

تأثیر ویتامین‌های C و E در بالا بردن سطح نیتریک اکساید و افزایش کشتن تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی توسط ماکروفازها در موش‌های حساس BALB/c

بهناز جلالی‌زادگان^۱، فاطمه غفاری‌فر^۲، سودابه فلاح^۳، طاهر علمی^۴، محمدجواد نمازی^۵، فاطمه وفاشار^۶، فاطمه طباطبائی^{۷*}

۱. کارشناس ارشد انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲. استاد انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استاد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴. دانشجوی دکتری انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۵. استادیار میکروبیولوژی، ایمونولوژی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۶. استادیار ایمونولوژی، مرکز بهداشت ارومیه، معاونت بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی، ایران
۷. دانشیار انگل‌شناسی،

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱

زمینه توکسوپلازما گوندی یک انگل داخل سلولی اجباری و عامل عفونت توکسوپلاسموزیس و دارای دو فرم غیرمهاجم برادی زوئیت و مهاجم تاکی زوئیت است. این تحقیق برای اولین بار تأثیر تجویز ویتامین‌های C و E در بالا بردن سطح سرمی نیتریک اکساید و نقش فزاینده آن در کشتن تاکی زوئیت‌های مهاجم انگل در موش‌های حساس BALB/c را بررسی کرد.

روش کار در این تحقیق، ۱۴ گروه پنج‌تایی (۷۰ سر) موش BALB/c به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل و مورد تقسیم شدند. تعداد ۸ گروه کنترل تعیین شدند: یک گروه کنترل منفی که هیچ ویتامین یا انگلی دریافت نکردند؛ سه گروه شامل دریافت فقط ویتامین C یا E و یا هر دو ویتامین بودند؛ دو گروه کنترل مثبت که با دو دوز مختلف 5×10^4 یا 10^4 انگل آلوده شدند؛ دو گروه دیگر یکی سالیین و دیگری متانول دریافت کردند. گروه‌های مورد شامل شش گروه بودند: سه گروه دریافت‌کننده $10^4 \times 5$ انگل و سه گروه دیگر دریافت‌کننده 10^4 انگل بودند. به هر کدام از موش‌های این گروه‌ها، هریک از ویتامین‌ها به‌تنهایی یا همراه باهم تجویز شد. ویتامین E به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر یک‌روز درمیان یا ویتامین C به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر روزانه به‌صورت داخل صفاقی به مدت ۵ روز تجویز شد. همین رژیم برای موش‌هایی که هر دو ویتامین را دریافت کردند، اجرا شد. در روز ششم موش‌ها با تاکی زوئیت‌های انگل به‌صورت داخل صفاقی عفونی شدند. سه روز بعد از تلقیح عفونت، نمونه‌گیری انجام شد. سرم‌ها در 20°C تا زمان انجام تست‌ها ذخیره شدند. پس از جداسازی ماکروفازهای صفاقی موش‌ها، تاکی زوئیت‌ها شمارش شدند و سنجش نیتریک اکساید نیز صورت گرفت.

یافته‌ها تزریق ویتامین‌ها باعث کاهش معنادار تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما در گروه‌های آزمون در مقایسه با گروه‌های کنترل شده بود. همچنین اختلاف افزایش تولید نیتریک اکساید در موش‌های درمان‌شده با ویتامین‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود.

نتیجه‌گیری مصرف ویتامین‌های ذکرشده با افزایش تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفازهای فعال‌شده باعث افزایش کشته شدن انگل‌های داخل ماکروفاز شد که به‌عنوان مکمل درمانی توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

توکسوپلازما گوندی، ویتامین C، ویتامین E، نیتریک اکساید.

* نویسنده مسئول: فاطمه طباطبائی

نشانی: گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

دورنگار: ۰۲۱۸۸۶۰۲۲۱۷

تلفن: ۰۲۱۸۶۷۰۳۲۲۰

رایانه: Tabatabaei.f@iums.ac.ir, Tabatabaie59@gmail.com

شناسه ORCID: 0000-0001-9189-4190

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-1559-7220

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۶، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۸، ص ۵۱۴-۵۲۵

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

۱. مقدمه

افسردگی تمایل داشتند [۸]. در نظریه بندورا، مفهوم خودکارآمدی^۴ اشاره به باور فرد از توانایی خود برای انجام دادن رفتاری خاص دارد [۹]. خودکارآمدی پایین با احتمال شکست در درمان و بازگشت به شیوه‌های ناصحیح تغذیه‌ای قبلی رابطه مثبت دارد. خودکارآمدی عامل مهمی است که باید در برنامه‌های آموزش و مشاوره‌های تغذیه‌ای کاهش وزن مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا فقط اطلاع‌رسانی درباره رفتار سالم کافی نیست [۹].

گمانه‌زنی‌هایی در مورد عوامل بروز و تداوم اختلال‌های خوردن صورت گرفته است. هرکدام از اشکال اختلال خوردن در نتیجه تعامل پیچیده عوامل زیستی، اجتماعی، فرهنگی و روان‌شناختی ایجاد می‌شود. درمان اختلالات تغذیه‌ای و خوردن در کاهش بیماری‌های جسمی مانند بیماری‌های قلبی - عروقی و مسائل روان‌شناختی همچون افسردگی و اضطراب و بالا بردن اعتماد به نفس و کیفیت زندگی مبتلایان مؤثر است. امروزه بیش از پیش احساس نیاز به مداخلات روان‌شناختی برای افراد دچار اختلال خوردن افزایش می‌یابد. درمان‌های قبلی تأیید شده برای اختلالات خوردن عبارت‌اند از: درمان شناختی - رفتاری، روان‌درمانی بین‌فردی، رفتاردرمانی دیالکتیکی و کاهش رفتاری وزن. این رویکردهای درمانی از روش‌هایی برای تغییر دادن الگوهای رفتاری مربوطه، شناخت‌ها و حالت‌های هیجانی استفاده می‌کنند [۱۰].

