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

بهناز جلالی‌زادگان[1]، فاطمه غفاری‌فر[2]، سودابه فلاح[3]، طاهر علمی[4]، محمدجواد نمازی[5]، فاطمه وفاشعار[6]، فاطمه طباطبائی[1*]

۱. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲. استاد انگل‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استاد بیوشیمی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴. دانشجوی دکتری انگل شناسی، دانشکدهٔپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۵. استادیار میکروبیولوژی، ایمونولوژی و انگل‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۶. استادیار ایمونولوژی، مرکز بهداشت ارومیه، معاونت بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱

چکیده

زمینه توکسوپلاسما گوندی یک انگل داخل‌سلولی 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 فزایندهٔ 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 ۵ × $۱۰^۴$ یا $۱۰^۴$ انگل آلوده شدند؛ دو گروه دیگر یکی سالین و دیگری متانول دریافت کردند. گروه‌های مورد شامل شش گروه بودند: سه گروه دریافت‌کنندهٔ $۱۰^۴$ × ۵ انگل و سه گروه دیگر دریافت‌کنندهٔ $۱۰^۴$ انگل بودند. به هرکدام از موش‌های این گروه‌ها، هریک از ویتامین‌ها به‌تنهایی یا همراه باهم تجویز شد. ویتامین E به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر یک‌روزدرمیان 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 ۲۰°C- تا زمان انجام تست‌ها ذخیره شدند. پس از جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش‌ها، تاکی زوئیت‌ها شمارش شدند و سنجش نیتریک اکساید نیز صورت گرفت.

یافته‌ها تزریق ویتامین‌ها باعث کاهش معنادار تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما 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 ماکروفاژهای فعال‌شده باعث افزایش کشته شدن انگل‌های داخل ماکروفاژ شد که به‌عنوان مکمل درمانی توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
توکسوپلاسما گوندی، ویتامین C، ویتامین E، نیتریک اکساید.

* **نویسندهٔ مسئول: فاطمه طباطبائی**
نشانی: گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۶۷۰۳۲۲۰ **دورنگار:** ۰۲۱۸۸۶۰۲۲۱۷
رایانه: Tabatabaei.f@iums.ac.ir, Tabatabaie59@gmail.com
شناسه ORCID: 0000-0001-9189-4190
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0002-1559-7220

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۴، مهر و آبان ۱۳۹۸، ص ۵۱۴-۵۲۵
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

۱. مقدمه

اختلالات تغذیه و خوردن[1] 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 ـ 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 به‌عنوان 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 [۲ـ۳]. در ایران در جامع‌ترین مطالعهٔ 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 رفتارهای 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 زمینهٔ اختلالات خوردن نشان داد که چرخش‌های مکرر و کوتاه اختلال خوردن از نوع محدودکننده[2] ممکن است منجر به بی‌اشتهایی عصبی[3] 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 افسردگی تمایل داشتند [۸].

در نظریهٔ بندورا، مفهوم خودکارآمدی[4] 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 رابطهٔ مثبت دارد. خودکارآمدی عامل مهمی است که باید در برنامه‌های آموزش و مشاوره‌های تغذیه‌ای کاهش وزن مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا فقط اطلاع‌رسانی دربارهٔ رفتار سالم کافی نیست [۹].

گمانه‌زنی‌هایی درمورد عوامل بروز و تداوم اختلال‌های خوردن صورت گرفته است. هرکدام از اشکال اختلال خوردن درنتیجهٔ تعامل پیچیدهٔ عوامل زیستی، اجتماعی، فرهنگی و روان‌شناختی ایجاد می‌شود. درمان اختلالات تغذیه‌ای و خوردن در کاهش بیماری‌های جسمی مانند بیماری‌های قلبی ـ عروقی و مسائل روان‌شناختی همچون افسردگی و اضطراب و بالا بردن اعتمادبه‌نفس و کیفیت زندگی مبتلایان مؤثر است. امروزه بیش از پیش احساس نیاز به مداخلات روان‌شناختی برای افراد دچار اختلال خوردن افزایش می‌یابد. درمان‌های قبلی تأییدشده برای اختلالات خوردن عبارت‌اند از: درمان شناختی ـ 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[5] است. اگرچه در روان‌شناسی غربی مفهوم جدیدی است، قرن‌هاست که ریشه در فلسفهٔ شرقی دارد [۱۱]. شفقت به خود به‌عنوان سازه‌ای سه‌مؤلفه‌ای شامل مهربانی به خود درمقابل قضاوت کردن خود، اشتراکات انسانی دربرابر انزوا و هشیاری درمقابل همانندسازی افراطی تعریف شده است. ترکیب این سه مؤلفهٔ مرتبط به‌هم، مشخصهٔ فردی است که به خود شفقت دارد [۱۱]. در تحقیقاتی که در حوزهٔ شفقت انجام شده است، گیلبرت به استفاده از این سازه در فضای جلسات درمان دست یازید و درنهایت 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 مداخلهٔ مؤثر در انواع مشکلات مربوط به سلامت روانی برآمده است [۱۲ـ۱۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که افرادِ با شفقت به خود در مقایسه با افراد فاقد شفقت به خود، از سلامت روانی بهتری برخوردارند؛ برای نمونه شفقت به خود در افراد

