اثر زهر زنبور عسل بر روی تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی در شرایط آزمایشگاهی

سید مصطفی مشکات[۱]، بابک رضاوندی[۲]، رضا میرنژاد[۳]، داریوش قاسمی[۴]، وهاب پیرانفر *[۵]، محمدرضا خاتمی نژاد[۶]

۱. دکتری انگل شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد دامغان
۲. کارشناسی ارشد انگل شناسی، محقق مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ۱.. الاعظم، تهران
۳. دکتری باکتری شناسی پزشکی، دانشیار و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ۱.. الاعظم، تهران
۴. کارشناسی ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ۱.. الاعظم، تهران
۵. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن
۶. دکتری میکروبیولوژی، عضو هیئت علمی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، مرکز بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... الاعظم، تلفن ۰۹۳۷۱۳۰۷۳۰۰، vahab.p@gmail.com

دریافت مقاله: تیر نود و سه پذیرش برای چاپ: آبان نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده است که افراد در معرض زهر زنبور عسل، به مراتب کمتر به بیماری های انگلی مبتلا می شوند. این مطالعه به اندازه گیری خواص ضد انگلی زهر زنبور عسل در محیط کشت سلولی آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی می‌پردازد.*

روش کار: *رده سلولی HFF (Human foreskin fibroblasts) برای کشت انتخاب و ده پاساژ تهیه شد. سپس تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی و زهر زنبور عسل به ۸ فلاسک محیط کشت اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، رشد تاکی زوئیت ها توسط میکروسکوپ بررسی شد. برای گروه شاهد از یک فلاکس کشت همراه با تاکی زوئیت بدون زهر زنبور عسل یک فلاکس عاری از تاکی زوئیت همراه با ۴ µg/µl زهر زنبور عسل استفاده شد. غلظت مناسب با استفاده از تست XTT بدست آورده شد.*

یافته‌ها: *یافته‌ها نشان داد که ۴ µg/µl تاثیری بر روی رده سلولی سالم HFF ندارد. زهر زنبور عسل با مهار رشد تاکی زوئیت ها و جلوگیری از رشد ۷۰ ٪ آنها ($P< 0.01$) خاصیت ضد انگلی بر روی تاکی زوئیت های توکسوپلاسما گوندی دارد و اختلاف معنی داری بین دو گروه مورد و شاهد وجود دارد $p<0.05$. همچنین نشان داده شد که غلظت ۶۴ µg/µl از زهر زنبور عسل، رشد رده سلولی HFF را مهار خواهد نمود.*

نتیجه گیری: *با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اثر ضد انگلی زهر زنبور عسل بوضوح قابل مشاهده است. زهر زنبور در نابودی تاکی زوئیت های توکسوپلاسما گوندی در غلظت مناسب بسیار قوی عمل می‌کند و توصیه می‌شود در یک مرحله گسترده‌تر در مدل‌های حیوانی مورد آزمون قرار بگیرد.*

واژگان کلیدی: ***تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی، زهر زنبور عسل، ضد انگل، رده سلولی HFF، XTT***

مقدمه

عفونت توکسوپلاسما گوندی، انگل اجباری درون سلولی، به طور گسترده‌ای در سراسر جهان شایع است (۱). این انگل اجباری درون سلولی باعث ایجاد بیماری در انسان و حیوان می شود(۲). انگل در بدن انسان دو مرحله حاد و مزمن ایجاد می‌کند(۳). آلودگی به توکسوپلاسما گوندی با خوردن اووسیست های رسیده انگل بواسطه آب و مواد غذایی ناسالم مانند گوشت های آلوده به کیست نسجی ایجاد می شود. این تک یاخته در افراد با اختلال سیستم ایمنی عوارض و علائم شدید و حتی مرگ آوری را موجب می‌شود(۴). اما در افراد با سطح ایمنی طبیعی ممکن است بدون علامت باشد. گزارش شده است که ۳۰ درصد موارد مرگ و میر مبتلایان به ایدز در اثر توکسوپلاسموز بوده است(۵, ۶).