از سوی دیگر اخیراً روان‌شناسان به مفهوم‌سازی‌های جایگزین برای معرفی نگرش و ارتباط سالم با خود پرداخته‌اند. یکی از این مؤلفه‌ها، مفهوم شفقت به خود^۵ است. اگرچه در روان‌شناسی غربی مفهوم جدیدی است، قرن‌هاست که ریشه در فلسفه شرقی دارد [۱۱]. شفقت به خود به عنوان سازه‌ای سه‌مؤلفه‌ای شامل مهربانی به خود در مقابل قضاوت کردن خود، اشتراکات انسانی در برابر انزوا و هشیاری در مقابل همانندسازی افراطی تعریف شده است. ترکیب این سه مؤلفه مرتبط به هم، مشخصه فردی است که به خود شفقت دارد [۱۱]. در تحقیقاتی که در حوزه شفقت انجام شده است، گیلبرت به استفاده از این سازه در فضای جلسات درمان دست یازید و در نهایت روش درمان مبتنی بر شفقت را مطرح کرد. درمان مبتنی بر شفقت شیوه‌ای التقاطی است که از روان‌شناسی اجتماعی، تحولی، تکاملی، بودیستی و نوروساینس و همچنین از دیگر الگوهای درمانی با مداخله مؤثر در انواع مشکلات مربوط به سلامت روانی برآمده است [۱۲-۱۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که افراد با شفقت به خود در مقایسه با افراد فاقد شفقت به خود، از سلامت روانی بهتری برخوردارند؛ برای نمونه شفقت به خود در افراد

اختلالات تغذیه و خوردن^۱ با اختلالات پایدار در خوردن یا رفتارهای مربوط به خوردن مشخص می‌گردد که منجر به تغییر در مصرف یا جذب غذا و آسیب فراوان به سلامت جسمی و عملکرد روانی - اجتماعی می‌شود. این اختلالات مشکلات مهمی هستند که عموماً در میان نوجوانان و زنان بزرگسال جوان شایع است. این شرایط چه بسا مزمن و عودکننده، و اغلب مرتبط با اختلالات روان‌پزشکی همبود و وضعیت‌های پزشکی باشد. اختلالات خوردن که به عنوان سندروم‌های روان‌شناختی مرتبط با چاقی هم شناخته می‌شوند، طیف وسیعی از محدودیت و رژیم گرفتن بیش از اندازه تا سندروم کامل اختلالات خوردن را دربرمی‌گیرد [۱].

اختلالات خوردن اغلب گزارش نمی‌شوند و ممکن است زندگی افراد مبتلا را در معرض خطر قرار دهند. این اختلالات امروزه خطر مهمی برای سلامت جسمی و روانی دختران به‌شمار می‌آیند و تحقیقات انجام‌شده در سراسر جهان نیز تأیید می‌کنند که شمار نسبتاً زیادی از دختران با مشکلات خوردن مواجه‌اند [۲-۳]. در ایران در جامع‌ترین مطالعه صورت‌گرفته، مشخص شد که ۱۶/۲۴٪ از دانشجویان مورد بررسی در معرض ابتلا به اختلالات خوردن هستند [۴]. پژوهش‌های مختلف نشان داد که بیشتر دانشجویان تصویر منفی از بدن خود دارند و زنان بیشتر از مردان از تصویر بدنی منفی رنج می‌برند و بیشتر دچار بی‌اشتهایی روانی و اختلال خوردن می‌شوند [۵]. دختران در بیشتر موارد توجه خاصی به وزن و شکل بدن خود دارند و اغلب در تلاش برای مواجهه با فشارهای مرتبط با تغییرات دوره‌های بحرانی، نگرش‌های نادرستی به خوردن اتخاذ می‌کنند و این مواجهه ممکن است منجر به مشکلات رفتاری خوردن شود.

افرادی که از اختلال خوردن رنج می‌برند، شاهد آثار وخیم آن در زندگی خود هستند. این دسته از اختلالات عوارض تغذیه‌ای و روانی متعددی دارند؛ مثلاً افراد مبتلا به پراشتهایی یا بی‌اشتهایی عصبی مشکلاتی در جنبه‌های روان‌شناختی مانند افسردگی، اضطراب و استرس را تجربه می‌کنند [۷]. پژوهش‌های متنوع در زمینه اختلالات خوردن نشان داد که چرخش‌های مکرر و کوتاه اختلال خوردن از نوع محدودکننده^۲ ممکن است منجر به بی‌اشتهایی عصبی^۳ در بیماران شود [۷]. شایان ذکر است کسانی که نمره‌های بالاتری در اقدامات مربوط به خوردن گزارش داده بودند، به خودباوری پایین‌تر همراه با محدودیت در رژیم غذایی، نارضایتی از بدن، بدانگاری به چاقی بدن، اضطراب و نشانه‌های

4. self-efficacy

5. self-compassion

1. eating disorders

2. restricted

3. anorexia nervosa

دانشگاه با کد ۹۴-۰۳-۳۰-۹۴۲۶۵۶۱-IR-IUMS.REC.3026561-03-1394 توسط کمیته اخلاق شماره ۴ دانشگاه به تصویب رسید.

۲.۲. آلوده کردن موش‌ها به توکسوپلازما گوندی و تزریق ویتامین‌ها پس از آماده‌سازی ویتامین‌ها و تکثیر انگل

مطالعه حاضر بر روی ۷۰ سر موش BALB/c ماده بالغ inbred خریداری شده از انستیتو پاستور ایران (وزن 20 ± 2 گرم) که از نظر سنی در وضعیت مشابهی قرار داشتند، انجام شد. موش‌ها در حیوان‌خانه در قفس‌های پنج‌تایی و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲.۲.۳. آماده‌سازی ویتامین‌ها

ابتدا ویتامین C به مقدار ۵۰۰ mg با حجم ۵ ml با ۲ ml نرمال سالین مخلوط و محلول استوک تهیه شد. سپس از این محلول حجم ۲۰۰ میکرولیتر به مدت ۵ روز روزانه جهت تزریق داخل صفاقی به موش‌ها استفاده شد. هر میلی‌لیتر از ویال ویتامین C حاوی ۱۰۰ mg یا $100000 \mu\text{g}$ از این ماده بود. همچنین از روز اول تا پنجم به گروه دریافت‌کننده ویتامین E به صورت یک‌روز در میان میزان ۱۰۰ میکرولیتر ویتامین E (یک ویال ویتامین E حاوی 1 mg/d ($1 \text{ dl} = 1000 \mu\text{g}$) ویتامین E است) تزریق داخل صفاقی انجام شد. جهت استفاده 1 mg/dl از این ویتامین در موش، با ۲ cc متانول ۹۵٪ جهت حل شدن، مخلوط گردید و محلول استوک تهیه شد.

۲.۲.۴. آماده‌سازی انگل

جهت آماده‌سازی انگل، ابتدا سویه RH توکسوپلازما گوندی تکثیر شد. سوس استاندارد در شرایط انجماد و در مخزن ازت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بخش انگل‌شناسی نگهداری می‌شد. سپس به موش BALB/c پاساژ داده شد. جهت کشت انگل از محیط کشت RPMI 1640 بیکرینات سدیم، ال گلوتامین استفاده شد. مواد لازم جهت تهیه محیط کشت و سرم جنین گاوی از شرکت Gib Co فراهم آمد. بدین منظور ابتدا مایع صفاقی موش‌های آلوده به سویه که سه روز قبل از راه داخل صفاقی به این سویه آلوده شده بودند و حاوی تعداد زیادی تاکی زوئیت داخل و خارج سلولی بودند، با سرنگ استریل کشیده شد و با تأیید وجود حدود ۲۰ تا ۲۵ عدد تاکی زوئیت در میدان لام و نبود آلودگی میکروبی از تاکی زوئیت‌های موجود در داخل صفاق موش پس از دو بار در دور 2000 g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و شست‌وشو

با افسردگی و اضطراب کم، بیشتر دیده می‌شود. شفقت به خود با توانایی‌های روان‌شناختی مثبت، از قبیل شادی، خوش‌بینی، خرد، کنجکاوی و کاوش و هوش هیجانی، ارتباط دارد [۱۴].