1. eating disorders
2. restricted
3. anorexia nervosa
4. self-efficacy
5. self-compassion

با افسردگی و اضطرابِ کم، بیشتر دیده می‌شود. شفقت به خود با توانایی‌های روان‌شناختی مثبت، ازقبیل شادی، خوش‌بینی، خِرد، کنجکاوی و کاوش و هوش هیجانی، ارتباط دارد [۱۴].

پژوهش‌های نسبتاً نادری درمورد 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؛ به‌طوری که شفقت به خود به‌صورت کلی پاتولوژی‌های مرتبط با اختلال خوردن مانند نگرانی‌ها درمورد 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 توسعهٔ شفقت به خود به کاهش طیف وسیعی از مشکلات روان‌شناختی افراد دارای اختلالات خوردن ازجمله افسردگی، اضطراب و استرس کمک شایان توجهی کرده است. درکل برپایهٔ یافته‌های پژوهشی، افراد دچار اختلالات خوردن که سطح پیشرفته‌ای از شفقت به خود را دریافت کرده‌اند، درمقابل 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 درمورد اختلالات خوردن هرچه بیشتر موجه می‌کند. از آنجا که درمان مبتنی بر شفقت ممکن است نقش حفاظتی دربرابر تصویر بدن و رفتارهای غذا خوردن ایفا کند، این درمان می‌تواند با توسعهٔ 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 براساس مداخلات روان‌شناختی و با توجه به اینکه در داخل کشور تاکنون پژوهشی در زمینهٔ 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، ازقبیل نگه‌داری، تغذیه و تطابق فضای زندگی، به‌صورت کامل و دقیق در این مطالعه رعایت شد. این مطالعه مورد تصویب شورای پژوهشی دانشگاه با کد ۹۴۲۶۵۶۱-۳۰-۰۳-۹۴ قرار گرفت و کد اخلاق آن با شمارهٔ 1394-03-3026561.IR-IUMS.REC توسط کمیتهٔ اخلاق دانشگاه به‌تصویب رسید.

۲,۲. آلوده کردن موش‌ها به توکسوپلاسما گوندی و تزریق ویتامین‌ها پس از آماده‌سازی ویتامین‌ها و تکثیر انگل

مطالعهٔ حاضر بر روی ۷۰ سر موش BALB/c مادهٔ بالغ inbred خریداری‌شده از انستیتو پاستور ایران (وزن ۲ ± ۲۰ 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 ۲۲ـــ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

۲,۳. آماده‌سازی ویتامین‌ها

ابتدا ویتامین C به مقدار ۵۰۰mg با حجم ۵ml با ۲ml 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 ۱۰۰mg یا ۱۰۰۰۰۰µg از این مادّه بود. همچنین از روز اول تا پنجم به گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین E به‌صورت یک‌روزدرمیان میزان ۱۰۰ میکرولیتر ویتامین E (یک ویال ویتامین E حاوی ۱mg/d (1dl = 1000µg) ویتامین E است) تزریق داخل صفاقی انجام شد. جهت استفادهٔ ۱mg/dl از این ویتامین در موش، با ۲cc متانول ۹۵٪ جهت حل شدن، مخلوط گردید و محلول استوک تهیه شد.