انگل به سه شکل تاکی زوئیت، برادی زوئیت و کیست نسجی مشاهده شده است. تاکی زوئیت اصطلاحی است که توسط فرانکل برای توصیف مرحله‌ای

که رشد انگل در سلول گیاهی و جانوری با سرعت بالایی صورت می‌گیرد بکار برده شد. در مرحله حاد، تاکی زوئیت ها هر ۴ تا ۶ ساعت تکثیر یافته و با انباشته شدن سلول، آن را پاره می‌کنند(۷).

تاکی زوئیت ها ۲ تا ۶ میکرو متر طول داشته و هلالی شکل هستند. هسته آن‌ها در منطقه مرکزی سلول واقع شده و شامل کروماتین و هستک است. تاکی زوئیت از طریق penetrating و یا فاگوسیتوز وارد سلول میزبان می‌شود، به شکل تخم مرغی درآمده و توسط واکوئول های parasitophorous احاطه می‌شوند. که به نظر مشتق شده از سلول میزبان و انگل می‌باشند(۸).

صلاحی مقدم و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که شیوع این انگل در جامعه انسانی جنوب شهر تهران ۶۸/۴ درصد بوده است. گزارشات دیگر نیز آلودگی قابل توجه افراد به این انگل را در نقاط مختلف ایران نشان می دهند. که راه کاری سالم برای درمان این بیماری را نیازمند است(۹).

درمان تاکی زوئیت با گرفتن شرح حال طبی، معاینه فیزیکی و بررسی‌های آزمایشگاهی خون که برای تشخیص عفونت است؛ شروع می‌شود. برای کودک زیر ۵ سال داروهایی تجویز میگردد تا از عوارض چشمی پیشگیری شود. برای زن باردار پزشک با توجه خطرات و عواقب مورد دچار مشکل خواهد شد(۱۰). درمان بیمار دچار نقص ایمنی، با دارو صورت می‌گیرد. نوزادان دچار عفونت نیز با دارو درمان می‌شوند (چه با علامت چه بدون علامت زیرا میکروب‌ها می‌توانند پس از تولد تکثیر یابند). آنچه که مورد اهمیت است در صورت تجویز دارو برای فرد مبتلا، پزشک آزمون‌های خونی فراوانی را برای پایش عوارض جانبی انجام خواهد داد. چرا که درمان با داروهای موجود اثرات سوء فراوانی در پی خواهد داشت. لذا بررسی که پروتکل درمانی و استفاده از داورها و موادی طبیعی که اثرات زیان بار کمتری را برای بیمار در پی دارند، ضروری به نظر می رسد.

استفاده از سموم طبیعی در درمان امراض، از دیر زمان ریشه در فرهنگ و تمدن بشری داشته و در این میان زهر زنبور عسل از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. به عنوان نمونه بابلی‌ها، مصری‌ها، ایرانیان و رومی‌ها از جمله اقوامی بودند که از زهر زنبور عسل به منظور درمان امراض گوناگون استفاده می‌کردند. ژرمن‌ها و اسلاوها نیز در قرون وسطی زهر زنبور عسل را برای درمان نقرس به کار می‌بردند. نخستین بار Havas در سال ۱۹۵۰ اثر زهر زنبور عسل در القا مرگ سلول‌های سرطانی را گزارش کرد. این ماده دارای انواع پپتیدها، آنزیم‌ها، آمین‌های بیولوژی و مواد معدنی مختلف می‌باشد. اصلی‌ترین جزء این ترکیب ملی تین است که نزدیک به نیمی از زهر را تشکیل می‌دهد.