پژوهش‌های نسبتاً نادری در مورد کاربرد درمان متمرکز بر شفقت در اختلالات خوردن انجام شده است؛ ولی همین تحقیقات مختصر نیز نشان از اثربخشی این درمان بر این افراد داشته‌اند؛ به طوری که شفقت به خود به صورت کلی پاتولوژی‌های مرتبط با اختلال خوردن مانند نگرانی‌ها در مورد وزن و نگرانی از غذا خوردن را کاهش می‌دهد و باعث بهبود وضعیت روان‌شناختی افراد دارای اختلال خوردن در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. برای نمونه هافمن و همکاران [۱۵] در پژوهشی نشان دادند که توسعه شفقت به خود به کاهش طیف وسیعی از مشکلات روان‌شناختی افراد دارای اختلالات خوردن از جمله افسردگی، اضطراب و استرس کمک شایان توجهی کرده است. در کل بر پایه یافته‌های پژوهشی، افراد دچار اختلالات خوردن که سطح پیشرفته‌ای از شفقت به خود را دریافت کرده‌اند، در مقابل کسانی که سطح پایین‌تری از شفقت به خود را کسب کرده‌اند، زودتر بهبود می‌یابند و از تصویر بدنی مثبت‌تری در مقایسه با گروه کنترل برخوردارند [۱۶].

نتایج چنین تحقیقات مبتنی بر شواهد، کاربرد درمان متمرکز بر شفقت را در مورد اختلالات خوردن هرچه بیشتر موجه می‌کند. از آنجا که درمان مبتنی بر شفقت ممکن است نقش حفاظتی در برابر تصویر بدن و رفتارهای غذا خوردن ایفا کند، این درمان می‌تواند با توسعه شفقت به خود و کاهش خودانتقادگری بر افسردگی، اضطراب و استرس، سرکوب افکار و عواطف منفی و خودکارآمدی تأثیر بگذارد و باعث کاهش نشانه‌های اختلال خوردن در بیماران سرپایی دارای اختلال خوردن با طیف محدودکننده شود. با توجه به اثرات منفی روان‌شناختی اختلالات خوردن بر مبتلایان و اهمیت تغییر سبک زندگی و سبک مقابله‌ای این بیماران بر اساس مداخلات روان‌شناختی و با توجه به اینکه در داخل کشور تاکنون پژوهشی در زمینه اثربخشی درمان متمرکز بر شفقت بر بیماران مبتلا به اختلالات خوردن انجام نشده است، هدف اساسی پژوهش حاضر تعیین اثربخشی درمان متمرکز بر شفقت بر نشانگان افسردگی، اضطراب، استرس و نیز خودکارآمدی وزن در میان دانشجویان دختر دارای اختلال خوردن با طیف محدودکننده بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. ملاحظات اخلاقی

تمام اصول اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی، از قبیل نگهداری، تغذیه و تطابق فضای زندگی، به صورت کامل و دقیق در این مطالعه رعایت شد. این مطالعه مورد تصویب شورای پژوهشی

از آنجا که نیتریک اکساید بسیار ناپایدار است و نیمه عمر بسیار کوتاهی دارد، بین ۶ تا ۱۰ ثانیه و به سرعت در حضور اکسیژن به NO₂ تبدیل می‌شود و اندازه‌گیری مستقیم آن نسبتاً مشکل است، بنابراین اندازه‌گیری آن با استفاده از متابولیت‌های پایدارش، یعنی نیتريت و نیترات، با روش رنگ‌سنجی برمبنای واکنش گریس صورت می‌گیرد. اساس این واکنش تشکیل رنگ از دی‌آزوتاسیون^۱ یک سولفانامید به کمک نیتريت در محیط اسیدی و سپس کنژوگاسیون آن با یک آمین آروماتیک مثل NEDD^۲ است [۲۵-۲۶]. از هر یک از نمونه‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت ۹۶ خانه‌ای تخت ریخته شد و بر روی هر یک از آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس اضافه شد. پس از افزودن معرف گریس به نمونه‌ها، براساس میزان نیتریک اکساید موجود در آن‌ها، طیفی از رنگ‌های ارغوانی با شدت‌های مختلف ایجاد شد. بعد از ۱۰ دقیقه آنکوباسیون در دمای اتاق با دستگاه الایزا با طول موج ۵۵۰ نانومتر و فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر جذب نمونه‌ها قرائت شد. به منظور تهیه منحنی استاندارد نیتريت سدیم با وزن مولکولی ۶۹ (g/mol) استفاده شد. با ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از خط رگرسیون، غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ها با استفاده از جذب آن‌ها محاسبه شد. نتایجی که نشان‌دهنده مقدار تولید نیتریک اکساید است، به صورت میکرومولار بیان شد.

۲.۸. روش سنجش ویتامین E

جهت سنجش میزان ویتامین E از کیت شرکت ZellBio (Germany) که روش ساده و تکرارپذیر است، با حساسیت ۰.۳ μg/ml استفاده شد که کیت استاندارد برای ارزیابی ویتامین E در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سرم و پلاسما است. اساس آن کالریتری (رنگ‌سنجی در طول موج ۵۳۶ nm) با روش الایزا است. سپس برای تک‌تک نمونه‌های استاندارد با غلظت‌های متفاوت منحنی استاندارد با استفاده از خط رگرسیون ترسیم شد [۲۷].

۲.۹. روش سنجش ویتامین C

سنجش این ویتامین با کیت ویتامین C محصول شرکت ZellBio با روش رنگ‌سنجی (الایزا) در ۵۲۰ nm با حساسیت ۰.۳ μg/ml در نمونه‌های بیولوژیکی انجام شد. با ترسیم منحنی استاندارد و با استفاده از خط رگرسیون، غلظت ویتامین C موجود در نمونه‌ها با استفاده از جذب آن‌ها محاسبه شد [۲۷-۲۸].

۲.۱۰. روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه میانگین تعداد انگل‌ها در ماکروفاژها، برای هر گروه،

دادن به مقدار تقریبی ۱۰^۴ و ۵ × ۱۰^۴ تاکی زوئیت به داخل محوطه صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی تلقیح شد. در روز ششم جهت تزریق برای گروه ۱۰^۴ مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از انگل به حجم ۲۵ میلی‌لیتر به وسیله سرم فیزیولوژی تزریقی و برای گروه ۵ × ۱۰^۴ مقدار ۲۲۵۰ میکرولیتر انگل به حجم ۲۲.۵ میلی‌لیتر رسانده شد.

