ORIGINAL ARTICLE

The inhibitory effect of ketotifen on entrance of Toxoplasma gondii tachyzoites into macrophages of mouse

Ahmad Daryani[1],
Mohammad-Ali Ebrahimzadeh[2],
Mehdi Sharif[1],
Fatemeh Rezaei[3],
Ehsan Ahmadpour[3],
Shahab Sarvi[4],
Abolghasem Ajami[5],
Hajar Ziaei[4],
Alireza Khalilian[6]

[1] Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD, Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD Student, Toxoplasmosis Research Center AND Student Researches Committee, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] PhD, Assistant Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] PhD, Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] PhD, Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 24, 2013; Accepted December 17, 2013)

Abstract

Background and purpose: Toxoplasma gondii is a protozoon with worldwide distribution. In spite of increasing information about its biology, treatment of toxoplasmosis is restricted to a few drugs and unfortunately using of each of drugs is associated with significant side effects in patients. It seems that investigation on alternative drugs is necessary.

Materials and methods: In case group, concentrations of 1, 5 and 10 µg/ml of ketotifen were prepared and added to RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium containing peritoneal macrophages. After 60 minutes, incubation and adding Toxoplasma gondii tachyzoites to medium, the inhibitory rate of different concentrations of ketotifen on entrance of Toxoplasma tachyzoites into macrophages in 30 and 60 minutes were evaluated. Control group did not receive ketotifen.

Results: The best efficacy of ketotifen in inhibition of entrance of Toxoplasma tachyzoites into macrophages was observed in 10 µg/ml and in 60 minutes (72.90 ± 1.70) ($P < 0.05$).

Conclusion: The findings of this research show that ketotifen is a suitable drug for inhibiting the entrance of Toxoplasma gondii tachyzoites into nucleated cells in vitro.

Keywords: Toxoplasma gondii, ketotifen, entrance inhibition, nucleated cells, mouse

J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(110): 75-80 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۱۰ اسفند سال ۱۳۹۲ (۸۰-۷۵)

اثر داروی کتوتیفن در مهار ورود انگل توکسوپلاسما گوندیی به داخل سلول‌های ماکروفاژ موش سوری

احمد دریانی[۱]
محمد علی ابراهیم‌زاده[۲]
مهدی شریف[۱]
فاطمه رضایی[۳]
احسان احمدپور[۳]
شهاب سروی[۴]
ابوالقاسم عجمی[۵]
هاجر ضیایی[۴]
علیرضا خلیلیان[۶]

چکیده

سابقه و هدف: توکسوپلاسما گوندیی (Toxoplasma gondii) تک یاخته‌ای با انتشار جهانی است و با وجود اطلاعات فزاینده در خصوص بیولوژی توکسوپلاسما هنوز درمان توکسوپلاسموز محدود به چند دارو می‌باشد و متأسفانه استفاده از هر کدام از داروها همراه با عوارض جانبی مهمی در بیماران می‌باشد؛ بنابراین انجام بررسی‌های متعددی جهت یافتن داروهای جایگزین ضد توکسوپلاسما ضروری به نظر می‌رسد. به همین منظور مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر داروی کتوتیفن بر روی غشای سلول میزبان به منظور مهار نفوذ توکسوپلاسما به داخل سلول‌های ماکروفاژ انجام شد.

مواد و روش‌ها: در گروه مورد، غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی کتوتیفن تهیه شد و به محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ماکروفاژهای صفاقی اضافه گردید. بعد از انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه و افزودن تاکی‌زوئیت (Tachyzoites) به محیط، میزان تأثیر غلظت‌های مختلف دارو در مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. گروه شاهد داروی کتوتیفن دریافت نکرد.