بنابراین مطالعه حاضر با توجه به لزوم استفاده از روش‌های درمانی جدیدتر و همچنین توجه به درمان موثر تر با صدمات جانبی کمتر به بررسی اثر کشندگی و ضد انگلی زهر زنبور عسل بر علیه تاکی زوئیت های توکسوپلاسما گوندی پرداخته است. همچنین برای این مطالعه فرض بر وجود اثر ضد انگلی این ماده بنا نهاده شده است.

روش کار

سوش استاندارد تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی سویه RH از آزمایشگاه رفرانس تهیه و نگه داری شد. یکی از مراحل دشوار کار بدست آوردن انگل و رشد آن به میزان کافی است. کشت سلولی توکسوپلاسما عاری از آلودگی، بسیار دشوار می‌باشد. برای این کار از روش آسان و مفید کشت رده سلولی HFF از بافت فورسکین در فلاکس‌های متوسط همراه با محیط کشت MEM و مکمل‌های گلوتامین، پنی سیلین، بی کربنات سدیم و سرم غیر فعال گوساله در انکوباسیون ۲۳ درجه سلسیوس استفاده کردیم.

رده های سلولهای HFF مورد نظر که از تانک ازت (دمای داخل تانک ازت ۱۹۶- درجه سلسیوس می باشد) خارج شده اند را به آرامی با گرمای دست، نیمی از محتوای ویال را ذوب می کنیم سپس از محیط RPMI(Pure) یعنی فاقد سرم (FBS) که به دمای محیط رسیده است، جهت ذوب کامل ویال محتوی سلول و انتقال سلول ها به فالکون ۱۵سی سی استفاده می کنیم و فالکون مذبور را با دور RPM ۱۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. بعد از سانتریفیوژ سلول‌ها در انتهای فالکون رسوب کرده و محیط رویی فالکون را به طور کامل خارج کرده و سلول ها را با محیط Gibco RPMI 10% که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی است همراه با supplement (محیط مغزی جهت رشد سلول ها) NEAA و Sodium pyruvate در فلاسک ml ۵۰ کشت میدهیم و شرایط سلول‌ها را با میکروسکوپ اینورت بررسی می کنیم. زیرا هنگامی که سلول‌ها فریز می شوند Viability (زنده بودن سلول‌ها) آنها ۴۰٪ تا ۵۰٪ کاهش پیدا می کند، این کاهش به دلیل مجاورت با DMSO (دی متیل سولفوکساید) است که یک ماده سمی است، همچنین برودت نیز بسیار تاثیرگزار است. بنابراین لازم است زمانی که سلولها فریز می شوند در فاز رشد و Viability آنها ۹۰٪ به بالا باشد و وقتی سلول های مورد نیاز را دفریز می کنیم لازم است با استفاده از محیط مغزی شرایط رشد سلول های مورد نیاز را فراهم بیاوریم و سلول ها وارد فاز رشد شوند و به Viability ۹۰٪ به بالا برسند. با رعایت نکات بالا در نهایت پس از رشد سلول‌ها و پوشش کامل سطح کشت فلاکس متوسط از سلول‌های فیبروبلاست خنثه گاه، محتویات آن را به ۱۰ فلاکس ۲۵ سانتی متر مربعی پاساژ داده و در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری کردیم تا لایه سلولی کامل شود.

برای انجام تست تعیین درصد زنده ماندن به روش رنگ امیزی تریپان بلو و XTT طبق پروتکل ۲۰ میکرولیتر سلول را با ۲۰ میکرو لیتر رنگ مخلوط و با استفاده از شمارش سلولی، تعداد سلول‌های زنده که تراوایی غشایی خود را از دست نداده بودند محاسبه گردید. زمانی که سلول ها به فاز رشد و تعداد کافی رسیدند آنها را با رنگ متیلن بلو به این طریق شمارش می کنیم. ابتدا بعداز از شستشوی فلاسک محتوی سلول ۲۰ لاندا از محیط حاوی سلول را در یکی از چاهک ۹۶ حفره ریخته و سپس ۲۰ لاندا از رنگ متیلن بلو برداشته و به سلول‌ها در حفره اضافه کرده و بعد از مخلوط کرن آنها با هم ۲۰ لاندا از محلول فوق را برداشته و بر روی لام نئوبار ریخته سلول‌ها را زیر میکروسکوپ الکترونی در هر چهار شانت لام شمارش می‌کنیم و میانگین می گیریم و در فرمول شمارش سلولی قرار می دهیم و محاسبه می کنیم.