۲.۵. گروه‌بندی موش‌ها

موش‌ها به ۱۴ گروه پنج‌تایی تقسیم شدند: گروه I کنترل منفی (غیرآلوده و بدون درمان)؛ گروه II کنترل مثبت اول (دریافت‌کننده ۱۰^۴ × ۵ انگل بدون دریافت ویتامین)؛ گروه III کنترل مثبت دوم (دریافت‌کننده ۱۰^۴ انگل بدون دریافت ویتامین)؛ گروه IV تا VI گروه‌های کنترل دارو شامل موش‌های غیرآلوده دریافت‌کننده ویتامین C (گروه IV)، ویتامین E (گروه V) و ویتامین C و E هم‌زمان بودند (گروه VI). دو گروه هم‌به‌تنهایی سالیین (گروه VII) و متانول ۹۵٪ (گروه VIII) دریافت کردند. گروه‌های آزمون اول شامل موش‌های آلوده با ۱۰^۴ × ۵ انگل، دریافت‌کننده ویتامین C (گروه IX)، ویتامین E (گروه X) و ویتامین C + E (گروه XI) بود و گروه‌های آزمون دوم شامل موش‌های آلوده با ۱۰^۴ انگل، دریافت‌کننده ویتامین C (گروه XII)، ویتامین E (گروه XIII) و ویتامین C و E هم‌زمان (گروه XIV) بودند [۲، ۴، ۲۴].

۲.۶. روش کار

بلافاصله پس از ۷۲ ساعت، خون‌گیری از گوشه چشم انجام شد؛ بعد از کشتن موش‌ها، به آن‌ها ۲cc نرمال سالیین بسیار سرد تزریق شد؛ پس از ضربه زدن به ناحیه صفاقی موش، بلافاصله همان مقدار ۲cc از صفاق موش جدا گردید و مایع صفاقی جداسازی شد. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد. این مرحله ۲ بار تکرار شد. سپس ماکروفاژهای ته لوله با FBS و RPMI-1640 به یک نسبت مخلوط و درون پلیت کشت سلولی ریخته شد و پس از بستن در پلیت در گرم‌خانه CO₂ دار ۵٪ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. پس از جمع‌آوری مایع رویی پلیت‌ها، آن‌ها برای بررسی NO در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. خون جمع‌آوری‌شده از موش‌ها نیز ۲ بار در دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم جداسازی‌شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از سرم جداسازی‌شده برای سنجش ویتامین‌ها استفاده گردید.

۲.۷. سنجش نیتریک اکساید

2. N-1-[naphthyl] ethylenediamine

1. diazotization

در گروه دریافت‌کننده انگل به‌تنهایی با غلظت $0.00 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ مشاهده شد که این اختلاف از لحاظ آماری معنادار بود ($p < 0.05$). همچنین بررسی نتایج نشان داد در گروه دریافت‌کننده ویتامین E نیز بیشترین غلظت در گروه کنترل دارو (دریافت‌کننده ویتامین E به‌تنهایی) با غلظت $0.3 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ و کمترین مقدار در گروه دریافت‌کننده انگل (5×10^4 انگل) با غلظت $0.3 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$ وجود داشت. اختلاف میزان ویتامین E در گروه مورد آزمون نسبت به گروه کنترل معنادار ($p < 0.05$) بود.

۳.۲. غلظت NO در گروه‌های کنترل و درمان

بررسی میزان NO در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد اختلاف معناداری بین میزان NO در گروه کنترل نسبت به گروه آزمون وجود دارد ($p < 0.05$). بیشترین میزان NO در گروه آلوده با دوز 10^4 تاکی زوئیت توکسوپلاسما دیده شد که با ویتامین‌های C و E درمان شدند. کمترین میزان NO در گروه کنترل منفی گزارش شد ($p < 0.05$) (جدول و شکل ۱). غلظت NO در تمام گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۱. غلظت NO در گروه‌های مختلف کنترل و آزمون

p value	NO [Mean \pm SD]	گروه‌ها
	12.5 ± 2.3	کنترل منفی
	44.1 ± 3.6	۱. دریافت 10^4 انگل
	34.1 ± 2.6	۲. دریافت $10^4 \times 5$ انگل
($p < 0.05$)	22.5 ± 3.1	دریافت ویتامین C
	20.2 ± 2.7	دریافت ویتامین E
	24.2 ± 2.1	دریافت ویتامین C + E
($p < 0.05$)	87.1 ± 2.3	۱. دریافت 10^4 انگل + ویتامین C
	175 ± 12.7	۲. دریافت 10^4 انگل + ویتامین E
	256.4 ± 17.6	۳. دریافت 10^4 انگل + ویتامین C و E
	57.6 ± 2.0	۴. دریافت $10^4 \times 5$ انگل + ویتامین C
	101.5 ± 3.4	۵. دریافت $10^4 \times 5$ انگل + ویتامین E
	112 ± 12.6	۶. دریافت $10^4 \times 5$ انگل + ویتامین C و E

بیشترین میزان NO در گروه آزمون که دریافت‌کننده 10^4 انگل + ویتامین C و E بودند، مشاهده شد و کمترین میزان در گروه کنترل منفی بود که نه با انگل آلوده شده و نه ویتامین دریافت کرده بود.

انگل‌های موجود در 100 ماکروفاژ پس از فیکس کردن و سپس رنگ‌آمیزی با گیمسا، شمارش شد و برای مقایسه میانگین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه آزمون پارامتری آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌کار رفت. اما در مورد مقایسه میانگین‌های مقادیر نیتريت تولیدشده از آزمون غیرپارامتری Anova one way از برنامه نرم‌افزاری SPSS (نسخه ۲۲) استفاده شد.