یافته‌ها: بهترین تأثیر داروی کتوتیفن در مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به درون سلول‌های هسته‌دار در مدت زمان ۶۰ دقیقه و در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱/۷۰ ± ۷۲/۹۰) مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

استنتاج: کتوتیفن داروی مناسبی جهت مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به درون سلول‌های هسته‌دار در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

واژه های کلیدی: توکسوپلاسما گوندیی، کتوتیفن، مهار ورود، سلول‌های هسته‌دار، موش

مقدمه

توکسوپلاسما گوندیی تک یاخته داخل سلولی اجباری مهره‌داران خونگرم و عامل توکسوپلاسموز در انسان و حیوانات است. این عفونت دارای انتشار جهانی می‌باشد و با

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره ۲۳٤-۹۱ می‌باشد.

مولف مسئول: فاطمه رضایی- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی. E-mail: f.rezaei63@yahoo.com

۱. استاد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. استاد، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۵/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۲۶

توجه به مطالعات گسترده انجام شده، شیوع آن در نقاط مختلف دنیا حدود ۶۰-۳۰ درصد است؛ به طوری که شایع‌ترین انگل انسانی در کشورهای توسعه یافته محسوب می‌شود (۱). مطالعات انجام شده در مناطق و جمعیت‌های مختلف در ایران نیز وجود عفونت توکسوپلاسموز در حداقل ۳۰ درصد افراد را نشان می‌دهد و بالاترین شیوع در استان‌های شمالی کشور گزارش شده است (۲). در افراد با سیستم ایمنی سالم، توکسوپلاسموز به طور معمول فاقد علایم بالینی می‌باشد که در نهایت منجر به یک عفونت مزمن و کیسته شدن انگل در بافت‌های بدن به خصوص مغز می‌شود.

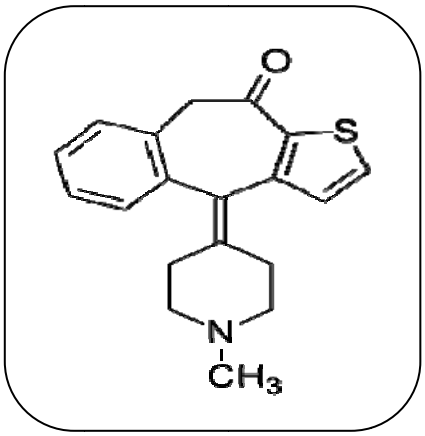
عفونت اولیه در مادران و انتقال انگل به جنین پیامد وخیمی برای جنین در هنگام تولد خواهد داشت که شامل کوری، عقب‌ماندگی ذهنی و... می‌باشد. در مبتلایان به ایدز نیز این میکروارگانیسم با ایجاد التهاب بافت‌های مغز (Encephalitis) سبب مرگ بیمار می‌شود (۳). راه‌های انتقال انگل که به عنوان عوامل خطر ابتلا به توکسوپلاسموز محسوب می‌شود، بسیار متنوع است و شامل مصرف گوشت خام یا نیم‌پز، تماس با گربه آلوده، تماس با خاک آلوده به مدفوع گربه، تمیز کردن جای نگهداری گربه‌ها، انتقال از مادر به جنین، مصرف شیر غیر پاستوریزه، دریافت خون و پیوند عضو می‌باشد (۱).

از طرف دیگر به دلیل تنوع عوامل خطر، گسترش روزافزون بیماری‌های نقص ایمنی و مصرف داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی، ابتلا به توکسوپلاسموز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۴)؛ بنابراین جهت مقابله با بیماری و ریشه‌کنی آن یا باید میزبان نهایی (گربه و گربه‌سانان) را واکسینه کرد که به علت فقدان واکسن مؤثر، تعداد زیاد گربه‌ها و عدم دسترسی به گربه‌های وحشی، امکان استفاده از واکسن وجود ندارد و یا این‌که ایمن‌سازی بر روی میزبان واسط متمرکز گردد. البته با وجود استفاده از آنتی‌ژن‌های مختلف غشایی، سیتوپلاسمی و دفعی-ترشحی انگل جهت ایمنی‌سازی، تاکنون موفقیت چندانی در زمینه تولید واکسن بر علیه عفونت توکسوپلاسمایی حاصل نشده است (۵). روش دیگر مقابله با این انگل، استفاده از داروهایی مانند سولفامیدها (Sulfonamide) از جمله سولفامتوکسازول (Sulfamethoxazole) (سولفامید + تری‌متوپریم) و آنتی‌بیوتیک‌های خانواده ماکرولید (Macrolide Antibiotic) همچون کلاریترومایسین (Clarithromycin) و آزیترومایسین (Azithromycin) می‌باشد. با وجود اطلاعات فزاینده در خصوص بیولوژی توکسوپلاسما، هنوز درمان توکسوپلاسموز محدود به چند دارو است و متأسفانه استفاده از هر کدام از داروهای مذکور همراه با عوارض جانبی مهمی در بیماران می‌باشد؛ بنابراین انجام مطالعه‌ای جهت یافتن داروهای جایگزین ضد توکسوپلاسما ضروری به نظر می‌رسد (۳).