۲,۴. آماده‌سازی انگل

جهت آماده‌سازی انگل، ابتدا سویهٔ RH توکسوپلاسما گوندی تکثیر شد. سوش 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 بیکربنات سدیم، ال گلوتامین استفاده شد. مواد لازم جهت تهیهٔ 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 ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و شستوشو

دادن بـه مقـدار تقریبی 10^4 و $10^4 \times 5$ تـاکی زوئیـت بـه داخل محوطهٔ صـفاق موش سـفید کوچک آزمایشگاهی تلقیح شد. در روز ششم جهت تزریق برای گروه 10^4 مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از انگل به حجم ۲۵ میلی‌لیتر به‌وسـیلهٔ سـرم فیزیولوژی تزریقی و برای گروه $10^4 \times 5$ مقـدار ۲۲۵۰ میکرولیتر انگـل بـه حجم ۲۲٫۵ میلی‌لیتر رسانده شد.

۲٫۵. گروه‌بندی موش‌ها

موش‌ها به ۱۴ گروه پنج‌تایی تقسـیم شـدند: گروه I کنترل منفی (غیرآلوده و بـدون درمان)؛ گروه II کنترل مثبت اول (دریافت‌کنندهٔ $10^4 \times 5$ انگـل بدون دریافت ویتامین)؛ گروه III کنترل مثبت دوم (دریـافت‌کننـدهٔ 10^4 انگل بدون دریافت ویتامین)؛ گروه IV تا VI گروه‌هـای کنترل دارو شـامـل موش‌هـای غیرآلودهٔ دریـافت‌کنندهٔ ویتـامین C (گروه IV)، ویتـامین E (گروه V) و ویتـامین C و E هم‌زمان بودند (گروه VI). دو گروه هم به‌تنهایی سـالین (گروه VII) و متـانول ۹۵٪ (گروه VIII) دریـافـت کردنـد. گروه‌های آزمون اول شـامل موش‌های آلوده با $10^4 \times 5$ انگل، دریافت‌کنندهٔ ویتامین C (گروه IX)، ویتـامین E (گروه X) و ویتـامین C + E (XI) بود و گروه‌هـای آزمون دوم شـامـل موش‌هـای آلوده بـا 10^4 انگـل، دریـافـت‌کننـدهٔ ویتـامین C (گروه XII)، ویتامین E (گروه XIII) و ویتامین C و E هم‌زمان (گروه XIV) بودند [۲، ۴، ۲۴].

۲٫۶. روش کار

بلافاصـله پس از ۷۲ سـاعت، خون‌گیری از گوشـهٔ چشم انجام شد؛ بعد از کشـتن موش‌ها، به آن‌ها ۲cc نرمال سـالین بسیار سرد تزریق شـد؛ پس از ضربه زدن به ناحیهٔ صفاقی موش، بلافاصله همان مقدار ۲cc از صـفاق موش جدا گردید و مایع صفاقی جداسازی شد. بعد از سـانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شـد. این مرحله ۲ بار تکرار شـد. سـپس ماکروفاژهای ته لوله با FBS و RPMI-1640 به یک نسـبت مخلوط و درون پلیت کشـت سـلولی ریخته شـد و پس از بستن در پلیت در گرم‌خانهٔ CO2دار ۵٪ و در دمای ۳۷ درجه سـانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. پس از جمع‌آوری مایع رویی پلیت‌ها، آن‌ها برای بررسـی NO در ۲۰- درجه سـانتی‌گراد نگه‌داری شـدند. خون جمع‌آوری‌شـده از موش‌ها نیز ۲ بار در دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سـانتریفیوژ شـد و سـرم جداسـازی‌شـده در دمای ۲۰- درجه سـانتی‌گراد نگه‌داری شد. از سرم جداسازی‌شده برای سنجش ویتامین‌ها استفاده گردید.