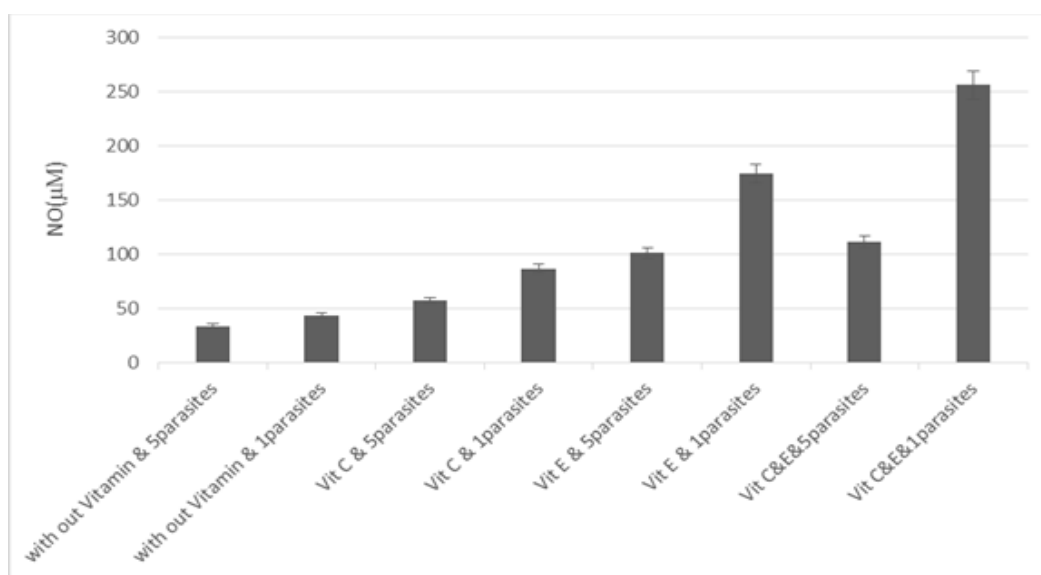
۲.۱۱. محدودیت‌های اجرایی طرح

این محدودیت‌ها شامل تأمین به‌موقع بودجه جهت خرید کیت‌ها و زمان رسیدن کیت به‌دست محقق، عدم آلودگی کشت انگل و کشت ماکروفاژها، مرگ‌ومیر موش‌ها حین آزمایش و کم بودن حجم نمونه‌ها، لیز یا لیپمیک و ایکتریک بودن آن‌ها بود.

۳. یافته‌ها

۳.۱. غلظت ویتامین‌های C و E در گروه‌های کنترل و درمان

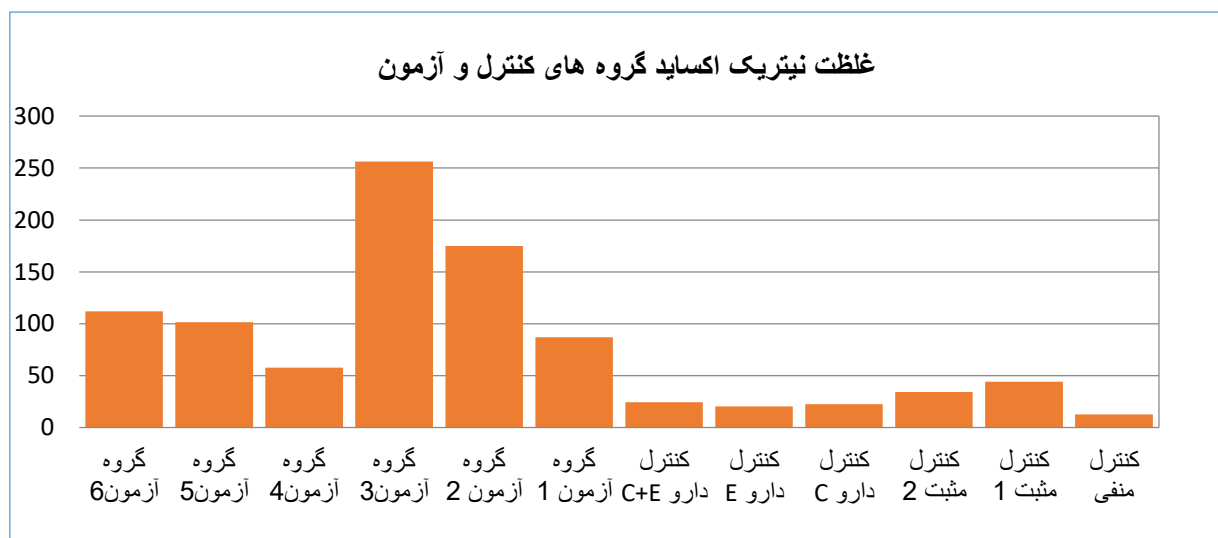
بیشترین غلظت ویتامین C در گروه کنترل دریافت‌کننده ویتامین C به‌تنهایی با غلظت $0.2 \pm 0.46 \mu\text{g/ml}$ و کمترین مقدار ویتامین C



شکل ۱. مقایسه غلظت NO برحسب µM در بین گروه‌های دریافت‌کننده انگل

گروه‌ها به این شرح‌اند:

۱. without Vitamin & 5parasites: گروهی که هیچ‌گونه ویتامینی دریافت نکرده و $10^4 \times 5$ انگل را به‌صورت تزریقی گرفته است.
 ۲. without Vitamin & 1parasites: گروهی که هیچ‌گونه ویتامینی دریافت نکرده و 10^4 انگل را به‌صورت تزریقی گرفته است.
 ۳. vitC & 5parasites: گروه دریافت‌کننده ویتامین C که $10^4 \times 5$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
 ۴. vitC & 1parasites: گروه دریافت‌کننده ویتامین C که 10^4 انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
 ۵. vitE & 5parasites: گروه دریافت‌کننده ویتامین E که $10^4 \times 5$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
 ۶. vitE & 1parasites: گروه دریافت‌کننده ویتامین E که 10^4 انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
 ۷. vitC and E & 5parasites: گروه دریافت‌کننده ویتامین C + E که $10^4 \times 5$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
- گروه دریافت‌کننده ویتامین vitC and E& 1parasites که 10^4 انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است ($p < 0.01$).



شکل ۲. مقایسه غلظت NO برحسب µM در بین گروه‌های دریافت‌کننده کنترل و آزمون

۱. کنترل منفی بدون عفونت و بدون دریافت ویتامین؛

گروه‌ها به این شرح‌اند:

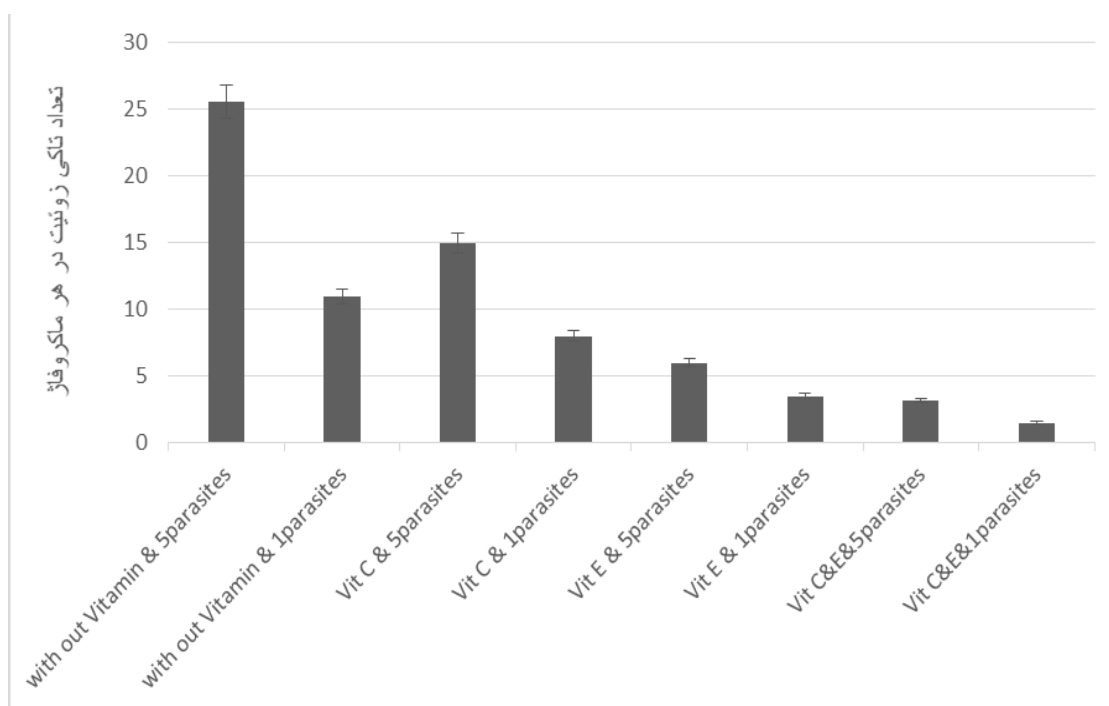
نتایج مربوط به شمارش تاکی زوئیت‌ها در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد اختلاف میانگین غلظت تاکی زوئیت‌ها در بین گروه‌های مورد مطالعه در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار است. بیشترین میزان انگل در گروه دریافت‌کننده ۱۰۴ × ۵، انگل بدون دریافت ویتامین مشاهده شد (۰.۲ ± ۰.۶). همچنین نتایج نشان داد در گروه دریافت‌کننده ۱۰۴ انگل توأم با ویتامین C و E، نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده انگل با ویتامین E و گروه‌های دریافت‌کننده انگل با ویتامین C، تعداد زوئیت‌ها کاهش معناداری را از لحاظ آماری نشان می‌دهند (p < 0.01) (جدول ۲ و شکل ۳).

۲. کنترل مثبت ۱ دریافت‌کننده ۱۰۴ انگل؛
 ۳. کنترل مثبت ۲ دریافت‌کننده ۱۰۴ × ۵ انگل؛
 ۴. گروه دریافت‌کننده ویتامین C؛
 ۵. گروه دریافت‌کننده ویتامین E؛
 ۶. گروه دریافت‌کننده ویتامین‌های C و E؛
 ۷. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین C؛
 ۸. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین E؛
 ۹. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین C و E؛
 ۱۰. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ × ۵ انگل + ویتامین C؛
 ۱۱. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ × ۵ انگل + ویتامین E؛
- گروه آزمون دریافت ۱۰۴ × ۵ انگل + ویتامین C و E

۳.۲. شمارش تاکی زوئیت‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

جدول ۲. شمارش تاکی زوئیت‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده انگل در گروه‌های کنترل و آزمون دریافت‌کننده ویتامین‌های C و E

p value	تعداد تاکی زوئیت [Mean ± SD]	گروه‌ها
	۱۱ ± ۰.۴	۱. دریافت ۱۰۴ انگل
	۲۵.۶ ± ۰.۲	۲. دریافت ۱۰۴ × ۵ انگل
p < 0.01	۸ ± ۰.۳	۱. دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین C
	۳.۵ ± ۰.۱	۲. دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین E
	۱.۵ ± ۰.۱	۳. دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین C و E
	۱۵ ± ۰.۱	۴. دریافت ۱۰۴ × ۵ انگل + ویتامین C
	۶ ± ۰.۱	۵. دریافت ۱۰۴ × ۵ انگل + ویتامین E
	۳.۲ ± ۰.۵	۶. دریافت ۱۰۴ × ۵ انگل + ویتامین C و E



شکل ۳. مقایسه شمارش تاکی زوئیت‌ها در بین گروه‌های دریافت‌کننده انگل

گروه‌های نشان‌داده‌شده در شکل عبارت‌اند از:

۱. Without Vitamin & 5parasites: گروهی که هیچ گونه ویتامینی دریافت نکرده و 5×10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است.
۲. no Vitamin & 1parasites: گروهی که هیچ گونه ویتامینی دریافت نکرده و 10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است.
۳. vitC & 5parasites: گروه دریافت کننده ویتامین C که 5×10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است.
۴. vitC & 1parasites: گروه دریافت کننده ویتامین C که 10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است.
۵. vitE & 5parasites: گروه دریافت کننده ویتامین E که 5×10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است.
۶. vitE & 1parasites: گروه دریافت کننده ویتامین E که 10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است.
۷. vitC and E & 5parasites: گروه دریافت کننده ویتامین C + E که 5×10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است.
۸. vitC and E & 1parasites: گروه دریافت کننده ویتامین C + E که 10^4 انگل را به صورت تزریقی دریافت کرده است ($p < 0.01$).

۴. بحث و نتیجه گیری

گیلمو و همکاران [۳۲] در سال ۲۰۰۴ در آمریکا و ویو و همکاران [۳۳] در سال ۲۰۰۲ در آمریکا در مطالعات خود بیان کردند که انگل درون ماکروفاژها جهت زنده ماندن، تولید نیتریک اکساید و دیگر واسطه‌های ایمنی را مهار کرده، میزان آن‌ها را کاهش می‌دهد. مطالعه ما نیز همانند مطالعات فوق نشان داد که توکسوپلازما گوندی به‌تنهایی سبب کاهش تولید نیتریک اکساید ماکروفاژها می‌شود؛ ولی تزریق هم‌زمان ویتامین‌های C و E سبب افزایش نیتریک اکساید درون ماکروفاژها می‌شود که این اختلاف از لحاظ آماری معنادار بود. مطالعات گناردی و همکاران [۳۴] در اروپا نیز نشان داد که تیمار با ویتامین E سبب افزایش تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژها و افزایش بقای آن‌ها شد. در مطالعات اولیورا و همکاران [۳۵] در برزیل مشخص شد که مواد آنتی‌اکسیدان دارای خاصیت آنتی‌توکسوپلازما هستند. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده خواص ضدتوکسوپلازمایی ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدان است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ یانگ و همکاران [۳۶] در کره جنوبی با هدف بررسی اثرات بالقوه استفاده از ویتامین C و E به‌عنوان آنتی‌اکسیدان بر روی مدل موشی انجام دادند، مشخص گردید ویتامین C سبب افزایش تولید IL-12 می‌شود. IL-12 یکی از مؤلفه‌های اصلی پاسخ ایمنی Th1 در دفاع از پاتوژن‌های داخل سلولی است که از طریق افزایش IFN γ تأثیر ضد عفونی خود را می‌گذارد. افزایش IFN γ باعث فزونی گرفتن فعالیت میکروب‌کشی ماکروفاژها می‌شود؛ لذا کاهش میزان تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی در مطالعه حاضر در گروه دریافت کننده ویتامین C را می‌توان با مطالب ذکر شده توجیه کرد. این اختلاف میانگین بین گروه کنترل و آزمون از لحاظ آماری معنادار بود [۳۶-۳۷]. به‌طور کلی نتایج مطالعه پیش رو نشان‌دهنده نقش ویتامین‌های C و E در کنترل عفونت‌های درون سلولی با فعال کردن برخی واسطه‌های ایمنی است؛ لذا تحقیقات بیشتر در این زمینه بر روی سایر میکروارگانیزم‌ها و ویتامین‌ها و یا حتی سایر