برای آزمون XTT نیز با استفاده از نمک تترازولیوم XTT 2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) 5-، tetrazoliumhydroxide [(phenylamino) carbonyl]-2H-، سنجش زنده ماندن سلول‌ها، و یا سمیت سلولی بررسی شد. برای اینکار ۰/۰۶ گرم از پودر XTT را توزین و به حجم ۶۰ میلی لیتر رساندیم سپس آن را در شیگر و دمای ۷۰ درجه سلسیوس در پلیت های RPMI حل نمودیم. بعد از حل شدن مواد و آمادسازی، محلول XTTرا در تاریکی به پلیت مورد نظر به مقدار µl/well ۵۰ اضافه می کنیم.

هنگام کشت انگل مایع فلاکس‌ها را با محیط تازه تعویض کرده و از ۱۰ فلاکس، ۵ فلاکس را برای آلودگی با تاکیزوئیت توکسوپلاسما گوندی

همراه با زهر زنبور عسل و ۳ فلاکس را آلوده به تاکی زوئیت بدون زهر زنبور عسل و ۲ فلاکس را فقط به زهر زنبور عسل آلوده کردیم. به هر ۸ فلاکس تعداد ۱×۱۰^{۶} انگل تلقیح شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد.

قبل از شروع مطالعه توکسوپلاسما گوندی بدست آمده از آزمایشگاه را در یک فلاکس اولیه کشت سلولی رشد داده و تاکی زوئیت های حاصل را در زمان آغاز پژوهش استفاده کردیم.

پودر زهر زنبور عسل که در واحد علوم تحقیقات تهران و با استفاده از روش شوک الکتریکی تهیه شده بود، مورد استفاده ما قرار گرفت. محلول غلیظ این زهر ۲/۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر در دمای ۲۰- نگهداری می‌شد. و برای استفاده در این آزمایش به رقت ۴ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شد.

جهت بررسی رشد و یا عدم رشد تا کی زوئیت ها از روش‌های مورفولوژیکی استفاده شد. به منظور بررسی موفولوژیکی، سلول‌ها را به روش رایت- گیمسا رنگ امیزی کرده و در زیر میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار دادیم. تغییرات موفولوژیکی عبارت بودند از پاره شدن دیواره سلولی و از دست دادن تراوایی سلول بر اثر پارگی از خروج تاکی زوئیت ها و همچنین مشاهده تاکی زوئیت ها همچنین تغییر رنگ سیتوپلاسم.

پاسخ شمارش انگل‌ها و سلول‌های زنده با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش Mann Whitney U-test مورد بررسی قرار گرفت. $P <۰/۰۵$ به عنوان سطحی معنی دار مورد نظر بود.

یافته‌ها

نتایج بررسی میزان تکثیر سلول‌های HFF در محیط کشت (بدون تأثیر زهر و تاکی زوئیت) با روش شمارش سلولی با تریپان بلو نشان داد که رشد این سلول‌ها طبیعی بوده و بعد از ۲۴ ساعت ۶×۱۰^{۴} سلول در هر میلی لیتر محیط کشت اندازه گیری شد.