۲٫۷. سنجش نیتریک اکساید

از آنجا که نیتریک اکسـاید بسـیار ناپایدار اسـت و نیمهٔ عمر بسـیار کوتاهی دارد، بین ۶ تا ۱۰ ثانیه و به‌سـرعت در حضـور اکسـیژن به NO2 تبدیل می‌شـود و انـدازه‌گیـری مستقیم آن نسبتاً مشکل است، بنابراین اندازه‌گیری آن با استفاده از متابولیت‌هـای پایـدارش، یعنی نیتریت و نیترات، با روش رنگ‌سـنجی برمبنای واکنش گریس صـورت می‌گیرد. اساس این واکنش تشکیل رنگ ازدی آزوتاسیون[1] یک سـولفانامید به کمک نیتریت در محـیط اسـیدی و سـپس کنژوگـاسـیون آن بـا یـک آمین آروماتیک مثل NEDD[2] اسـت [۲۵ـ۲۶]. از هریک از نمونه‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت ۹۶خانه‌ای تخت ریخته شد و بر روی هریک از آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس اضـافه شـد. پس از افزودن معرف گریس به نمونه‌ها، براسـاس میزان نیتریک اکسـاید موجود در آن‌ها، طیفی از رنگ‌های ارغوانی با شـدت‌های مختلف ایجاد شد. بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق با دسـتگاه الایزا با طول موج ۵۵۰ نانومترو فیلتر مرجع ۶۳۰ نـانومتر جـذب نمونـه‌هـا قرائت شـد. به‌منظور تهیهٔ منحنی اسـتاندارد نیتریت سدیم با وزن مولکولی ۶۹ (g/mol) استفاده شد. با ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از خط رگرسیون، غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها با اسـتفاده از جذب آن‌ها محاسبه شد. نتایجی که نشـان‌دهندهٔ مقدار تولید نیتریک اکساید است، به‌صورت میکرومولار بیان شد.

۲٫۸. روش سنجش ویتامین E

جهـت سـنجش میزان ویتـامین E از کیـت شـرکـت ZellBio (Germany) که روش سـاده و تکرارپذیر اسـت، با حسـاسـیت ۰٫۳µg/ml اسـتفاده شـد که کیت استانداردی برای ارزیابی ویتامین E در نمونه‌های بیولوژیکی مانند سـرم و پلاسـما اسـت. اسـاس آن کالریمتری (رنگ‌سـنجی در طول موج ۵۳۶nm با روش الایزا اسـت. سـپس برای تـک‌تـک نمونه‌های اسـتاندارد با غلظت‌های متفاوت منحنی استاندارد با استفاده از خط رگرسیون ترسیم شد [۲۷].

۲٫۹. روش سنجش ویتامین C

سـنجش این ویتامین با کیت ویتامین C محصـول شرکت ZellBio با روش رنگ‌سـنجی (الایزا) در ۵۲۰nm با حساسیت ۰٫۳µg/ml در نمونه‌های بیولوژیکی انجام شـد. با ترسـیم منحنی اسـتاندارد و با اسـتفاده از خط رگرسـیون، غلظت ویتامین C موجود در نمونه‌ها با استفاده از جذب آن‌ها محاسبه شد [۲۷ـ۲۸].

۲٫۱۰. روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

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

1 .diazotization

2. N-1-[naphthyl] ethylenediamine

انگل‌های موجود در ۱۰۰ ماکروفاژ پس از فیکس کردن و سپس رنگ‌آمیزی با گیمسا، شمارش شد و برای مقایسهٔ میانگین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه آزمون پارامتری آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌کار رفت. اما درمورد مقایسهٔ میانگین‌های مقادیر نیتریت تولیدشده از آزمون غیرپارامتری Anova one way از برنامهٔ نرم‌افزاری SPSS (نسخهٔ 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 دریافت‌کنندهٔ ویتامین C به‌تنهایی با غلظت ۰,۲µg/ml ± ۴,۶ و کمترین مقدار ویتامین C در گروه دریافت‌کنندهٔ انگل به‌تنهایی با غلظت ۰,۰۰µg/ml ± ۱ مشاهده شد که این اختلاف از لحاظ آماری معنادار بود (p<0.05). همچنین بررسی نتایج نشان داد در گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین E نیز بیشترین غلظت در گروه کنترل دارو (دریافت‌کنندهٔ ویتامین E به‌تنهایی) با غلظت ۰,۳µg/ml ± ۳,۵ و کمترین مقدار در گروه دریافت‌کنندهٔ انگل ($۱۰^۴$× ۵ انگل) با غلظت ۰.۰۰µg/ml ± ۰.۳ وجود داشت. اختلاف میزان ویتامین E در گروه مورد آزمون نسبت به گروه کنترل معنادار (p<0.05) بود.