توکسوپلازما گوندی از میکروارگانیزم‌های درون سلولی است که توسط سیستم ایمنی بدن کنترل می‌شود و در افراد دارای نقص سیستم ایمنی می‌تواند گشوده باشد؛ در نتیجه بازگشت بیماری به میزان فعالیت سیستم ایمنی بستگی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از روش‌های درمانی مکمل که در آن‌ها سیستم ایمنی بدن تقویت می‌شود، در کنترل این بیماری اثر دارد [۲۹-۳۰]. از جمله راه‌هایی که باعث افزایش فعالیت‌های سیستم ایمنی می‌شود و در سال‌های اخیر محققان زیادی درباره‌ی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ایمنی‌زایی آن‌ها مطالعه کرده‌اند، تجویز ویتامین E و C است. براساس مطالعات مختلف، مصرف ویتامین‌های C و E علاوه بر افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی بدن، سبب افزایش قدرت سیستم ایمنی از طریق افزایش تولید و فعالیت ماکروفاژها، سیتوکین‌ها و سایر عوامل مربوط به سیستم ایمنی می‌شوند. مجموعه این اتفاقات سبب افزایش قدرت دفاعی بدن در برابر عوامل بیماری‌زا از جمله انگل‌ها می‌شود. نتایج این مطالعه نیز اثبات کرد که تزریق ویتامین‌های C و E سبب افزایش میزان نیتریک اکساید در ماکروفاژها می‌شود. آزمون‌های آماری نیز اختلاف معنادار کاهش تاکی زوئیت‌های انگل در سلول‌های آلوده را تأیید کردند. از آنجایی که NO یکی از فاکتورهای میکروب‌کشی ماکروفاژ است، می‌توان گفت مصرف این دو ویتامین در افزایش کارایی سیستم ایمنی در مقابل انگل توکسوپلازما مؤثر بوده است. نتایج بررسی کورتز و همکاران [۳۱] در سال ۲۰۱۷ در اسپانیا نشان داد ویتامین D اثر ایمونومدلیتوری بر سیستم ایمنی دارد. در این مطالعه، آن‌ها تأثیر دوزهای مختلف این ویتامین را توأم با اینترفرون گاما یا بدون آن بر انهدام داخل ماکروفاژی انگل لیشرمانیا^۱ در شرایط *in vivo* بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که ویتامین D در انهدام داخل سلولی انگل لیشرمانیا تأثیر گذار است که اثرات مشابهی با ویتامین‌های C و E استفاده‌شده در مطالعه حاضر دارد.

نیتریک اکساید در ماکروفاژهای فعال شده می‌شود که آن نیز از مکانیسم‌های دفاعی بدن علیه این انگل است. از طرفی میزان تاکی زوئیت‌های باقی‌مانده انگل در گروه‌های درمان شده با ویتامین‌های C و E به میزان معناداری نسبت به گروه‌های کنترل آلوده شده با انگل کمتر بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی ایران برای تأمین اعتبارات لازم جهت انجام این پروژه و از دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای انجام آزمایش‌های تخصصی مورد نیاز تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- [1]. Dong H, Su R, Lu Y, Wang M, Liu J, Jian F, Yang Y. Prevalence, Risk Factors, and Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Food Animals and Humans [2000-2017] From China. *Front Microbiol* 2018; 9: 2108.
- [2]. Ebrahimzadeh A, Bamedi T, Etemadi S, Shahrakipour M, Saryazdipour Kh. Toxoplasmosis as a complication of transfusion in hemodialysis patients. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2014; 4(1):22-25. (Persian)
- [3]. Chaudhry SA, Gad N, Koren G. Toxoplasmosis and pregnancy. *Can Fam Physician* 2014; 60(4): 334-36.
- [4]. Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep* 2016; 6: 22551.
- [5]. Razzak AH, Wais SA, Saeid AY. Toxoplasmosis: the innocent suspect of pregnancy wastage in Duhok, Iraq. *East Mediterr Health J* 2005; 11(4): 625-32.
- [6]. Dubey JP. Toxoplasmosis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, editors. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, parasitology*. 10rd ed. London: Arnold 2005; 428-35.
- [7]. Gerhold RW, Saraf P, Chapman A, Zou X, Hickling G, Stiver WH, Houston A, Souza M, Su C. *Toxoplasma gondii* seroprevalence and genotype diversity in select wildlife species from the southeastern United States. *Parasit Vectors* 2017; 10(1): 508.
- [8]. Fouladvand MA, Jafari SM. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in pregnant women of Bushehr. *ISMJ* 2000; 3(2): 113-16. (Persian)
- [9]. Darvani A, Sagha M. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in women referred to medical health laboratory before marriage, Ardebil. *J Ardabil Uni Med Sci* 2004; 4(13): 19-25. (Persian)
- [10]. Aldred S. Oxidative and nitrative changes seen in lipoproteins following exercise. *Atherosclerosis* 2007; 192(1): 1-8.
- [11]. Ahmed G, Thakur AK, Pushpanjali S, Chaturvedi SK, Shivam P, Jamal F et al. Modulation of the immune response and infection pattern to *Leishmania donovani* in visceral leishmaniasis due to arsenic exposure: An in vitro study. *PLOS One* 2019; 5; 14[2]:e0210737. doi: 10.1371/journal.pone.0210737.
- [12]. Pitini V, Arrigo C, Altavilla G. How cells respond to interferons. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(25): 439-39.
- [13]. Radak Z, Young Chung H, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biol Med* 2008; 44(1): 153-59.
- [14]. Jahanbakhsh Z, Mohammad MT, Jafari M, Khoshbaten A, Salehi M. Role of oxidative stress in the aortic constriction-induced ventricle hypertrophy in rat. *Physiol Pharmacol* 2012; 16: 146-55.
- [15]. Riahi S, Mohammadi MT, Sobhani V. Role of oxygen and nitrogen free radicals in diabetes-induced atherosclerosis, and effects of exercise on it. *Physiology and Pharmacology* 2014; 18 (1):1-15.
- [16]. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Review* 2012; 70(5): 257-65
- [17]. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(1): 18-35.
- [18]. Wannamethee SG, Lowe GD, Rumley A, Bruckdorfer KR, Whincup PH. Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes, and markers of inflammation and hemostasis. *The American journal of clinical nutrition* 2006; 83(3): 567-74.
- [19]. Shirvani H, Sobhani V. The study of immunoglobulin A, G and cortisol serum response in two consecutive soccer match and vitamin C supplements. *Razi Journal of Medical Sciences* 2015; 22(133): 70-79.
- [20]. Kang DW, Ahn CY, Kwan B, Shin B, Chung JH, Kim L. The effect of intravenous ascorbic acid in hemodialysis patients with normoferritinemic anemia. *Kidney Res Clin Pract* 2012; 31(1): 48-53.
- [21]. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(1): 4-15.
- [22]. Zadák Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res* 2009; 58(1): 13-17.
- [23]. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2014; 14(2): 157-65.
- [24]. Linkenhoker JR, Linton CG. Effect of nesting material on body weights of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013; 52(5): 531-33.
- [25]. Tang Sh, Jiang M, Huang C, Chenhuan L, FanY, Yong Q. Characterization of arabinogalactans from *Larix principis-rupprechtii* and their effects on NO production by macrophages. *Carbohydrate Polymers* 2018; 200(15): 408-15
- [26]. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide* 2001; 5(1): 62-71.
- [27]. Pancewicz SA, Skrzydlewska E, Hermanowski T, Stankiewicz A, Sniecińska A, Kondrusik M et al. [Vitamin A, E and C serum concentration in patients with Borrelia