تاکی‌زوئیت‌های (Tachyzoites) توکسوپلاسما پس از تشخیص و اتصال به سلول‌های میزبان، از طریق فاگوسیتوز و اندوسیتوز وارد این سلول‌ها می‌شوند و تکثیر می‌یابند که مهار هر کدام از مراحل تشخیص، اتصال و ورود، از نفوذ تاکی‌زوئیت‌ها به داخل سلول جلوگیری می‌کند و یا میزان آن را کاهش می‌دهد (۶). آنزیم PEF (Penetration enhancing factor) که عامل افزایش نفوذ انگل به داخل سلول می‌باشد، پس از ترشح از اندم‌های کیسه‌ای شکل در قسمت قدامی تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما که Rhoptry نام دارند، به گیرنده‌های سطح سلول‌های هسته‌دار بنام آکتین، لامینین و کلاژن متصل می‌شود. ترشحات راپتری‌ها با کاهش ویسکوزیته سطح غشای سلول میزبان باعث انتقال انگل از طریق اندوسیتوز به درون سلول می‌شود. مشخص شده است که داروهای تثبیت کننده غشای سلولی از جمله سیتوکالازین D (CD) با تغییر مقاومت غشای سلول مانع ورود انگل به داخل سلول می‌شود؛ بدین صورت که میکروفیلامان‌های پروتئین‌های انقباضی که از پلیمرهای آکتین و میوزین تشکیل شده‌اند و در اکثر سلول‌های پستانداران وجود دارند، در ایجاد میکروپزودوپوداها که انگل را به حالت داخل سلولی درمی‌آورند، نقش مهمی دارند و اثر متقابل این زیرواحدهای پروتئینی منجر به ژلاتینی شدن رشته آکتین می‌شود و سیتوکالازین D اثر مهار کنندگی خود را با ممانعت از ژلاتینی شدن آکتین اعمال می‌کند (۹-۷).

از دیگر داروهای تثبیت کننده غشای سلولی می‌توان به کتوتیفن اشاره نمود (۱۱، ۱۰). این دارو یک بنزوسیکلوهپاتیوفن

می‌باشد و جزء داروهای آنتی‌هیستامینی محسوب می‌گردد که در درمان آسم و آلرژی کاربرد دارد و در مجموع داروی بی‌خطری است (تصویر شماره ۱). علاوه بر تأثیرات ضد آسمی، این دارو اثرات آنتاگونیستی بر گیرنده‌های هیستامینی و موسکارینی، اثرات ضد التهابی در روده و نیز اثرات مهاری بر انقباضات عضله صاف دارد. با توجه به اثر تثبیت کنندگی غشای سلول توسط داروی مذکور، به نظر می‌رسد که این دارو ممکن است مانند سیتوکالازین D در جلوگیری از ورود تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما در سلول‌های هسته‌دار نقش داشته باشد؛ بنابراین مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر داروی کتوتیفن بر روی غشای سلول میزبان به منظور مهار نفوذ توکسوپلاسما به داخل سلول‌های ماکروفاژ صورت گرفت.