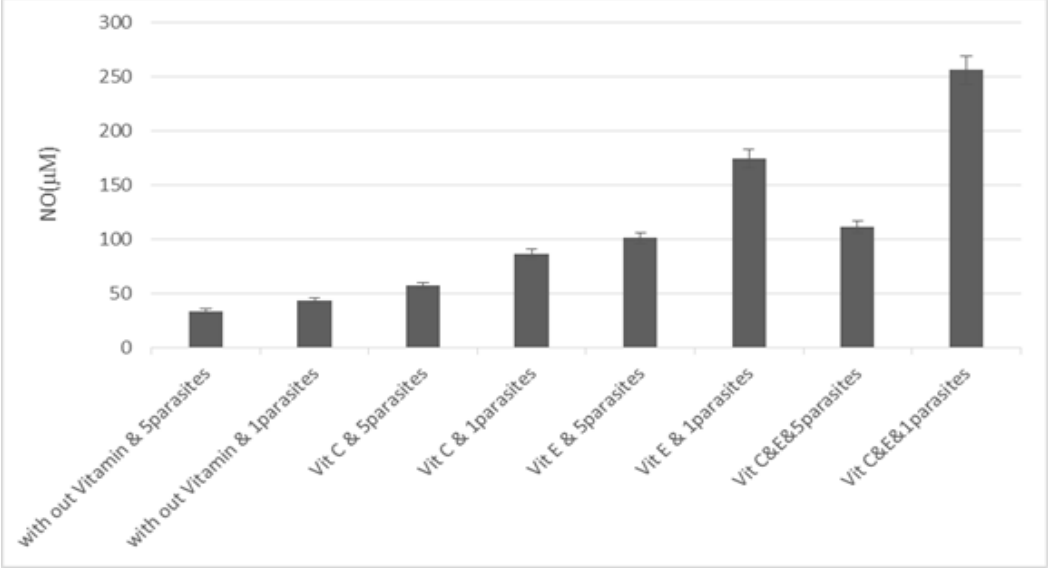
۳,۲. غلظت NO در گروه‌های کنترل و درمان

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 $۱۰^۴$ 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

	گروه‌ها	NO [Mean ± SD]	p value
	کنترل منفی	12.5 ± ۲.3	
کنترل مثبت	۱. دریافت $۱۰^۴$ انگل	۴۴.۱ ± ۳.۶	
	۲. دریافت $۱۰^۴$ x ۵ انگل	۳۴.۱ ± ۲.۶	
کنترل دارو	دریافت ویتامین C	۲۲.۵ ± ۳.۱	(p< 0.05)
	دریافت ویتامین E	۲۰.۲ ± ۲.۷	
	دریافت ویتامین C + E	۲۴.۲ ± ۲.۱	
آزمون	۱. دریافت $۱۰^۴$ انگل + ویتامین C	۸۷.۱ ± ۲.۳	(p< 0.05)
	۲. دریافت $۱۰^۴$ انگل + ویتامین E	۱۷۵ ± ۱۲.۷	
	۳. دریافت $۱۰^۴$ انگل + ویتامین C و E	۲۵۶.۴ ± ۱۷.۶	
	۴. دریافت $۱۰^۴$x۵ انگل + ویتامین C	۵۷.۶ ± ۲.۰	
	۵. دریافت $۱۰^۴$x۵ انگل + ویتامین E	۱۰۱.۵ ± ۳.۴	
	۶. دریافت $۱۰^۴$ x ۵ انگل + ویتامین C و E	۱۱۲ ± ۱۲.۶	

بیشترین میزان NO در گروه آزمون که دریافت‌کنندهٔ $۱۰^۴$ 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.



شکل ۱. مقایسهٔ غلظت NO برحسب µM در بین گروه‌های دریافت‌کنندهٔ انگل

گروه‌ها به این شرح‌اند:

۱. **without Vitamin & 5parasites**: گروهی که هیچ‌گونه ویتامینی دریافت نکرده و ۵×۱۰^۴ انگل را به‌صورت تزریقی گرفته است.

۲. **without Vitamin & 1parasites**: گروهی که هیچ‌گونه ویتامینی دریافت نکرده و $۱۰^۴$ انگل را به‌صورت تزریقی گرفته است.

۳. **vitC & 5parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C که ۵×۱۰^۴ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.