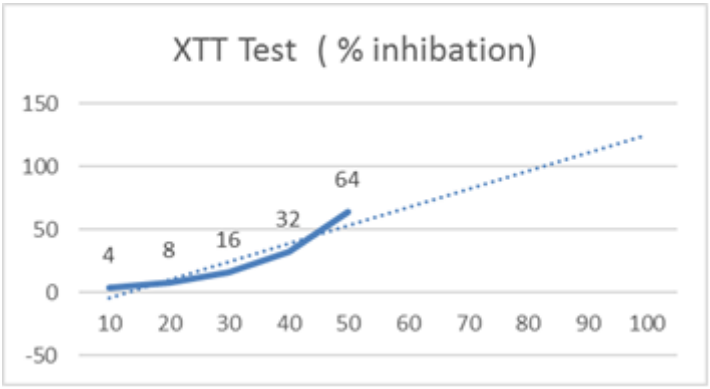
حداکثر لیز سلولی در فلاکس‌های آلوده به استرین RH توکسپلاسما گوندی که بدون حضور زهر زنبور عسل بود در کشت‌های سلولی HFF بعد از ۵ روز اتفاق افتاد. این دوره ۵ روزه برای فلاکس‌های حاوی تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی همراه با زهر زنبور عسل و همین طور فلاکس‌های حاوی محیط کشت سلولی HFF و زهر زنبور عسل در نظر گرفته شد. میزان لیز سلولی در فلاکس‌های حاوی تاکی زوئیت بدون زهر زنبور عسل از دو گروه دیگر بیشتر بوده و مطابق تست آماری اختلاف معنی داری مشاهده شد($P <۰/۰۵$). همین طور pH محیط حاوی تاکی زوئیت بدون زهر از دو گروه دیگر به طور معنی داری بیشتر بود. پس از برداشت کامل و فیلتر کردن محتوای فلاکس‌ها، آلودگی در همه آنها کمتر از یک درصد مشاهده شد. در طی ۵ روز کشت، مایع محیط‌ها دو بار تعویض گردید.

بررسی اثر زهر زنبور عسل بر روی میزان تکثیر تاکی زوئیت های توکسوپلاسما گوندی نشان داد که در غلظت ۴ میکروگرم بر میلی لیتر اثر کشندگی نسبتاً شدیدی اعمال شده است. این در حالی است که این غلظت از زهر در گروه حاوی محیط کشت و زهر زنبور عسل، اثر بازدارندگی رشد و کشندگی نداشته و فقط اندکی باعث مهار تکثیر سلول‌های شد به طوری که پس از ۳ روز بقایای سلول‌های مرده در محیط، تفاوتی با نمونه کنترل بدون زهر زنبور عسل و تاکی زوئیت توکسپلاسما گوندی نداشت و مهار تکثیر نسبت به نمونه کنترل در معنی دار بود($P <۰/۰۱$، جدول ۱) .

جدول ۱: جدول مقایسه رشد تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* در حضور و عدم حضور زهر زنبور عسل

نوع سلول (تعداد=۵)	رده سلولی HFF	P Value
میانگین حداکثر لیز سلولی در فلاکس‌ها بر حسب روز	۵	$P <۰/۰۰۰۱$
متوسط تعداد تاکی زوئیت ها حاصل از فلاکس	$۲,۴۵ \times ۱۰^{۷}$	$P = ۰/۹۶$
متوسط تعداد تاکی زوئیت های زنده در فلاکس	٪۹۵	$P <۰/۰۰۰۱$
متوسط تعداد تاکی زوئیت های فلاکس حاوی زهر	٪۳۰	$P <۰/۰۵$
متوسط میزان PH محیط کشت فلاکس‌ها	۷,۰۳	نشان داده نشده است

نتایج آزمون XTT نشان داد که زهر زنبور عسل اثر سمی بر روی رده سلولی سالم ندارد. اما سریال رقت تهیه شده و آزمون XTT نشان داد که غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر به بالا بر روی سلول های سالم رده سلولی HFF نیز اثر مهارکنندگی دارد(نمودار ۱). این در حالی است که غلظت ۴ میکروگرم بر میلی لیتر، فقط رشد رده سلولی آلوده به تاکی زوئیت را مهار کرده است.