تصویر شماره ۱: ساختار شیمیایی کتوتیفن

مواد و روش‌ها

۱- کشت انگل و به دست آوردن تعداد زیاد تاکی‌زوئیت

برای انجام این مطالعه از سوش RH انگل توکسوپلاسما گوندیی استفاده شد. برای نگهداری و تکثیر توکسوپلاسما در موش سوری، پس از ضد عفونی کردن سطح شکمی با الکل ۷۰ درصد، تعداد ۵ تا ۱۰ هزار تاکی‌زوئیت به داخل صفاق موش تلقیح شد و بعد از ۲ تا ۳ روز، حدود ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی (Phosphate buffered saline یا PBS) استریل حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین [۱۰۰ واحد بین‌المللی (IU) بر میلی‌لیتر] و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با سرنگ استریل به محوطه صفاقی تزریق گردید. سپس با زدن چند ضربه آرام به محوطه صفاقی موش، مایع صفاقی خارج شد.

۲- تهیه ماکروفاژهای صفاقی موش

برای تهیه ماکروفاژهای صفاقی نیز از موش سوری استفاده شد که به این منظور داخل صفاق موش، ۵ میلی‌لیتر PBS (pH = ۷/۲) تزریق و سپس مایع صفاقی حاوی ماکروفاژ آسپیره گردید. ماکروفاژهای به دست آمده در پلیت‌های شیشه‌ای ۲۴ خانه‌ای ریخته شد و بعد از انکوباسیون یک ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌های مازاد با شستشو حذف گردید. در نهایت به پلیت‌ها محیط کشت RPMI (Roswell park memorial institute) اضافه شد و ماکروفاژها جهت انجام آزمایش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیطی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حاوی CO_2 ۵ درصد قرار گرفتند (۱۲).

۳- اضافه نمودن دارو به محیط کشت و مواجهه با انگل

در این مطالعه پس از تهیه غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی کتوتیفن، مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر غلظت به هر یک از خانه‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی محیط کشت RPMI و ماکروفاژ اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. محیط کنترل حاوی محیط کشت RPMI و ماکروفاژ و ۴×۱۰^۵ تاکی‌زوئیت بود که به این محیط، دارو اضافه نشد.

بعد از انکوباسیون، به هر کدام از محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف از داروی کتوتیفن، تعداد ۴×۱۰^۵ تاکی‌زوئیت اضافه شد و در نهایت میزان مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به داخل ماکروفاژها در دو مرحله (بعد از ۳۰ و ۶۰ دقیقه) مورد ارزیابی قرار گرفت. معیار سنجش مهار ورود تاکی‌زوئیت‌ها به داخل سلول‌های هسته‌دار با توجه به فرمول زیر به دست آمد:

میزان مهار = ۱-[تعداد تاکی‌زوئیت‌ها در سلول‌های ماکروفاژی مواجه شده با دارو/ تعداد تاکی‌زوئیت‌ها در

سلول‌های ماکروفاژی بدون مواجهه با دارو] × ۱۰۰

جهت بررسی هر غلظت از دارو، ۳ لام تهیه گردید که پس از تثبیت با متانول توسط گیمسا رنگ‌آمیزی شد و اطلاعات حاصل از مطالعه ثبت و در مقایسه با گروه کنترل (بدون حضور دارو) با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney U مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

