. Phytomedicine. 2019;53:1-8.
12. Wiley J, Sluyter R, Gu B, Stokes L, Fuller S. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. Tissue Antigen. 2011;78(5):321-32.
13. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. Trend Neurosci. 2009;32(1):19-29.
14. Guan F, Jiang W, Bai Y, Hou X, Jiang C, Zhang C, Jacques ML, Liu W, Lei J. Purinergic P2X7 receptor mediates the elimination of *Trichinella spiralis* by activating NF-κB/NLRP3/IL-1β pathway in macrophages. Infect Immun. 2021 Apr 16;89(5):e00683-20
15. Corrêa G, de Almeida Lindenberg C, de Abreu Moreira-Souza AC, Savio LEB, Takiya CM, Marques-da-Silva C, et al. Inflammatory early events associated to the role of P2X7 receptor in acute

susceptibility to tuberculosis among Iranian patients. Act Microbiol Immunol Hung. 2016;63(1):93-101.
20. Petit-Jentreau L, Tailleux L, Coombes JL. Purinergic signaling: a common path in the macrophage response against Mycobacterium tuberculosis and *Toxoplasma gondii*. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:347.
21. Quan J-H, Huang R, Wang Z, Huang S, Choi I-W, Zhou Y, et al. P2X7 receptor mediates NLRP3-dependent IL-1β secretion and parasite proliferation in *Toxoplasma gondii*-infected human small intestinal epithelial cells. Parasit Vector. 2018;11(1):1-10.
22. O'Brien KB, Schultz-Cherry S, Knoll LJ. Parasite-mediated upregulation of NK cell-derived gamma interferon protects against severe highly pathogenic H5N1 influenza virus infection. J Virol. 2011;85(17):8680-8.

murine toxoplasmosis. Immunobiology. 2017;222(4):676-83.
16. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. Ann Rev Immunol. 2009;27:229-65.
17. Miller CM, Zakrzewski AM, Robinson DP, Fuller SJ, Walker RA, Ikin RJ, et al. Lack of a functioning P2X7 receptor leads to increased susceptibility to toxoplasmic ileitis. PLoS One. 2015;10(6):e0129048.
18. Correa G. Marques da, SC, de Abreu Moreira-Souza, AC, Vommaro, RC, and Coutinho-Silva, R.(2010) Activation of the P2X (7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. Microbes Infect.12:497-504.
19. Shamsi M, Zolfaghari MR, Farnia P. Association of IFN-γ and P2X7 receptor gene polymorphisms in

Original Article

Evaluation the effects of soluble total antigen of *T. gondii* on the expression of *P2X7R* gene

Parisa Ilbeigi[1], Javid Sadraei[2], Fatemeh Ghaffari[2], Seyed Davar Siadat[3], Hamed Mirjalali[4]

Received:2023-06-10 Revised:2023-07-10 Accepted: 2023-07-10

1. Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences,Tarbiat Modares, Tehran, Iran
2. Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Bacteriology Research Department, Tuberculosis and Pulmonary Research Department, Pasteur Institute of Iran
4. Food and Waterborne Diseases Research Center, Digestive and Liver Diseases Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.1, Spring 2023

Pars J Med Sci 2023; 21(1):38-44

Abstract:

Introduction:
Toxoplasma gondii is the causative agent of toxoplasmosis. Macrophages are one of the most important immune cells against toxoplasmosis. Activation of *P2X7R* plays a critical role during immune response through macrophages. This study aimed to evaluate the expression of *P2X7R* gene in THP-1 cell line treated by *T. gondii* soluble total antigen (STAg).

Materials and methods:
STAg was extracted from *T. gondii* tachyzoites strain RH. Upon transforming THP-1 cell line to macrophage M0, the cells were treated by different concentrations of STAg including 100, 80, 40, 20, and 10 µg for 4 h. Total RNA was extracted from cells, cDNA was synthesized, and relative quantitative real-time PCR was performed to evaluate the expression of *P2X7R* gene.

Results:
Results of real-time PCR revealed that except concentrations 10 and 40 µg, the other concentrations of *T. gondii* STAg significantly decreased the expression of *P2X7R* gene. The highest downregulation of P2X7R gene was observed in THP-1 sensed by the concentration 80 µg.

Conclusion:
In addition, there was no statistically correlation between the *P2X7R* gene expression and the concentration of *T. gondii* STAg. This study showed that *T. gondii* STAg may affect the expression of *P2X7R* to help the parasite to escape from immune responses leading by macrophages.

Keywords: *T. gondii*, Soluble Total Antigen, Macrophage THP-1, *P2X7R*

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