نمودار ۱: نمودار مهار رشد سلول های زنده رده سلولی HFF با افزایش غلظت زهر زنبور عسل به صورت درصد در طی پنج روز تست XTT برای بدست آوردن غلظت مناسب با کمترین اثر مهار رشد سلولی

بحث

مطالعات بسیار محدودی درباره اثرات ضد انگلی زهر زنبور عسل صورت گرفته است. Luciano و همکارانش به بررسی فسفولیپید زهر زنبور عسل و خواص ضد مالاریایی آن پرداخته اند (۱۱). آنها اثرات ضد مالاریایی زهر زنبور عسل را نشان دادند. در سال ۲۰۱۴ نیز Danneels و همکارانش نشان دادند که زهر زنبور خواص ضد التهابی بر روی رده سلول های انسانی دارد(۱۲).

در این مطالعه ابتدا، جهت تعیین درصد زنده ماندن سلول های سالم رده سلولی HFF (Viability) از روش رنگ آمیزی تریپان بلو و همین طور آزمون XTT استفاده کردیم. از مزایای روش سنجش با XTT این است که از رادیواکتیو اجتناب شده و سبب تعیین نتیجه سریع در microplates، و همچنین نتایج قابل تکرار و حساس می باشد. این آزمون نشان داد که غلظت مهارکننده رشد تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی، بر روی رده سلولی تاثیر منفی ندارد.

در این تحقیق کشت سلولی با استفاده از رده سلولی HFF صورت گرفت که نتایج نشان داد زهر زنبور عسل در الگویی مشخص و معنی دار موجب مهار تکثیر تاکی زوئیت های *توکسوپلاسما گوندی* در این محیط می شود. غلظت مورد آزمایش در این مطالعه ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود که در طی یک دوره ۵ روزه توانست باعث مهار تکثیر انگل درون سلولی شود. البته این مطالعه بر اساس شواهد برای اولین بار انجام شده است و تاکنون مطالعاتی در خصوص اثرات توام زهر زنبور عسل و تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* انجام نشده است و نتایج دیگری برای مقایسه با آن وجود ندارد. اما طبق گزارشات محسنی و همکاران این غلظت زهر بر روی مهار رشد محیط کشت سلولی تاثیری نداشته که نتایج ما نیز در این راستا بود.

اصغر فرهادی در مطالعه ای به سال ۸۳ نشان داد (۱۳) که از بین انواع محیط های کشت سلولی، مانند HEL، MRC5 و HFF، محیط کشت human foreskin fibroblast برای کشت *توکسوپلاسما گوندی* مناسب تر است که بر اساس نتایج ایشان، در این مطالعه از محیط کشت سلولی HFF استفاده نمودیم.

کاظم پریور و همکاران نیز در مطالعه نشان دادند که زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید تمام ترانس می تواند رده سلولی سرطان حاد پرومیلوسیتی را مهار کند (۱۴). در این پژوهش و مطالعات مشابه غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر، تاثیرگذار ترین غلظت بود که ما نیز در این مطالعه از این غلظت از زهر زنبور عسل استفاده کردیم.

در مطالعه ای دیگر خانم فرشته زارع نشان داد که انگل *توکسوپلاسما گوندی* از روز پنجم در موش های سوری مرحله تاکی زوئیت را طی کرده و می تواند کبد، قلب، کلیه و دیگر اندام های بدن را درگیر نماید (۱۵). مطالعه ما نشان داد که زهر زنبور عسل می تواند در مدتی کمتر از پنج روز از رشد تاکی زوئیت های *توکسوپلاسما گوندی* جلوگیری نماید.

نکته بسیار مهم در تهیه محلول XTT استفاده از این محلول دقیقا قبل از شروع آزمایش است در غیر اینصورت محلول XTT خاصیت خود را کاملا از دست می دهند همچنین در این مطالعه محاسبات کلی برای تمامی پلیت ها در زمانهای مختلف در نظر گرفته شده است.