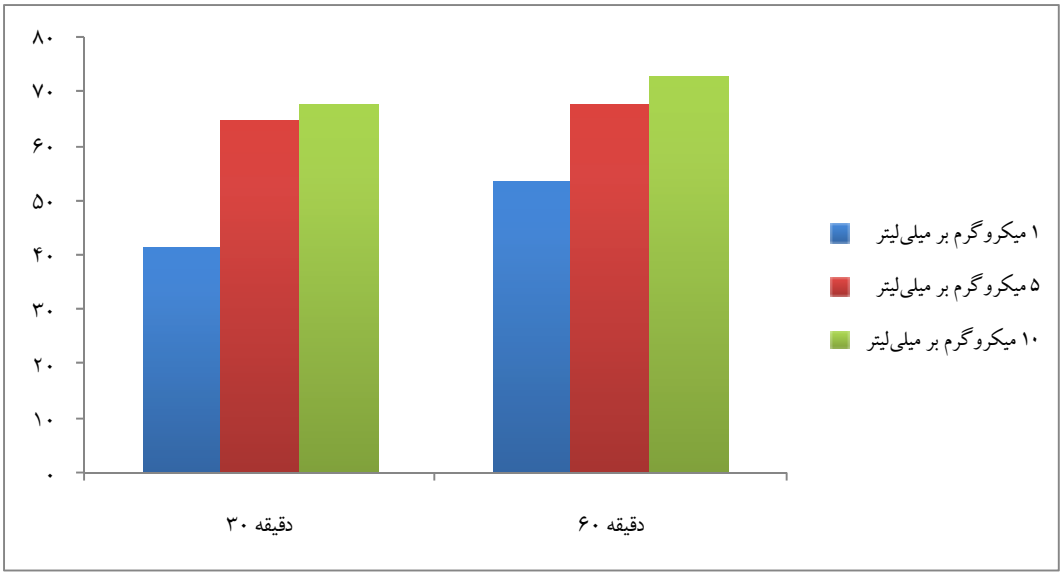
نتایج حاصل از مطالعه تأثیر داروی کتوتیفن در غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به درون سلول‌های هسته‌دار در شرایط آزمایشگاهی و در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه نشان داد که با افزایش غلظت داروی کتوتیفن، میانگین مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به درون سلول‌های هسته‌دار در دو زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه به تدریج افزایش یافت؛ به نحوی که در زمان ۳۰ دقیقه، بیشترین مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کتوتیفن به ترتیب با میانگین ۳ ± ۶۴/۵ و ۱/۰۲ ± ۶۷/۱۷ درصد مشاهده شد که با توجه به نزدیک بودن این دو عدد و نداشتن تفاوت آماری معنی‌دار (P < ۰/۰۵)، غلظت کمتر دارو (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مناسب‌تر به نظر می‌رسد (نمودار شماره ۱).

کتوتیفن در زمان ۶۰ دقیقه با دارا بودن بیشترین میزان مهار در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱/۷۰ ± ۷۲/۹۰ درصد) در مقایسه با داده‌های زمان ۳۰ دقیقه نیز بهترین تأثیر را در مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما دارا بود (P < ۰/۰۵).

بحث

در مطالعه حاضر اثر داروی کتوتیفن در غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه بر مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به درون سلول‌های هسته‌دار در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که کتوتیفن در زمان ۶۰ دقیقه و غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱/۷۰ ± ۷۲/۹۰ درصد) بهترین تأثیر را در جلوگیری از ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندیی دارد (P < ۰/۰۵).

در سال‌های اخیر مطالعات اندکی در زمینه بررسی تأثیر داروهای مختلف بر مهار انگل توکسوپلاسما صورت گرفته است. Ryning و Remington با بررسی اثر سیتوکالازین D بر مهار ورود توکسوپلاسما گوندیی به درون سلول در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که در بین غلظت‌های



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان مهار نفوذ انگل توکسوپلاسما به داخل ماکروفاژ توسط داروی کتوتیفن در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه

۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (پس از ۶۰ دقیقه)، غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین میزان مهار را داشت (۷). در مطالعه حاضر نیز نتایج به دست آمده نشان داد، بیشترین میزان مهار در زمان ۶۰ دقیقه و غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج حاصل از مطالعه Nam و همکاران که بر روی مهار ورود توکسوپلاسما گوندیی به درون سلول‌های MDCK (Madin-Darby canine kidney) به وسیله سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) انجام گرفت، نشان داد که FBS ورود توکسوپلاسما گوندیی را به درون این سلول‌ها مهار می‌نماید (۶). Bajohr و همکاران با مطالعاتی که بر روی مشتقات ۱-Hydroxy-۲-Alkyl-۴ (۱H) Quinolone بر علیه توکسوپلاسماگوندیی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که این ترکیب نیز خاصیت مهار کنندگی بر روی توکسوپلاسما دارد (۱۳). همچنین D′Angelo و همکاران با مطالعه‌ای به روی مشتقات آرتمیزین برای مهار توکسوپلاسما گوندیی در مراحل مختلف چرخه لایتیک در محیط کشت، به این نتیجه رسیدند که مشتقات C-۱۰ unsaturated و Carba-linked از آرتمیزین می‌تواند در مهار عفونت به وسیله توکسوپلاسما گوندیی مؤثر باشد و این مهار می‌تواند در بیش از یک مرحله از چرخه لایتیک انگل رخ دهد (۹).