مدل‌های حیوانی مانند رت در شرایط درون تنی^۱ و برون تنی^۲ با استفاده از گروه‌های نمونه بزرگ‌تر توصیه می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مصرف هریک از ویتامین‌ها باعث افزایش قدرت انگل‌کشی ماکروفاژها و همچنین افزایش تولید نیتریک اکساید می‌شود و کاملاً مؤثر است. همچنین اثر هم‌افزایی این ویتامین‌ها در صورتی که هر دو با هم در یک رژیم تجویزی استفاده شوند، نیز مشاهده شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان استفاده از ویتامین‌های C و E را به‌عنوان مکمل در کنار داروهای انتخابی در درمان توکسوپلاسموزیس به مراکز درمانی و پزشکان مخصوصاً متخصصان زنان و تغذیه و عفونی پیشنهاد کرد؛ زیرا در این مطالعه مشخص شد که ویتامین‌های C و E سبب افزایش تولید

- burgdorferi antibodies--non-symptomatic carriers]. *Przegl Epidemiol* 2005; 59(1): 35-41.
- [28]. Yıldıran H, Mercanlıgil SM, Besler HT, Tokgözoğlu L, Kepez A. Serum antioxidant vitamin levels in patients with coronary heart disease. *Int J Vitam Nutr Res* 2011; 81(4): 211-17.
- [29]. Calder PC. Feeding the immune system. *Proc Nutr Soc* 2013; 72(3): 299-309.
- [30]. Taila AK, Hingwe AS, Johnson LE. Toxoplasmosis in a patient who was immunocompetent: a case report. *J Med Case Rep* 2011; 5: 16.
- [31]. Rodriguez-Cortes A, Martori C, Martinez-Florez A, Clop A, Amills M, Kubejko J et al. Canine Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 1-10.
- [32]. Guillermo L, DaMatta R. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poultry science* 2004; 83(5): 776-82.
- [33]. Wu G, Meininger C. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annual review of nutrition* 2002; 22(1): 61-86.
- [34]. Genuardi J. The effects of vitamin E and selenium on the Nitric Oxide production of macrophages. *Pediatric Research* 1999; 45: 771.
- [35]. Oliveira BSC, Meurer SRY, Oliveira GM, Medeiros W, Silva ONE, Brito C FA et al. Comparative study on the antioxidant and anti-Toxoplasma activities of vanillin and its resorcinarene derivative. *Molecules* 2014; 19 (5): 5898-912.
- [36]. Young J, Seung H, Kim J. Vitamin C-treated murine bone marrow-derived dendritic cells preferentially drive naïve T cells into Th1 cells by increased IL-12 secretions. *Cellular immunology* 2011; 66(2): 192-99.
- [37]. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol* 2012; 34(6): 793-813.

The Effect of Vitamins C and E on Nitric Oxide Elevation to Enhance Killing of Phagocytised Tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in BALB/c Mice

Behnaz Jalalizadegan¹, Fatemeh Ghaffarifar², Soudabeh Fallah³, Taher Elmi¹,
 Mohammad Javad Namazi⁴, Fatemeh vafashoare⁵, Fatemeh Tabatabaie^{1*}

1. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, PO Box 14115-111, Tehran, Iran
3. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
5. Fatemeh Vafashoare, Urmia city health center, Health deputy of West Azerbaijan, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Abstract

Background *Toxoplasma gondii* is an obligatory intracellular parasite causes toxoplasmosis. The parasite has two forms, noninvasive bradizoites and invasive tachyzoites. The present study, for the first time, aimed to evaluate the effect of vitamins C and E supplementation on nitric oxide (NO) elevation to promote killing invasive tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by activated macrophages in susceptible BALB/c mice.

Materials & Methods Seventy BALB/c mice were recruited and randomly divided into fourteen groups of five (n=5). Eight control groups included: one group left intact, no infection or vitamin. Two groups were given saline or methanol only. Two groups were infected with 10⁴ or 5×10⁴ parasites. The other groups were administrated only vitamin C, E, or both. The rest of sample and control groups were infected with either 10⁴ or 5×10⁴ tachyzoites. Each group was supplemented with 100 µl vitamin E every other day, or 200 µl of vitamin C daily. This regimen was used for mice given a mixture of both vitamins E and C. Vitamins were intraperitoneally administered up to five days. On sixth day mice were intraperitoneally infected with tachyzoites. The blood samples were taken three days post infection, serum collected and stored at - 20 C° until examinations. The peritoneal macrophages were isolated for counting phagocytised tachyzoites and nitric oxide assays.

Results Tachyzoites were significantly decreased after vitamin C & E administration in the infected mice compared to the controls. In mice supplemented vitamins NO levels were significantly higher compared to controls.

Conclusion Our findings showed that administration of vitamin C, E or both significantly enhanced killing invasive parasites through NO elevation produced by activated macrophages and may have therefore, complementary therapeutic effects.

Received: 2018/05/14

Accepted: 2018/07/22

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Vitamin E, Vitamin C, Nitric Oxide.