در نهایت با توجه به بررسی های صورت گرفته دیده شد که زهر زنبور عسل توان مقابله با تکثیر و عمل زد ضد انگلی در برابر تاکی زوئیت ها را دارد و می تواند از رشد تاکی زوئیت آن جلوگیری کند. غلظت مورد استفاده همین طور بر روی رده سلولی هیچ تاثیری نداشته و مکانیسم رشد و تکثیر رده سلولی را دچار اختلال نمی کند. در ادامه مطالعه ما پیشنهاد می شود که مکانیسم اثر زهر زنبور عسل بر روی تاکی زوئیت *توکسوپلاسما گوندی* مورد بررسی قرار بگیرد.

سپاس گزاری

با تشکر از آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... الاعظم که امکانات اجرایی این طرح پژوهشی را در حد امکان فراهم نمودند.

REFERENCES

1-McConkey GA, Martin HL, Bristow GC, Webster JP. Toxoplasma gondii infection and behaviour - location, location, location? The Journal of experimental biology. 2013;216(Pt 1):113-9.

2-Asgari Q, Keshavarz H, Shojaee S, Motazedian MH, Mohebali M, Miri R, et al. In Vitro and In Vivo Potential of RH Strain of Toxoplasma gondii (Type I) in Tissue Cyst Forming. Iranian journal of parasitology. 2013;8(3):367-75.

3-Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases. 2005;6(1):41-61.

4. Forman D, West N, Francis J, Guy E. The sero-prevalence of Toxoplasma gondii in British marine mammals. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(2):296-8.

5. Assmar M, Amirkhani A, Piazak N, Hovanesian A, Kooloobandi A, Etessami R. [Toxoplasmosis in Iran. Results of a seroepidemiological study]. Bulletin de la Societe de pathologie exotique. 1997;90(1):19-21.

6. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. Toxoplasma gondii: from animals to humans. International journal for parasitology. 2000;30(12-13):1217-58.

7-Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical microbiology reviews. 1998;11(2):267-99.

8-Costa V, Langoni H. Detection of Toxoplasma gondii in the milk of experimentally infected Wistar female rats. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2010;16:368-74.

9-Naserifar R, Ghaffarifar F, Dalimi-Asl A, Sharifi Z, Shojaei S, Salimi M. Evaluating the immunogenicity for plasmid encoding GRA5 antigen of Toxoplasma gondii in BALB/c mice. KAUMS Journal (FEYZ). 2012;16(4):317-23.

10-Dalimi A, Abdoli A. Toxoplasma gondii and Male Reproduction Impairment: A new Aspect of Toxoplasmosis Research. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(8):e7184.

11-Moreira LA, Ito J, Ghosh A, Devenport M, Zieler H, Abraham EG, et al. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. The Journal of biological chemistry. 2002;277(43):40839-43.

12-Danneels EL, Gerlo S, Heyninck K, Van Craenenbroeck K, De Bosscher K, Haegeman G, et al. How the Venom from the Ectoparasitoid Wasp Nasonia vitripennis Exhibits Anti-Inflammatory Properties on Mammalian Cell Lines. PloS one. 2014;9(5):e96825.

13-A F. Evaluation of three different cell cultures for tachyzoite and DNA production of Toxoplasma gondii. tabib shargh J. 2004;6(2):105-14.

14-Parivar K, Nabiuni M, Jalali H, Nadali F. The Effect of Honey Bee Venom and All-trans Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HL-60 Cell Line. Journal of Rafsenjan University of Medical Sciences. 2011;10(2):112-26.

15. Zare F, Dalimi A, F G. Detection of active Toxoplasma godii (RH strain) in the different body tissues of experimentally infected rats. Modares J Med Sci. 2006;9(1):19-23.