Stokkerman و همکاران در بررسی مهار تکثیر توکسوپلاسما گوندیی توسط Dinitroaniline Herbicides به این نتیجه رسیدند که این ماده باعث مهار تکثیر توکسوپلاسما گوندیی می‌شود (۸). Dinitroaniline به عنوان یک مداخله‌گر در پلیمریزاسیون توبولین در گیاهان شناخته شده است؛ همچنین Dinitroaniline به توبولین‌های لیشمانیا متصل می‌گردد و پلیمریزاسیون میکروتوبول‌های زیر غشای آن را مهار می‌کند. در پلاسمودیوم نیز با اتصال به میکروتوبول‌های زیر غشای گامتوسیت (Gametocyte) منجر به مهار در دو مرحله اریتروسیتی و تاژک‌دار شدن گامتوسیت‌ها می‌شود (۸).

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان از داروی کتوتیفن در مهار ورود تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به درون سلول‌های هسته‌دار استفاده کرد، اما با توجه به این‌که این اثرات در محیط زنده بر روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان مشخص نمی‌باشد؛ بنابراین انجام مطالعات تکمیلی و مقایسه این دارو با داروهای انتخابی توکسوپلاسموز جهت دستیابی به دارویی مؤثر و کم‌خطر ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر حاصل پایان‌نامه خانم فاطمه رضایی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته انگل‌شناسی پزشکی می‌باشد که در قالب طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران اجرا شد.

References

1. Weiss LM, Kim K. Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods. New York, NY: Academic Press; 2011.
2. Mostafavi SN, Jalali Monfared L. Toxoplasmosis epidemiology in Iran: a systematic review. J Isfahan Med Sch 2012; 30(176): 1-15.
3. Dubey JP. Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010.
4. Weiss LM, Kim K. Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Philadelphia, PA: Elsevier/Academic Press; 2007.
5. Daryani A. Toxoplasma. Ardabil, Iran: Yavarian Publication; 2004. (Persian).
6. Nam HW, Kim DJ, Park SK, Choi WY. Inhibition of entry of Toxoplasma gondii into MDCK cells by fetal bovine serum. Korean J Parasitol 1993; 31(4): 379-82.
7. Ryning FW, Remington JS. Effect of cytochalasin D on Toxoplasma gondii cell entry. Infect Immun 1978; 20(3): 739-43.
8. Stokkermans TJ, Schwartzman JD, Keenan K, Morrissette NS, Tilney LG, Roos DS. Inhibition of Toxoplasma gondii replication by dinitroaniline herbicides. Exp Parasitol 1996; 84(3): 355-70.
9. D'Angelo JG, Bordon C, Posner GH, Yolken R, Jones-Brando L. Artemisinin derivatives inhibit Toxoplasma gondii in vitro at multiple steps in the lytic cycle. J Antimicrob Chemother 2009; 63(1): 146-50.
10. Sweetman SC. Martindale: The Complete Drug Reference. 35th ed. London, UK: Pharmaceutical Press, 2007.
11. Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. Goodman & Gilmans The

pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill, Medical Publishing Division; 1996.
12. Cortez E, Stumbo AC, Saldanha-Gama R, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Rodrigues CA, et al. Immunolocalization of an osteopontin-like protein in dense granules of Toxoplasma gondii tachyzoites and its association with the parasitophorous vacuole. Micron 2008; 39(1): 25-31.
13. Bajohr LL, Ma L, Platte C, Liesenfeld O, Tietze LF, Gross U, et al. In vitro and in vivo activities of 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H) quinolone derivatives against Toxoplasma gondii. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(1): 517-21.