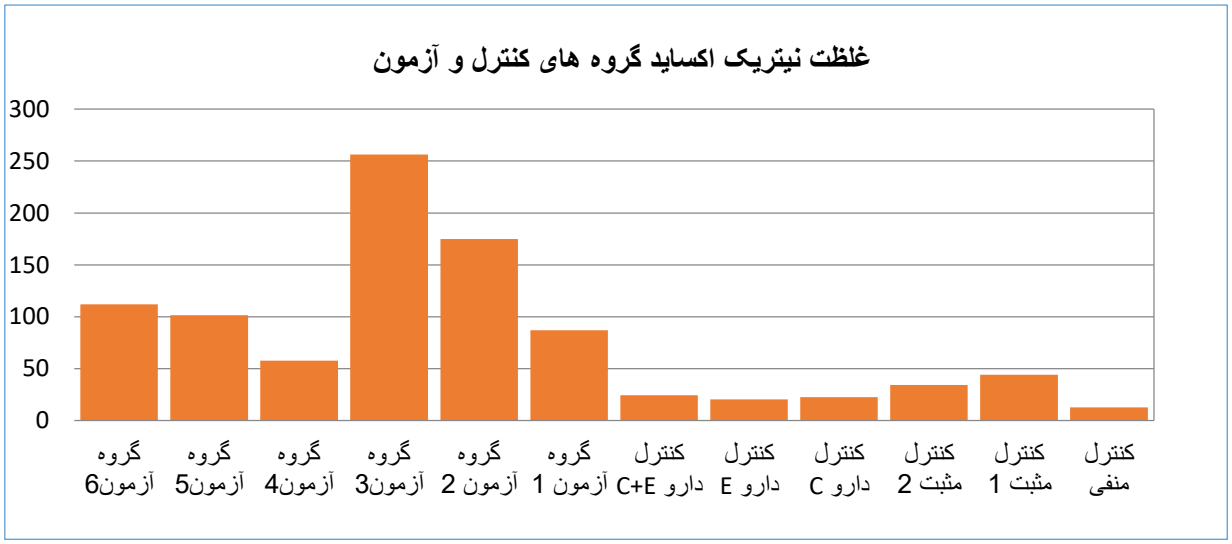
۴. **vitC & 1parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C که $۱۰^۴$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.

۵. **vitE & 5parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین E که ۵×۱۰^۴ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.

۶. **vitE & 1parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین E که $۱۰^۴$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.

۷. **vitC and E & 5parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C + E که ۵×۱۰^۴ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.

گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین **vitC and E& 1parasites** که $۱۰^۴$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است C + E ($p<0.01$).



شکل ۲. مقایسهٔ غلظت NO برحسب µM در بین گروه‌های دریافت‌کنندهٔ کنترل و آزمون

گروه‌ها به این شرح‌اند:

۱. کنترل منفی بدون عفونت و بدون دریافت ویتامین؛

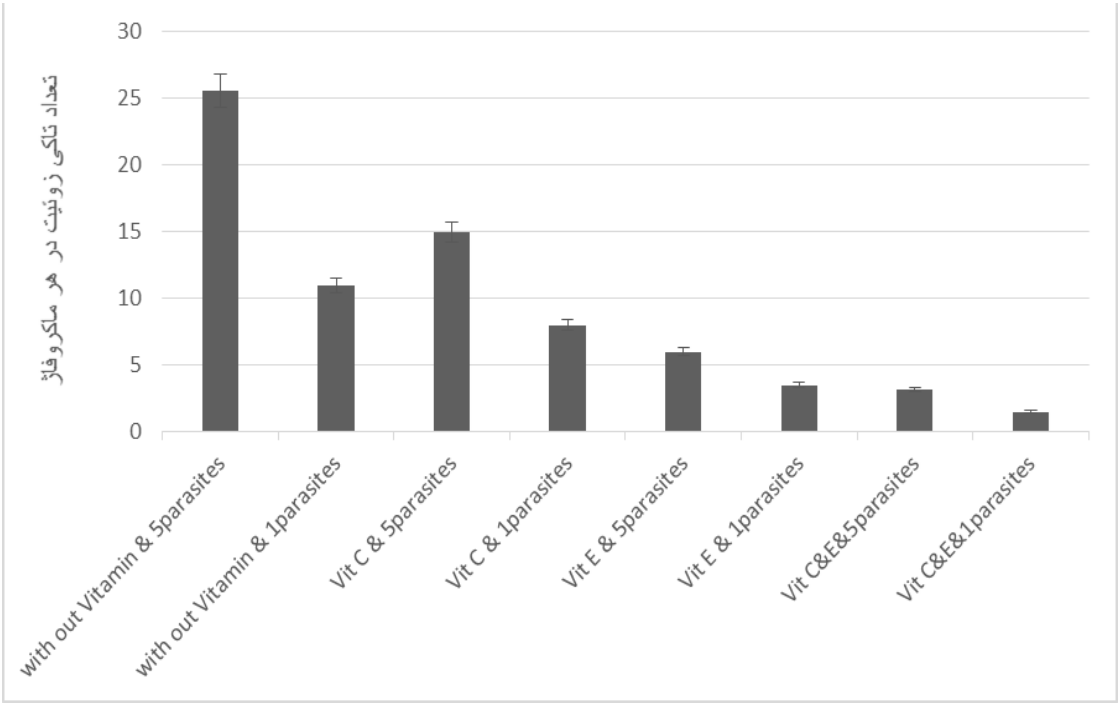
۲. کنترل مثبت ۱ دریافت‌کنندهٔ 10^4 انگل؛
۳. کنترل مثبت ۲ دریافت‌کنندهٔ $10^4 \times 5$ انگل؛
۴. گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C؛
۵. گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین E؛
۶. گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین‌های C و E؛
۷. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین C؛
۸. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین E؛
۹. گروه آزمون دریافت ۱۰۴ انگل + ویتامین C و E؛
۱۰. گروه آزمون دریافت 10^4 5 x انگل + ویتامین C؛
۱۱. گروه آزمون دریافت 10^4 5 x انگل + ویتامین E؛
گروه آزمون دریافت 10^4 5 x انگل + ویتامین C و e

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 دریافت‌کنندهٔ 10^4 × ۵ ، انگل بدون دریافت ویتامین مشاهده شد (۰.۲ ± ۰.۶ ۲۵). همچنین نتایج نشان داد در گروه دریافت‌کنندهٔ 10^4 انگل توأم با ویتامین C و E، نسبت به گروه‌های دریافت‌کنندهٔ انگل با ویتامین E و گروه‌های دریافت‌کنندهٔ انگل با ویتامین C، تعداد زوئیت‌ها کاهش معناداری را از لحاظ آماری نشان می‌دهند ($p< 0.01$) (جدول ۲ و شکل ۳).

۳،۳. شمارش تاکی زوئیت‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

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

	گروه‌ها	تعداد تاکی زوئیت [Mean ± SD]	p value
کنترل مثبت	۱. دریافت 10^4 انگل	۱۱ ± ۰.۴	
	۲. دریافت 10^4 x ۵ انگل	۲۵.۶ ± ۰.۲	
آزمون	۱. دریافت 10^4 انگل + ویتامین C	۸ ± ۰.۳	p<0.01
	۲. دریافت 10^4 انگل + ویتامین E	۳.۵ ± ۰.۱	
	۳. دریافت 10^4 انگل + ویتامین CوE	۱.۵ ± ۰.۱	
	۴. دریافت $10^4 \times 5$ انگل + ویتامین C	۱۵ ± ۰.۱	
	۵. دریافت $10^4 \times 5$ انگل + ویتامین E	۶ ± ۰.۱	
	۶. دریافت $10^4 \times 5$ انگل + ویتامین C و E	۳.۲ ± ۰.۵	



شکل ۳. مقایسهٔ شمارش تاکی زوئیت‌ها در بین گروه‌های دریافت‌کنندهٔ انگل
گروه‌های نشان‌داده‌شده در شکل عبارت‌اند از:

۱. **Without Vitamin & 5parasites**: گروهی که هیچ‌گونه ویتامینی دریافت نکرده و $۱۰^۴ \times ۵$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
۲. **no Vitamin & 1parasites**: گروهی که هیچ‌گونه ویتامینی دریافت نکرده و $۱۰^۴$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
۳. **vitC & 5parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C که $۱۰^۴ \times ۵$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
۴. **vitC & 1parasites**: گروه دریافت‌کننده ویتامین C که $۱۰^۴$ انگل را بصورت تزریقی دریافت کرده است.
۵. **vitE & 5parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین E که $۱۰^۴ \times ۵$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
۶. **vitE & 1parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین E که $۱۰^۴$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
۷. **vitC and E & 5parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C + E که $۱۰^۴ \times ۵$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است.
۸. **vitC and E & 1parasites**: گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C + E که $۱۰^۴$ انگل را به‌صورت تزریقی دریافت کرده است ($p<0.01$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

توکسوپلاسما گوندی از میکروارگانیسم‌های درون‌سلولی است که توسط سیستم ایمنی بدن کنترل می‌شود و در افراد دارای نقص سیستم ایمنی می‌تواند کُشنده باشد؛ درنتیجه 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 [۲۹ـ۳۰]. ازجمله راه هایی که باعث افزایش فعالیت‌های سیستم ایمنی می‌شود و در سال‌های اخیر محققان زیادی دربارهٔ خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ایمنی‌زایی آن‌ها مطالعه کرده‌اند، تجویز ویتامین E و C است. براساس مطالعات مختلف، مصرف ویتامین‌های C و E علاوه‌بر 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. مجموعهٔ این اتفاقات سبب افزایش قدرت دفاعی بدن دربرابر عوامل بیماری‌زا ازجمله 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 درمقابل انگل توکسوپلاسما 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 لیشمانیا[1] در شرایط in vivo بررسی کردند. نتایج مطالعهٔ آن‌ها نشان داد که ویتامین D در انهدام داخل‌سلولی انگل لیشمانیا تأثیرگذار است که اثرات مشابهی با ویتامین‌های C و E استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر دارد.

گیلمو و همکاران [۳۲] در سال ۲۰۰۴ در امریکا و ویو و همکاران [۳۳] در سال ۲۰۰۲ در امریکا 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. مطالعهٔ ما نیز همانند مطالعات فوق نشان داد که توکسوپلاسما 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 آنتی‌توکسوپلاسما هستند. نتایج مطالعهٔ حاضر نیز نشان‌دهندهٔ خواص ضدتوکسوپلاسمایی ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدان است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ یانگ و همکاران [۳۶] در کرهٔ جنوبی با هدف بررسی اثرات بالقوهٔ 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 داخل‌سلولی است که از طریق افزایش IFNγ تأثیر ضدعفونی خود را می‌گذارد. افزایش IFNγ باعث فزونی گرفتن فعالیت میکروب‌کشی ماکروفاژها می‌شود؛ لذا کاهش میزان تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی در مطالعهٔ حاضر در گروه دریافت‌کنندهٔ ویتامین C را می‌توان با مطالب ذکرشده توجیه کرد. این اختلاف میانگین بین گروه کنترل و آزمون از لحاظ آماری معنادار بود [۳۶ـ۳۷]. به‌طور کلی نتایج مطالعهٔ پیشِ رو نشان‌دهندهٔ نقش ویتامین‌های C و E در کنترل عفونت‌های درون‌سلولی با فعال کردن برخی واسطه‌های ایمنی است؛ لذا تحقیقات بیشتر در این زمینه بر روی سایر میکروارگانیسم‌ها و ویتامین‌ها و یا حتی سایر

1. L.major

مدل‌های حیوانی مانند رت در شرایط درون‌تنی[1] و برون‌تنی[2] با استفاده از گروه‌های نمونهٔ 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 درصورتی 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 نیتریک اکساید در ماکروفاژهای فعال‌شده می‌شود که آن نیز از مکانیسم‌های دفاعی بدن علیه این انگل است. از طرفی میزان تاکی زوئیت‌های باقی‌ماندهٔ انگل در گروه‌های درمان‌شده با ویتامین‌های C و E به میزان معناداری نسبت به گروه‌های کنترل آلوده‌شده 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]. Daryani 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, Hermanowsk T, Stankiewicz A, Sniecińska A, Kondrusik M et al. [Vitamin A, E and C serum concentration in patients with Borrelia

1. in vivo
2. in vitro

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 ONF, 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 Tachizoites of *Toxoplasma gondii* in BALB/c Mice

Behnaz Jalalizadegan[1], Fatemeh Ghaffarifar[2], Soudabeh Fallah[3], Taher Elmi[1], Mohammad Javad Namazi[4], Fatemeh vafashoare[5], 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 tachizoites. 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 tachizoites 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 10^4 or 5×10^4 parasites. The other groups were administrated only vitamin C, E, or both. The rest of sample and control groups were infected with either 10^4 or 5×10^4 tachizoites. 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.